

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова  
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

**Расин Антон Борисович**

**Применение спектроскопии ЯМР для исследования  
фукоиданов и продуктов их ферментативной трансформации**

1.4.9 – Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научные руководители:  
д.б.н. Кусайкин Михаил Игоревич  
д.х.н. Калиновский Анатолий Иванович

Владивосток – 2021

## Оглавление

Список используемых сокращений и обозначений .....	4
Введение .....	5
1. Обзор литературы.....	8
1.1. Применение спектроскопии ЯМР для установления структуры фукоиданов .....	8
1.2. Фукоиданы .....	15
1.2.1 Фукоиданы с основной цепью, состоящей из 1→3-связанных остатков сульфатированной фукозы .....	17
1.2.2 Фукоиданы с основной цепью, состоящей из 1→4-связанных остатков сульфатированной фукозы .....	26
1.2.3 Фукоиданы с основной цепью, состоящей из чередующихся 1→3- и 1→4-связанных остатков сульфатированной фукозы .....	26
1.2.4 Фукоиданы с основной цепью, состоящей из фукозы и содержащей 1→2-связанные остатки .....	31
1.2.5 Сульфатированные галактофуканы, содержащие галактозу в основной цепи .....	31
1.2.6 Сульфатированные галактофуканы, содержащие галактозу в боковых цепях .....	39
1.2.7 Фукоиданы сложного состава.....	43
1.3. Использование фукоиданов для конструирования наночастиц .....	49
1.3.1 Общие сведения .....	49
1.3.2 Получение наночастиц на основе фукоиданов .....	50
1.3.3 Влияние молекулярной массы на параметры наночастиц.....	51
1.3.4 Влияние соотношения компонентов на параметры наночастиц.....	51
1.3.5 Металлические наночастицы, покрытые фукоиданом.....	54
2. Результаты и обсуждение .....	57
2.1. Получение и исследование структуры высоко- и низкомолекулярных продуктов ферментативного расщепления фукоидана из <i>Fucus evanescens</i> .....	57
2.2. Получение и исследование структуры низкомолекулярных регулярных продуктов ферментативного расщепления фукоидана из <i>Sargassum horneri</i> .....	61
2.3. Получение и исследование структуры высокомолекулярных регулярных продуктов ферментативного расщепления фукоидана из <i>S. horneri</i> .....	70
2.4. Характерные химические сдвиги сигналов атомов некоторых сульфатированных фукоолигосахаридов .....	74

2.5. Получение фукоидан-хитозановых наночастиц.....	81
2.5.1 Компоненты наночастиц .....	81
2.5.2 Характеристика наночастиц.....	84
3. Материалы и методы.....	91
3.1. Источники полисахаридов.....	91
3.2. Материалы.....	91
3.3. Выделение и очистка фукоиданов .....	91
3.4. Получение и выделение продуктов ферментативного гидролиза .....	92
3.5. Разделение высокомолекулярных продуктов ферментативного расщепления фукоидана на DEAE-Масго ргер .....	92
3.6. Определение моносахаридного состава .....	92
3.7. Анализ методом гель-фильтрации.....	93
3.8. Электрофорез продуктов ферментативного расщепления фукоиданов .....	93
3.9. Спектроскопия ЯМР.....	94
3.10. Получение наночастиц.....	94
3.11. Измерение размера и заряда наночастиц .....	95
3.12. Компьютерное моделирование наноструктур .....	95
3.13. Изотермическая титрационная калориметрия.....	96
Заключение.....	97
Выводы .....	98
Список литературы.....	100

## Список используемых сокращений и обозначений

COSY – Correlation Spectroscopy

DMSO – диметилсульфоксид

FeF2 – регулярный фукоидан из *Fucus evanescens*

FeF1 – фукоидан из *F. evanescens* с менее регулярной структурой

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMP – высокомолекулярные продукты реакции

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Correlation

LMP – низкомолекулярные продукты реакции

NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

ROESY – Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy

ScF – фукоидан из *Saccharina cichorioides*

ShF – фукоидан из *Sargassum horneri*

КССВ – константы спин-спинового взаимодействия

o/o – объём к объёму

ССВ – спин-спиновые взаимодействия

ССИ – спад свободной индукции

ТМХ – триметил-хитозан

Ф – фукоидан

Х – хитозан

ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера

## Введение

**Актуальность темы исследования.** В настоящее время одной из интенсивно развивающихся областей биоорганической химии является изучение структуры и биологической активности веществ, получаемых из морских организмов. Богатым источником таких веществ являются водоросли. Бурые водоросли включают в себя большое количество соединений, но 40–80% из них составляют полисахариды: фукоидан, альгиновая кислота и ламинаран [1].

Полисахариды бурых водорослей являются широко распространенными веществами, обладающими высокой биологической активностью и при этом низкой токсичностью. Некоторые полисахариды имеют сложную химическую структуру, без точного установления которой невозможно их использование в качестве терапевтических агентов. Необходимо отметить, что в последнее время в медицинскую практику в качестве лекарственных средств были введены некоторые полисахариды, обладающие противовирусной и иммуномодулирующей активностью, например, Панавир, представляющий собой стандартизованную смесь полисахаридов побегов картофеля.

В число таких полисахаридов входят фукоиданы – сульфатированные гетерополисахариды, состоящие, в основном, из остатков сульфатированной фукозы (зачастую они также включают остатки галактозы и других моносахаридов). Фукоиданы вызывают пристальный интерес исследователей, поскольку обладают широким спектром биологической активности – ангиогенной, противоопухолевой, антикоагулянтной и др. Однако на пути их широкого применения в медицине стоит исключительная сложность их структуры и, как следствие, получение стандартизованных образцов. Установление точной структуры фукоиданов затрудняют гетерогенность моносахаридного состава, наличие нерегулярно расположенных сульфатных и ацетатных групп, а также присутствие протяженных боковых цепей.

Одним из наиболее перспективных неdestructивных методов исследования структуры является спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Она позволяет определять структуру образца без его разрушения и с высокой точностью. Однако её возможности в исследовании нативных фукоиданов зачастую оказываются ограничены из-за их высокой молекулярной массы и

нерегулярности. Уменьшение молекулярной массы и повышение регулярности химическими методами часто приводит к деградации молекул фукоидана и потере структурной информации. В некоторых случаях из-за разрушения молекулы безвозвратно теряется до 90% структурной информации. Перспективным подходом для изучения структуры является использование комбинации методов ферментативной деполимеризации с последующим анализом структуры образовавшихся фрагментов методом спектроскопии ЯМР. Такой подход позволяет провести полную реконструкцию молекул фукоидана. Кроме того, постоянство структуры продуктов ферментативной трансформации открывает перспективы получения новых стандартных препаратов, которые могут быть использованы в медицинских целях как в качестве самостоятельных препаратов, так и в составе комплексов и различных наносистем.

**Цели и задачи исследования.** Целью данной работы является установление с помощью ЯМР спектроскопии структуры продуктов ферментативной трансформации фукоиданов из бурых водорослей *Fucus evanescens* и *Sargassum horneri*, а также их применение для конструирования наночастиц.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1) получить продукты ферментативного гидролиза фукоиданов из *F. evanescens* и *S. horneri*; 2) с помощью спектроскопии ЯМР установить структуры данных продуктов; 3) на основе полученных данных провести реконструкцию молекул фукоиданов из бурых водорослей *F. evanescens* и *S. horneri*; 4) получить и охарактеризовать наночастицы, используя фукоидан с установленной структурой.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Структура высокомолекулярного продукта ферментативной деполимеризации фукоидана из *F. evanescens*, установленная методами спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, ROESY, HMBC, построена из регулярного фрагмента  $\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2,4SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-}$   
 $(2\text{SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow$ .
2. Молекула фукоидана из *F. evanescens* представляет собой линейный полисахарид, состоящий из остатков  $\alpha\text{-L-фукопиранозы}$ , соединённых

1→3-, 1→4-связями. Около 55% остатков фукозы содержит сульфатные группы при C2 и C4, а остальные только при C2.

3. Структура одного из трёх высокомолекулярных продуктов ферментативной деполимеризации фукоидана из *S. horneri* построена из регулярно повторяющегося тетрасахаридного фрагмента, состоящего из дисахаридного звена основной цепи →3)-α-L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→4)-α-L-Fucp-(2,3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→, к которому при C4 примыкает боковая цепь α-L-Fucp-(1→2)-α-L-Fucp-(1→. Другой полисахарид включает аналогичные боковые цепи, а его основная цепь содержит элементы, присутствующие в основной цепи первого, однако его структура заметно менее регулярна, чем у него. Основная цепь третьего состоит преимущественно из повторяющегося фрагмента →3)-α-L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→4)-α-L-Fucp-(2,3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→. Боковые цепи имеют структуру α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→.
4. Молекула фукоидана из *S. horneri* представляет собой разветвлённый полисахарид, основная цепь которого состоит из остатков α-L-фукопиранозы, соединённых 1→3-, 1→4-связями и сульфатированных при C2 и C3 (в очень редких случаях при C4). Большинство боковых цепей имеет структуру α-L-Fucp-(1→2)-α-L-Fucp-(1→, около 20% – структуру α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→.
5. Фукоидан из *F. evanescens* может быть использован для создания хитозан-фукоидановых наночастиц. С ростом содержания фукоидана размер частиц увеличивается, дзета-потенциал смещается в сторону отрицательных значений. Частицы на основе регулярного фукоидана с бóльшим молекулярным весом крупнее, чем частицы на основе фукоидана с менее регулярной структурой и меньшим молекулярным весом. При формировании наночастиц протекают два последовательных процесса связывания, отличающихся направлением изменения энтропии и энтальпии.

## 1. Обзор литературы

### 1.1. Применение спектроскопии ЯМР для установления структуры фукоиданов

Одной из характеристик ядер атомов является их магнитный момент – физическая величина, описывающая магнитные свойства вещества и вызывающая ориентацию тел относительно вектора внешнего магнитного поля. Ядра практически всех химических элементов имеют изотопы с ненулевым магнитным моментом. При помещении образца такого вещества в магнитное поле ядра его атомов способны поглощать электромагнитные волны определённой частоты. Это явление называется ядерным магнитным резонансом (ЯМР). Поскольку на резонансную частоту ядра влияет его химическое окружение через промежуточные химические связи, это явление может быть использовано для установления химической структуры вещества [2].

Метод спектроскопии ЯМР известен своей высокой эффективностью для установления структуры углеводов.

Наиболее простым в получении и самым распространённым является протонный ( $^1\text{H}$ ) спектр, на котором можно наблюдать сигналы атомов водорода.

Ключевые параметры протонного спектра ЯМР:

- 1) количество сигналов, соответствующее количеству *неэквивалентных* ядер данного типа;
- 2) положение сигналов (химический сдвиг) – распределение электронной плотности по молекуле. Спектр всегда представляют так, что более сильные поля находятся в нём справа. Химический сдвиг – разница между положениями пиков поглощения атомов вещества и эталонного образца, выраженная в специфических единицах – миллионных долях (м.д.). Значение химического сдвига в м.д. соответствует отношению его частоты в Гц к частоте спектрометра в МГц;
- 3) форма сигналов (спиновое расщепление) – тип и количество *соседних* ядер, конформационные эффекты. При наличии у группы эквивалентных протонов по соседству неэквивалентных протонов, их сигнал расщепляется и принимает форму *мультиплета*;

- 4) площадь сигналов (интенсивность) – количество магнитно *эквивалентных* ядер, давших сигнал. Сравнение интенсивностей сигналов, принадлежащих разным моносахаридным остаткам, позволяет определить количественное соотношение этих остатков в исследуемом углеводе.

Эксперимент по регистрации спектра  $^1\text{H}$  проходит следующим образом. Вначале векторы намагниченностей протонов направлены вдоль оси  $z$ , совпадающей с внешним магнитным полем ЯМР-спектрометра. Электромагнитный импульс на частоте резонанса ядер протонов, приложенный в плоскости  $x$ - $y$ , приводит к отклонению их векторов намагниченностей от первоначального направления и появлению компонентов намагниченности в плоскости  $x$ - $y$  (Рисунок 1а). Процесс возвращения намагниченностей ядер к равновесному положению вдоль оси  $z$  (релаксация) сопровождается испусканием энергии. При этом векторы намагниченностей  $M_i$  прецессируют вдоль оси  $z$  (Рисунок 1б). Частота прецессии Лармора зависит от химического сдвига данного протона:  $\omega_i = 2\pi\nu_i$  [3].

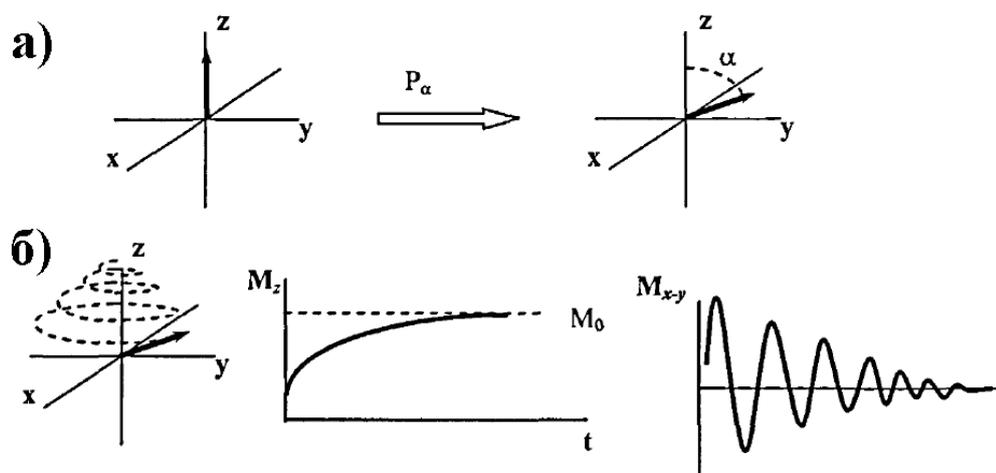


Рисунок 1 – Поведение намагниченности протонов в ходе  $^1\text{H}$  эксперимента. а) действие на намагниченности импульса  $P_\alpha$ , приложенного вдоль оси  $x$  и соответствующего повороту векторов намагниченностей на угол  $\alpha^\circ$ ; б) Ларморова прецессия векторов намагниченностей в ходе релаксации. Продольная намагниченность  $M_z$  с течением времени стремится к равновесному значению  $M_0$ , а поперечная намагниченность  $M_{x-y}$ , совершая синусоидальные колебания, экспоненциально спадает до нуля [3,4]

Если вокруг возбуждаемого образца расположена катушка, настроенная на частоту поглощения магнитных ядер, изменение их намагниченностей создаёт в

ней ток, измерение которого в процессе релаксации создаёт кривую спада свободной индукции (ССИ) – зависимость интенсивности сигнала ЯМР от времени. С помощью математической процедуры Фурье-преобразования можно получить из неё спектр частот поглощения – зависимость интенсивности поглощения от частоты [2].

В случае малого количества вещества одного цикла «импульс-релаксация» оказывается недостаточно для получения спектра с хорошим отношением «сигнал-шум». Цикл повторяют несколько раз, при этом сигналы накапливаются. Перед началом каждого нового цикла вводится релаксационная задержка  $t_0$  (Рисунок 2), в течение которой система приходит в состояние теплового равновесия после предыдущего цикла [4].

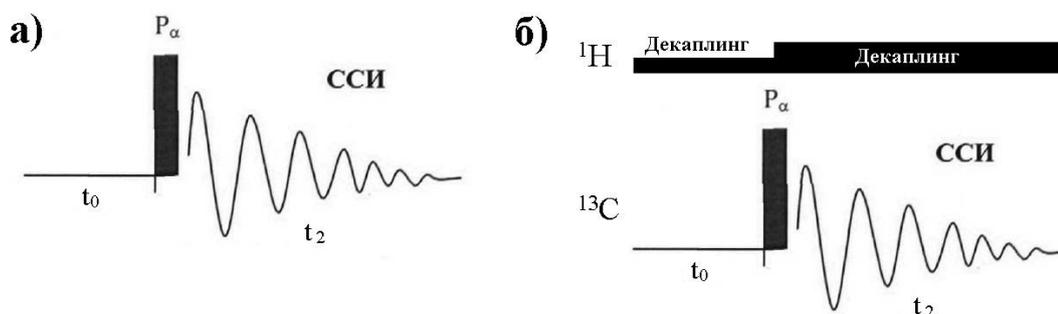


Рисунок 2 – Импульсная последовательность экспериментов  $^1\text{H}$  (а) и  $^{13}\text{C}$  (б).  $t_0$  – релаксационная задержка,  $t_2$  – время детектирования ССИ

Следующим по распространённости после протонного является спектр ядер углерода  $^{13}\text{C}$ . Спектр  $^{13}\text{C}$  значительно менее чувствителен для ЯМР эксперимента, чем  $^1\text{H}$ : во-первых, его магнитный момент в разы меньше, во-вторых, низкое природное содержание (около 1% в естественной смеси изотопов) затрудняет его детектирование. Поэтому на получение спектра  $^{13}\text{C}$  уходит значительно больше времени, чем на получение спектра  $^1\text{H}$ .

Хотя в общее экранирование протонов и ядер  $^{13}\text{C}$  вносят вклад одни и те же факторы – диамагнитное экранирование, парамагнитное экранирование и вклад анизотропии магнитной восприимчивости соседних атомов – их относительный вклад отличается. Вклад парамагнитного экранирования мал для протонов, но является наиболее существенным для ядер  $^{13}\text{C}$  [5].

Для увеличения интенсивности сигналов ядер  $^{13}\text{C}$  чаще всего используются методики гетероядерного декаплинга – дополнительного облучения связанных с

атомами углерода магнитных ядер, в большинстве случаев  $^1\text{H}$ . Это приводит к удалению всех расщеплений  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  и сосредоточению всей интенсивности каждого сигнала  $^{13}\text{C}$  в одном пике, что значительно повышает интенсивность спектра. Существует несколько разновидностей декаплинга, в наиболее часто применяемой из которых декаплер работает непрерывно, изменяться может только его мощность (Рисунок 2). В спектрах, полученных таким образом, сигналы усилены за счёт ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) – избирательного облучения одного из ядер молекулы, приводящего к изменению интенсивностей сигналов ЯМР тех ядер, которые в пространстве расположены вблизи этого ядра – и расщепление сигналов отсутствует [2].

Чтобы сделать возможным сравнение химических сдвигов различных соединений, в них добавляют специальное химическое соединение, называемое стандартом. Эталон для спектров на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  является тетраметилсилан  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ , сигналу которого присваивают значение 0 Гц, но на практике в качестве эталона могут использоваться соединения, которым присваивается определённый отличный от нуля химический сдвиг.

Полученные данные сравнивают с химическими сдвигами известных соединений, например, в случае с фукоиданами, такими соединениями являются  $\alpha$ -L-фукопираноза, для которой характерны следующие сигналы:  $\text{C1/H1} = 93,3/5,19$ ,  $\text{C2/H2} = 69,2/3,76$ ,  $\text{C3/H3} = 70,4/3,85$ ,  $\text{C4/H4} = 73,0/4,11$ ,  $\text{C5/H5} = 67,4/4,48$ ,  $\text{C6/H6} = 16,7/1,20$ , и  $\beta$ -D-галактопираноза ( $\text{C1} = 97,7/4,48$ ,  $\text{C2/H2} = 73,3/3,56$ ,  $\text{C3/H3} = 74,2/3,68$ ,  $\text{C4/H4} = 70,1/3,98$ ,  $\text{C5/H5} = 76,3/3,73$ ,  $\text{C6/H6} = 72,3/3,80$ ) [5,6]. Электроотрицательные заместители, такие как сульфатные группы, смещают резонансные сигналы ближайших протонов и ядер  $^{13}\text{C}$  в слабое поле. На примере метил- $\alpha$ -D-галактопиранозида было показано, что наличие сульфатной группы в положении 2, 3, 4 или 6 приводит к смещению в сторону слабого поля химических сдвигов сигналов соответствующих атомов углерода (на 6,3–8,3 м.д.) и водорода (на 0,41–0,75 м.д.). Кроме того, это приводит и к изменению химических сдвигов сигналов соседних протонов и ядер  $^{13}\text{C}$ , хотя и на значительно меньшие величины. Причём если сигналы соседних протонов смещаются только в сторону слабого поля, то в случае сигналов ядер  $^{13}\text{C}$  картина менее однозначная: сигналы одних

соседних атомов смещаются в сторону слабого поля, других – в сторону сильного [7].

Наличие ацетатных групп также смещает сигналы протонов и ядер  $^{13}\text{C}$  в сторону слабого поля. Однако у атомов углерода это смещение гораздо слабее, чем в случае сульфатных групп. В зависимости от моносахаридного остатка и положения ацетатной группы оно может составлять от 0,6 до 3,5 м.д. Зато сигналы протонов ацетатные группы смещают ещё больше, чем сульфатные – на 0,46–1,36 в случае метил- $\alpha$ -D-галактопиранозида, причём для других моносахаридных остатков оно может быть ещё больше [8].

К смещению сигнала ядра  $^{13}\text{C}$  в слабое поле приводит и наличие гликозидных связей. Величина сдвига варьируется в зависимости от положения связи, типа моносахаридного остатка, а также от относительной изомерии связанных остатков (D-D/L-L или D-L/L-D) и от того, какими аномерами они являются ( $\alpha$ - $\alpha$ ,  $\alpha$ - $\beta$ ,  $\beta$ - $\alpha$ ,  $\beta$ - $\beta$ ). Например, при связывании одного остатка  $\beta$ -D-галактозы с C2, C3, C4 или C6 другого остатка  $\beta$ -D-галактозы сигналы соответствующих C2, C3, C4 или C6 смещаются в слабое поле на 7,8–9,8 м.д. [9]. Существенного смещения сигналов протонов при этом не происходит.

Значительное влияние на химические сдвиги атомов оказывает циклическая форма моносахаридного остатка. Химические сдвиги сигналов всех углеродных атомов  $\alpha$ -L-фукозы в фуранозной форме находятся ближе к слабому полю, чем у  $\alpha$ -L-фукопиранозы. Отличия сдвигов разных атомов неодинаковы: так, если разница между сигналами C4 составляет 13 м.д., то отличие между сигналами C3 – всего 5 м.д. [10].

Двумерная спектроскопия ЯМР позволяет выявлять спиновые связи между магнитными ядрами в одном эксперименте. Двумерный спектр представляет собой зависимость интенсивности сигнала от двух независимых времен  $t_1$  и  $t_2$ . Импульсные последовательности двумерных методик включают 4 этапа: подготовки, эволюции, смешивания и детектирования.

Простейшими видами двумерных спектров являются спектры COSY (Correlation spectroscopy), с помощью которых можно определить спин-спиновые связи между протонами и, соответственно, отнести сигналы к определённым остаткам молекулы. Спектры COSY симметричны относительно диагонали.

Сигналы, расположенные не на диагонали спектра (кросспики или корреляции), соответствуют спин-спиновым взаимодействиям (ССВ) между ядрами, сигналы которых отвечают проекциям кросспиков на оси двумерного спектра. Подготовительный период импульсной последовательности COSY заканчивается  $90^\circ_x$ -импульсом, поворачивающим вектор намагниченности в плоскость  $x$ - $y$ , вдоль оси  $y$ . В течение времени  $t_1$  вектор прецессирует (эволюционирует), после чего на него действует второй  $90^\circ_x$ -импульс (Рисунок 3), поворачивающий  $y$ -компоненту вектора в плоскости  $y$ - $z$ , вдоль оси  $-z$ , в результате чего часть намагниченности выводится из поперечной плоскости. Интенсивность остающегося сигнала при этом изменяется в зависимости от  $t_1$  идентично сигналу ССИ. Двумерный спектр представляет собой серию сигналов ССИ, каждый из которых записан для определённого  $t_1$  [2].

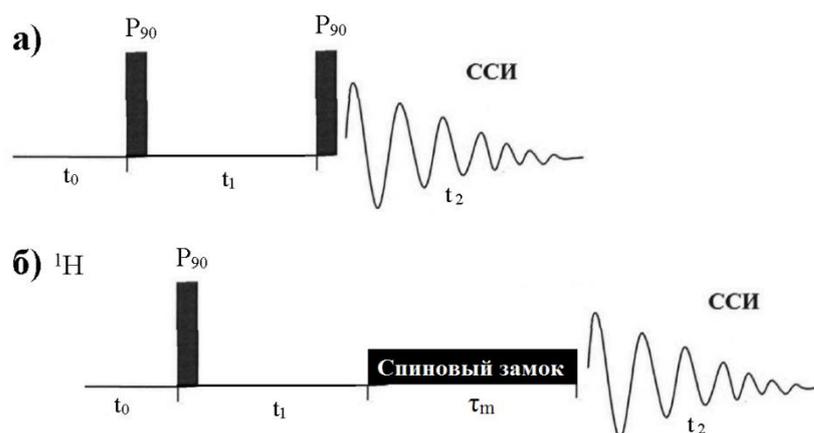


Рисунок 3 – Импульсная последовательность экспериментов COSY (а) и ROESY (б)

Методика NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) отличается от COSY тем, что в ней кросспики соответствуют не ССВ, а корреляциям, вызванным ядерным эффектом Оверхаузера (ЯЭО). Таким образом, спектр NOESY позволяет определять, какие именно протоны сближены в пространстве, в частности, с каким протоном аномерный атом связан гликозидной связью. Разновидностью NOESY является методика ROESY (Rotating-frame Overhauser effect spectroscopy), когда измерение ЯЭО проводится во вращающейся системе координат. В этом случае все ЯЭО являются положительными [2].

Импульсная последовательность ROESY включает в себя «спиновый замок» (серия повторяющихся  $180^\circ$ -импульсов с очень малым промежутком между ними), благодаря которому в поперечной плоскости возникает ЯЭО (Рисунок 3). При включении спинового замка ориентация компонент магнитных векторов разных ядер вдоль оси  $u$  может быть противоположной. Спиновый замок это фиксирует, в результате чего возникает ЯЭО. При различных  $t_1$  противофазную ориентацию принимают векторы намагниченности разных протонов. Соответственно, накапливаются ЯЭО для разных ядер. Продолжительность применения спинового замка соответствует периоду смешивания  $\tau_m$ . Для эксперимента необходимо подобрать такой  $\tau_m$ , чтобы ЯЭО успел вырасти, но не успел упасть до незаметного уровня из-за релаксации [2].

ССВ между ядрами  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  (а также  $^1\text{H}$  и  $^{15}\text{N}$  и других пар ядер) позволяют выявить методы, являющиеся гетероядерными аналогами COSY. Корреляция между сигналами протонов и сигналами непосредственно связанных с ними атомов углерода может быть установлена с помощью эксперимента HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), где одна ось спектра HSQC соответствует шкале химических сдвигов  $^1\text{H}$ , другая – шкале химических сдвигов  $^{13}\text{C}$  [2].

ССВ между протонами и атомами  $^{13}\text{C}$  через 2-3 химические связи (дальние корреляции) могут быть выявлены с помощью другого метода, отличающегося от предыдущего величиной констант ССВ (КССВ). Чаще всего для этого применяется эксперимент HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). В нём одному сигналу протона может соответствовать несколько сигналов атомов углерода и наоборот. Метод чрезвычайно информативен, в частности, он позволяет выявлять гликозидные связи между остатками, но не лишён недостатков. КССВ через 2 связи часто бывает близка к нулю. С другой стороны, в спектре HMBC могут проявляться ненулевые КССВ через 4 связи. Кроме того, из всех перечисленных двумерных экспериментов HMBC является наиболее времяёмким, и при малом количестве образца его проведение может оказаться невозможным [2].

При детальном структурном анализе нативных фукоиданов со сложной структурой при помощи спектроскопии ЯМР возникает несколько проблем. Выделенные полимеры зачастую представляют собой смеси нескольких разных полисахаридов, которые не получилось разделить полностью. Молекулы этих

полисахаридов зачастую нерегулярны, в результате чего полученные спектры ЯМР не поддаются полной расшифровке. Обычно фукоидан подвергают дополнительным модификациям, позволяющим получить его фрагменты с более простой структурой, которую можно установить. Однако при этом неизбежно теряется часть информации о структуре молекулы [11].

## 1.2. Фукоиданы

За последние несколько лет количество публикаций с ключевым словом «фукоидан» резко возросло. По состоянию на ноябрь 2020 г. более 63% тех из них, что входят в индекс Scopus (1702 из 2692), были написаны в течение последних 10 лет (2010–2020). Впервые же фукоиданы были обнаружены в бурых водорослях *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata* и *Laminaria saccharina* в 1913 г. [12]. Тогда выделенный полимер называли «фукоидином». Сегодня этот класс соединений в номенклатуре органических соединений IUPAC носит название «фукоиданы», но помимо него используются и термины «сульфатированные фуканы», «фуканы» и «фукозаны» [13].

В 1948 году было обнаружено, что помимо бурых водорослей, фукоиданы встречаются и в морских иглокожих [14], а именно оболочках яйцеклеток морских ежей [15] и стенках тел голотурий [16]. С тех пор были успешно выделены фукоиданы из многочисленных видов бурых водорослей, охарактеризованы их структура и свойства. Фукоиданы довольно просто экстрагируются из водорослей и не имеют аналогов в наземных организмах. Содержание фукоиданов в водорослях и их структура зависит от биологического вида организма [17], среды его обитания и сезона сбора [1,18]. На количество фракций фукоиданов, которые можно выделить из водорослей, также влияет используемый для этого метод [19].

Фукоиданы относятся к крупному семейству сульфатированных полисахаридов, включающему в себя собственно фукоиданы – полисахариды, преимущественно состоящие из остатков сульфатированной L-фукозы, аскофилланы – состоящие из остатков уроновых кислот и/или ксилозы и маннозы, саргассаны – состоящие из остатков глюкуроновой кислоты и галактозы [20,21].

Помимо фукоиданов, состоящих исключительно из фукозы, существуют и фукоиданы с более сложным химическим составом. Чаще всего помимо фукозы в составе фукоиданов встречается галактоза (если её содержание превышает 50%, полисахарид называют галактофуканом). Впервые фукан с заметным содержанием галактозы был выделен в 1962 году [22]. Впоследствии в фукоиданах из различных бурых водорослей были обнаружены и другие сахара: рамноза (рамнофуканы), ксилоза (ксилофуканы), а также манноза, глюкоза [23] и глюкуроновая кислота. Иногда остатки моносахаридов, могут быть ацелированы. В отличие от фукоиданов, полученных из водорослей, фуканы из морских иглокожих имеют простые линейные структуры, состоящие из повторяющихся моносахаридных звеньев, включающих лишь сульфатированные остатки фукозы.

Фукозосодержащие полисахариды можно классифицировать по их моносахаридному составу (Рисунок 4):

- 1) фуканы – полисахариды, состоящие только из остатков сульфатированной фукозы;
- 2) галактофуканы – полисахариды, состав которых включает примерно одинаковое количество остатков фукозы и галактозы;
- 3) полисахариды, в состав которых, помимо фукозы входят в сопоставимом количестве остатки других моносахаридов: маннозы, глюкуроновой кислоты, ксилозы и т.д.

Первые две группы можно разделить на несколько подгрупп, в зависимости от строения основной цепи (Рисунок 4). Так фуканы подразделяются на:

- 1.1) имеющие основную цепь, которая состоит из 1→3-связанных остатков сульфатированной фукозы;
- 1.2) имеющие основную цепь, которая состоит из 1→4-связанных остатков сульфатированной фукозы;
- 1.3) имеющие основную цепь, которая состоит из чередующихся 1→3 и 1→4-связанных остатков сульфатированной фукозы.

Галактофуканы можно разделить на две основные подгруппы: те, у которых галактоза входит в состав основной цепи, и те, у которых она присутствует в боковых цепях.

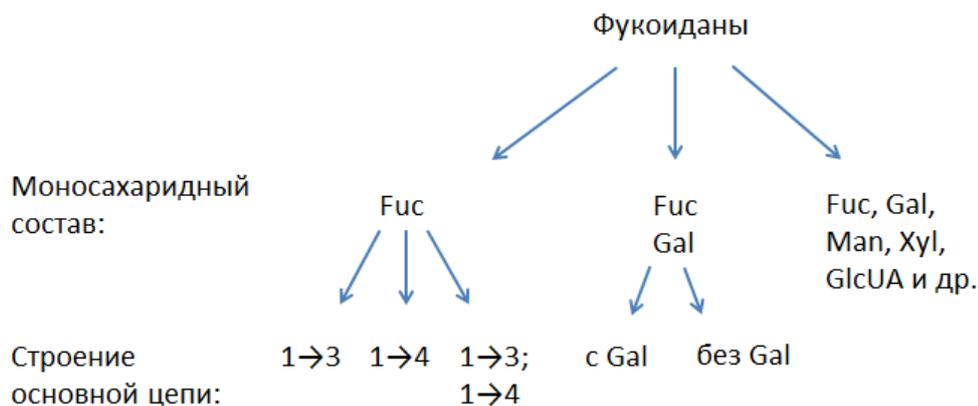


Рисунок 4 – Классификация фукоиданов

### 1.2.1 Фукоиданы с основной цепью, состоящей из 1→3-связанных остатков сульфатированной фукозы

Фукоиданы, имеющие основную цепь, состоящую из остатков  $\alpha$ -L-фукопиранозы, связанных между собой 1→3 гликозидными связями, были получены, в основном, из водорослей семейства *Laminarinaceae*. Подобные полисахариды были выделены также из голотурий и оболочек неоплодотворенных яйцеклеток морских ежей.

Наиболее простую структуру имеют фукоиданы из голотурий *Stichopus horrens* и *Stichopus chloronotus*. Анализ спектров ЯМР показал наличие сигналов с химическими сдвигами  $C1/H1 = 96,0/5,40$ ,  $C2/H2 = 74,0/4,60$ ,  $C3/H3 = 74,9/4,14$ ,  $C4/H4 = 70,2/4,11$ ,  $C5/H5 = 67,4/4,48$ ,  $C6/H6 = 16,2/1,29$  м.д. Их сопоставление с сигналами в спектре  $\alpha$ -L-фукопиранозы показало, что фукоидан состоит из повторяющегося моносахаридного звена  $\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Fucp}-(2\text{SO}_3^-)-(1\rightarrow$  [24,25] (Таблица 1). Фукоидан с аналогичной структурой был получен из яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus franciscanus* [26].

Из одного источника может быть получено несколько разных фукоиданов. Так, из яйцеклеток морских ежей *Strongylocentrotus purpuratus* были выделены два структурно различных фукана. Один состоит из повторяющегося моносахаридного остатка фукозы, сульфатированного при C2 и, иногда, при C4. Другой – из регулярной последовательности трёх остатков фукозы, два из которых сульфатированы при C4 и один – при C4 и C2 [27] (Таблица 1).

Таблица 1 – Структуры фукоиданов. 1→3-связанные фуканы

Источник фукоидана	Структура	Методы ЯМР, использованные при установлении структуры; химические сдвиги, м.д.	Ссылка
1	2	3	4
<i>Saccharina cichorioides</i>	Основная часть: →3)-α-L-Fucp-(2R <sub>1</sub> ,4R <sub>2</sub> )-(1→ R <sub>1</sub> = α-L-Fucp-(2,4R <sub>2</sub> )-(1→2)-; OH; OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> R <sub>2</sub> = OH; OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Минорные компоненты: →4)-α-L-Fucp-(1→	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY:  C1/ C2/ C3/ C4/ C5/ C6/ H1 H2 H3 H4 H5 H6 →3)-α-L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )- (1→ 99,6 68,5 77,3 80,7 67,8 16,8 5,11 3,86 4,03 4,76 4,47 1,26  <sup>1</sup> H:  H1 H2 H3 H4 H5 H6 α-L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) 5,27 3,96 4,59 4,86 4,34 1,27 β-L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) 4,67 3,62 4,36 4,81 3,94 1,31	[28,29]
<i>Alaria angusta</i>	Основная часть: →3)-α-L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→ Минорные компоненты: Gal-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)-Gal; Gal-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)-Gal; Gal-(1→2)-Gal-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ); Fuc-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)-Gal; Gal-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-Fuc-(1→3)-Fuc; Fuc-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-Fuc-(1→4)-Gal	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, HSQC:  C1/ C2/ C3/ C4/ C5/ C6/ H1 H2 H3 H4 H5 H6 →3)-α-L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )- (1→ 99,6 68,5 77,3 80,7 67,8 16,8 5,11 3,86 4,03 4,76 4,47 1,26	[30]
<i>Apostichopus japonicus</i>	→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp- (2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , 4R)-(1→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→ R = α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→	<sup>1</sup> H, COSY, 2D TOCSY, ROESY	[31]
<i>Thelenota ananas</i>	→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α- L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp- (2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	<sup>1</sup> H, COSY, ROESY	[32]

1	2	3	4
<i>Holothuria polii</i>	→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	<sup>1</sup> H, DEPTQ, HSQC, COSY, NOESY C1/ C2/ C3/ C4/ C5/ C6/ H1 H2 H3 H4 H5 H6 →3)-α-L-Fucp-(1→ 99,1 78,3 71,8 69,6 69,4 18,1 5,07 3,96 4,08 4,15 4,40 1,25 →3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→ 96,8 75,9 75,9 69,1 69,3 18,2 5,34 4,52 4,13 3,96 4,46 1,27 →3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→ 100,1 75,9 75,6 71,8 70,1 18,0 5,36 4,53 4,34 4,07 4,31 1,24 →3)-α-L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→ 96,7 77,3 77,0 83,3 69,5 18,5 5,41 4,58 4,37 4,93 4,42 1,28 <sup>1</sup> H, COSY, NOESY	[33]
<i>Ludwigothurea grisea</i>			[15]
<i>Holothuria albiventer</i>	→3)-α-L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(4R)-(1→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→ R = OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (~30%), OH (~70%)	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, ROESY, HSQC, HMBC C1/ C2/ C3/ C4/ C5/ C6/ H1 H2 H3 H4 H5 H6 →3)-α-L-Fucp- 100,5 75,3 76,8 82,4 69,8 17,9 (2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- 5,36 4,46 4,20 4,76 4,36 1,19 →3)-α-L-Fucp- 96,6 77,2 76,4 83,0 69,2 18,1 (2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- 5,33 4,52 4,34 4,86 4,37 1,20 →3)-α-L-Fucp- 97,7 68,8 78,3 70,7/77,3 69,6 17,7 (4R)-(1→3)- 5,01 3,88 3,94 3,90/4,23 4,37 1,21 →3)-α-L-Fucp- 95,8 75,3 76,6 71,8 68,7 17,6 (2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- 5,29 4,50 4,06 4,03 4,26 1,19 →3)-α-L-Fucp- 100,8 69,1 76,9 71,1 68,7 17,8 (1→3)- 5,05 3,80 3,89 3,96 4,25 1,19 →3)-α-L-Fucp- 102,0 69,0 78,1 70,9 69,0 18,0 (1→3)- 5,04 3,77 3,94 3,98 4,48 1,22	[34]



1	2	3	4																																																	
<i>Holothuria tubulosa</i>	→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	<sup>1</sup> H, COSY, 2D TOCSY, ROESY	[36]																																																	
<i>Pearsonothuria graeffei</i>	→3)-α-L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α,β-L-Fucp-(1→	После мягкого кислотного гидролиза: <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, HSQC, HMBC <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>C1/ H1</th> <th>C2/ H2</th> <th>C3/ H3</th> <th>C4/ H4</th> <th>C5/ H5</th> <th>C6/ H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>→3)-α-L-Fucp-(4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→</td> <td>98,6</td> <td>68,5</td> <td>69,8</td> <td>4,55</td> <td></td> <td>15,5</td> </tr> <tr> <td>→3)-α-L-Fucp-(1→</td> <td>5,05</td> <td>3,68</td> <td>3,92</td> <td>80,9</td> <td></td> <td>1,15</td> </tr> <tr> <td>→3)-α-L-Fucp-(1→</td> <td>92,2</td> <td>75,2</td> <td>68,4</td> <td>66,1</td> <td></td> <td>15,3</td> </tr> <tr> <td>→3)-β-L-Fucp-(1→</td> <td>5,16</td> <td>3,83</td> <td>3,97</td> <td>4,09</td> <td></td> <td>1,16</td> </tr> <tr> <td>→3)-β-L-Fucp-(1→</td> <td>96,6</td> <td>76,1</td> <td>68,4</td> <td>70,1</td> <td>69,9</td> <td>15,3</td> </tr> <tr> <td></td> <td>4,55</td> <td>3,94</td> <td>3,69</td> <td>3,51</td> <td>3,61</td> <td>1,20</td> </tr> </tbody> </table>		C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6	→3)-α-L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	98,6	68,5	69,8	4,55		15,5	→3)-α-L-Fucp-(1→	5,05	3,68	3,92	80,9		1,15	→3)-α-L-Fucp-(1→	92,2	75,2	68,4	66,1		15,3	→3)-β-L-Fucp-(1→	5,16	3,83	3,97	4,09		1,16	→3)-β-L-Fucp-(1→	96,6	76,1	68,4	70,1	69,9	15,3		4,55	3,94	3,69	3,51	3,61	1,20	[37]
	C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6																																														
→3)-α-L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	98,6	68,5	69,8	4,55		15,5																																														
→3)-α-L-Fucp-(1→	5,05	3,68	3,92	80,9		1,15																																														
→3)-α-L-Fucp-(1→	92,2	75,2	68,4	66,1		15,3																																														
→3)-β-L-Fucp-(1→	5,16	3,83	3,97	4,09		1,16																																														
→3)-β-L-Fucp-(1→	96,6	76,1	68,4	70,1	69,9	15,3																																														
	4,55	3,94	3,69	3,51	3,61	1,20																																														
<i>Stichopus horrens</i>	→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, ROESY, HSQC, HMBC <table border="1"> <thead> <tr> <th>C1/H1</th> <th>C2/H2</th> <th>C3/H3</th> <th>C4/H4</th> <th>C5/H5</th> <th>C6/H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96,0</td> <td>74,0</td> <td>74,9</td> <td>70,2</td> <td>67,4</td> <td>16,2</td> </tr> <tr> <td>5,40</td> <td>4,60</td> <td>4,14</td> <td>4,11</td> <td>4,48</td> <td>1,29</td> </tr> </tbody> </table>	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6	96,0	74,0	74,9	70,2	67,4	16,2	5,40	4,60	4,14	4,11	4,48	1,29	[25]																															
C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6																																															
96,0	74,0	74,9	70,2	67,4	16,2																																															
5,40	4,60	4,14	4,11	4,48	1,29																																															
<i>Stichopus chloronotus</i>		COSY, TOCSY, HSQC, HMBC после мягкого кислотного гидролиза	[24]																																																	
<i>Lytechinus variegatus</i>	→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	<sup>1</sup> H, COSY, NOESY	[15]																																																	
<i>Strongylocentrotus pallidus</i>	→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, HMQC	[38]																																																	
<i>Acaudina molpadioides</i>	→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	<sup>1</sup> H, COSY, 2D TOCSY, ROESY	[39]																																																	

1	2	3	4
<i>Isostichopus badionotus</i>	→3)-α-L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(1→	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, HMBC, HMQC	[40]
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ,4R)-(1→ R = OH; OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> →3)-α-L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, TOCSY, NOESY	[27]
<i>Analipus japonicus</i>	→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(2R <sub>1</sub> ,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ,4R <sub>2</sub> )-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ,4R <sub>3</sub> )-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ,4R <sub>2</sub> )-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→ R <sub>1</sub> = α-L-Fucp-(1→ R <sub>2</sub> = α-L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→ R <sub>3</sub> = α-L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→ Треть остатков фукозы ацетилирована при C4	После деацетилирования и десульфатирования: <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, HSQC	[41]
<i>Chorda filum</i>	→3)-α-L-Fucp-(2R <sub>1</sub> ,4R <sub>2</sub> )-(1→3)-α-L-Fucp-(2R <sub>1</sub> ,4R <sub>2</sub> )-(1→3)-α-L-Fucp-(2R <sub>1</sub> ,4R <sub>2</sub> )-(2R <sub>3</sub> ,4R <sub>2</sub> )-(1→3)-α-L-Fucp-(2R <sub>1</sub> ,4R <sub>2</sub> )-(1→ R <sub>1</sub> = OH; OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ; OCOCH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> = OH; OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> R <sub>3</sub> = α-L-Fucp-(2R <sub>2</sub> ,4R <sub>2</sub> )-(1→	После деацетилирования и десульфатирования: <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, ROESY, HMQC, HMQC-TOCSY, HMBC	[42]

Фукоидан из голотурии *Holothuria tubulosa* состоит из повторяющегося линейного тетрасахаридного фрагмента, один из остатков фукозы которого сульфатирован не только в положении 2, но и в положении 4:  $\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2,4SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow$  [36] (Таблица 1).

Из так же сульфатированных, но по-другому взаимно расположенных остатков фукозы состоит фукоидан, выделенный из голотурии *Isostichopus badiotus*:  $\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2,4SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow$  [40] (Таблица 1). Следует отметить, что у С3 нессульфатированного остатка фукозы отсутствует характерный сдвиг в сторону слабого поля.

У фукоидана, полученного из яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus pallidus*, каждые два остатка фукозы, сульфатированные при С2, сменяются двумя остатками фукозы, сульфатированными при С4 [38] (Таблица 1).

Фукоидан из голотурии *Thelenota ananas* содержит заметно меньшее количество сульфатных групп, чем описанные выше:  $\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2,4SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow$  [32]. Структура фукоидана из голотурии *Acaudina molpadioides* почти такая же, однако сульфатированные и нессульфатированные остатки фукозы расположены по-другому:  $\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2,4SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow$  [39]. Фукоидан, выделенный из морского ежа *Lytechinus variegatus*, напротив, является более сульфатированным: каждый его остаток содержит сульфат либо при С2, либо при С4, либо при С2 и С4 [15]. При установлении структур этих трёх фукоиданов, а также структуры разветвлённого фукоидана из голотурии *Apostichopus japonicus*, у которого каждый остаток сульфатирован при С2, а к каждому третьему примыкает боковая цепь, состоящая из двух 1 $\rightarrow$ 4-связанных остатков фукозы [31], использовались методы только гомоядерной  $^1\text{H-}^1\text{H}$  спектроскопии ЯМР (Таблица 1).

Однако гораздо чаще структура фукоиданов отличается большей сложностью. В результате исследования фукоидана из голотурии *Holothuria albiventer* с применением десульфатирования и химической деполимеризации была установлена структура входящего в его состав повторяющегося октосахаридного

фрагмента, состоящего из двух остатков  $\alpha$ -L-фукопиранозы, сульфатированных при C2 и C4, двух несulfатированных, одного сульфатированного при C2 и одного с сульфатной группой в 4-м положении, которая присутствовала в каждом третьем таком остатке [34] (Таблица 1). Необходимо отметить, что количество сигналов в аномерной области его углеродного спектра значительно превышает 6, что указывает на ещё большую сложность его структуры.

Сложность структур фукоиданов и слабая разрешённость их сигналов являются распространённой проблемой и зачастую приводят к неоднозначным результатам. Ли с соавторами указывают, что фукоидан из голотурии *Holothuria polii* состоит из повторяющегося линейного тетрасахаридного фрагмента  $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1 $\rightarrow$  [33]. Однако обращает на себя внимание существенное смещение сигнала C2 несulfатированного остатка фукозы в сторону слабого поля при недостаточном смещении в ту же сторону его C3, на который должна приходиться 1 $\rightarrow$ 3-связь. Поскольку сигналы в спектре COSY были слишком близко расположены и/или недостаточно выражены, а сигналы нескольких разных остатков имели одинаковые химические сдвиги, можно предположить неточности в отнесении сигналов. Фукоидан с аналогичной структурой был также получен из голотурии *Ludwigothurea grisea* [15]. В том исследовании были применены только методы гомоядерной <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H спектроскопии (Таблица 1).

Схожая ситуация с фукоиданом из голотурии *Pearsonothuria graeffei*. Ху и др. определили структуру тетрасахаридного фрагмента, полученного в результате мягкого кислотного гидролиза фукоидана, как  $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -L-Fucp-(2,4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ , $\beta$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$  [37]. Однако у остатков, принадлежащих второй половине этого фрагмента, не наблюдается смещение сигналов C3 в слабое поле, которое должна была вызвать гликозидная связь, при этом такое смещение присутствует у углеродного атома C2  $\alpha$ - или  $\beta$ -аномеров фукозы (Таблица 1). Таким образом, требуется дальнейшее уточнение структур этих фукоиданов.

Фукоидан из бурой водоросли *Saccharina cichorioides* представляет собой полисахарид, у которого основную цепь образуют остатки  $\alpha$ -L-фукозы, сульфатированные при C4 и/или C2, а боковые цепи состоят из остатков  $\alpha$ -L-

фукозы, сульфатированных аналогичным образом, и примыкают к основной при C2 [28,29] (Таблица 1). Он также содержит 1→4-связанные остатки несulfатированной фукозы в качестве минорных компонентов.

Фукоидан из водоросли *Alaria angusta* состоит из остатков сульфатированной и ацетилированной фукозы. После автогидролиза образца с помощью ЯМР спектроскопии удалось определить, что сульфатные группы расположены при C4, а моносахаридные остатки связаны между собой 1→3-связями, в качестве минорных компонентов были обнаружены остатки галактозы (C1 = 101,7–103,2, C6 = 61,8) и ацетатные группы (21–22 и 175–176) [30] (Таблица 1). Спектры ЯМР нативного полисахарида не поддавались расшифровке.

Препарат фукоидана, полученный из водоросли *Saccharina latissima*, содержит несколько различных фракций, основной из которых является фукан. Его основная цепь состоит из остатков фукозы, сульфатированных при C4 и C2, а боковые цепи состоят из несulfатированных остатков α-L-фукозы, примыкающих к основной цепи при C2 остатков фукозы, у которых отсутствует сульфатная группа в этом положении [35]. Необходимо отметить, что если у фукоидана из *H. polii* отмечался необъяснимый сдвиг C2 одного из остатков в сторону слабого поля, то у C2 остатка фукоидана из *S. latissima*, к которому примыкает боковая цепь, соответствующего сдвига, напротив, зафиксировано не было. Полисахарид с аналогичной структурой был получен из другой бурой водоросли – *Laminaria bongardiana* [11] (Таблица 1).

У фукоидана из водоросли *Cladosiphon okamuranus* на каждые три остатка основной цепи приходится сульфатная группа при C4. Боковые цепи представляют собой остатки несulfатированной α-L-фукозы и примыкают примерно к каждому третьему-четвёртому остатку основной цепи [43]. Предыдущие исследования также показали, что на каждые 6 остатков фукозы приходится одна ацетатная группа [44].

Исследование фукоидана из водоросли *Chorda filum* методами метилирования и спектроскопии ЯМР показало, что на каждые пять остатков фукозы его основной цепи приходится моносахаридная боковая цепь из остатка фукозы, примыкавшая к основной цепи при C2. Часть остатков фукозы была сульфатирована при C2 и/или C4. Ацетатные группы были расположены при C2 некоторых остатков основной цепи [42,45], (Таблица 1). Следует отметить, что у остатков основной цепи, на

которые приходилось разветвление отсутствовал сдвиг C2 в слабое поле, вызываемый гликозидной связью.

Из водоросли *Analipus japonicus* был получен разветвлённый фукоидан с большим количеством сульфатных и ацетатных групп. На каждые десять остатков фукозы в его основной цепи приходится одна боковая цепь при C2 и три при C4. Все боковые цепи состояли из моносахаридных остатков фукозы. Сульфатные группы были расположены преимущественно при C2, в меньшей степени при C4. Преимущественно при C4 располагались и ацетатные группы [41] (Таблица 1).

### 1.2.2 Фукоиданы с основной цепью, состоящей из 1→4-связанных остатков сульфатированной фукозы

Фукоиданы с такой структурой встречаются крайне редко. Из голотурии *Holothuria fuscopunctata* был получен фукоидан, состоящий из повторяющегося остатка фукозы с сульфатом в положении 3, а из голотурии *T. ananas* – фукоидан, состоявший из повторяющегося остатка фукозы с сульфатом в положении 2 [46] (Таблица 2). Сопоставлению данных их спектров с другими несколько мешает отсутствие калибровочного пика.

Фукоидан, состоящий из повторяющегося фрагмента со структурой  $\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-Fucp}-(2\text{SO}_3^-)-(1\rightarrow$ , был получен из яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus droebachiensis*. Из них был также получен фукоидан с более сложной схемой сульфатирования:  $\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-Fucp}-(2\text{SO}_3^-)-(1\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-Fucp}-(2\text{SO}_3^-)-(1\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow$  [38]. Аналогичный тетрасахаридный фрагмент образует структуру фукоидана, полученного из морского ежа *Arbacia lixula* [47] (Таблица 2).

### 1.2.3 Фукоиданы с основной цепью, состоящей из чередующихся 1→3- и 1→4-связанных остатков сульфатированной фукозы

Из бурой водоросли *Fucus vesiculosus* был получен фукоидан, основной структуры которого является повторяющееся дисахаридное звено  $\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Fucp}-(2\text{SO}_3^-)-(1\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-Fucp}-(2,3\text{SO}_3^-)-(1\rightarrow$  [48]. Его боковые цепи состоят из остатков нессульфатированной фукозы [49] (Таблица 3).

Таблица 2 – Структуры фукоиданов. 1→4-связанные фуканы

Источник фукоидана	Структура	Методы ЯМР, использованные при установлении структуры; химические сдвиги, м.д.	Ссылка
<i>Holothuria fuscopunctata</i>	→4)-α-L-Fucp-(3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, ROESY, HSQC, HMBC C1/H1    C2/H2    C3/H3    C4/H4    C5/H5    C6/H6 103,0    69,9    79,3    80,7    71,2    18,7 5,22    4,20    4,73    4,21    4,62    1,47	[46]
<i>Thelenota ananas</i>	→4)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, ROESY, HSQC, HMBC C1/H1    C2/H2    C3/H3    C4/H4    C5/H5    C6/H6 102,3    78,6    70,1    85,6    71,3    18,4 5,24    4,49    4,20    4,00    4,51    1,30	[46]
<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	→4)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)-α-L-	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, HMQC	[38]
<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> <i>Arbacia lixula</i>	Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)-α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, HMQC  <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, NOESY	[38]  [47]

Таблица 3 – Структуры фукоиданов. 1→3 и 1→4-связанные фуканы

Источник фукоидана	Структура	Методы ЯМР, использованные при установлении структуры; химические сдвиги, м.д.	Ссылка																																																															
1	2	3	4																																																															
<i>Fucus evanescens</i>	<p>Основная часть:  →3)-α-L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 4R<sub>1</sub>)-(1→4)-α-L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, R<sub>2</sub>)-(1→  R<sub>1</sub> = OH; OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>; OCOCH<sub>3</sub>;  R<sub>1</sub> = α-L-Fucp-(1→ (2%)  R<sub>2</sub> = OH; OCOCH<sub>3</sub>  Минорные компоненты:  Xyl-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 4R<sub>3</sub>)-(1→4)-Fuc-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>);  Gal-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 4R<sub>3</sub>)-(1→4)-Gal-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→4)-Fuc-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>);  R<sub>3</sub> = OH; OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>  Fuc-(1→3)-Fuc-(1→4)-Fuc-(1→3)-Fuc-(1→3)-GlcUA</p>	<p>Анализ десульфатированной, деацетиловойанной и одновременно десульфатированной и деацетиловойанной фракций: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, TOCSY, ROESY, NOESY, HSQC, HMBC</p> <table border="1" data-bbox="1265 507 1823 895"> <thead> <tr> <th></th> <th>C1/ H1</th> <th>C2/ H2</th> <th>C3/ H3</th> <th>C4/ H4</th> <th>C5/ H5</th> <th>C6/ H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>→4)-α-L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→3)-</td> <td>94,2</td> <td>76,5</td> <td>68,4</td> <td>83,1</td> <td>68,7</td> <td>16,8</td> </tr> <tr> <td>→4)-α-L-Fucp-(1→3)-</td> <td>5,42</td> <td>4,50</td> <td>4,22</td> <td>3,99</td> <td>4,51</td> <td>1,41</td> </tr> <tr> <td>→4)-α-L-Fucp-(1→3)-</td> <td>96,5</td> <td>69,1</td> <td>70,2</td> <td>81,1</td> <td>68,5</td> <td>16,1</td> </tr> <tr> <td>→4)-α-L-Fucp-(1→3)-</td> <td>5,16</td> <td>4,07</td> <td>4,05</td> <td>3,88</td> <td>4,37</td> <td>1,31</td> </tr> <tr> <td>→3)-α-L-Fucp-(4Ac)-(1→</td> <td>101,0</td> <td>68,0</td> <td>73,8</td> <td>71,0</td> <td>66,1</td> <td>16,0</td> </tr> <tr> <td>→3)-α-L-Fucp-(4Ac)-(1→</td> <td>5,05</td> <td>3,99</td> <td>4,14</td> <td>5,45</td> <td>4,71</td> <td>1,08</td> </tr> <tr> <td>→4)-α-L-Fucp-(3Ac)-(1→</td> <td>97,0</td> <td>66,9</td> <td>72,4</td> <td>77,6</td> <td>68,7</td> <td>16,2</td> </tr> <tr> <td>→4)-α-L-Fucp-(3Ac)-(1→</td> <td>5,18</td> <td>4,12</td> <td>5,30</td> <td>4,11</td> <td>4,45</td> <td>1,36</td> </tr> </tbody> </table>		C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6	→4)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	94,2	76,5	68,4	83,1	68,7	16,8	→4)-α-L-Fucp-(1→3)-	5,42	4,50	4,22	3,99	4,51	1,41	→4)-α-L-Fucp-(1→3)-	96,5	69,1	70,2	81,1	68,5	16,1	→4)-α-L-Fucp-(1→3)-	5,16	4,07	4,05	3,88	4,37	1,31	→3)-α-L-Fucp-(4Ac)-(1→	101,0	68,0	73,8	71,0	66,1	16,0	→3)-α-L-Fucp-(4Ac)-(1→	5,05	3,99	4,14	5,45	4,71	1,08	→4)-α-L-Fucp-(3Ac)-(1→	97,0	66,9	72,4	77,6	68,7	16,2	→4)-α-L-Fucp-(3Ac)-(1→	5,18	4,12	5,30	4,11	4,45	1,36	[23,50-52]
	C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6																																																												
→4)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	94,2	76,5	68,4	83,1	68,7	16,8																																																												
→4)-α-L-Fucp-(1→3)-	5,42	4,50	4,22	3,99	4,51	1,41																																																												
→4)-α-L-Fucp-(1→3)-	96,5	69,1	70,2	81,1	68,5	16,1																																																												
→4)-α-L-Fucp-(1→3)-	5,16	4,07	4,05	3,88	4,37	1,31																																																												
→3)-α-L-Fucp-(4Ac)-(1→	101,0	68,0	73,8	71,0	66,1	16,0																																																												
→3)-α-L-Fucp-(4Ac)-(1→	5,05	3,99	4,14	5,45	4,71	1,08																																																												
→4)-α-L-Fucp-(3Ac)-(1→	97,0	66,9	72,4	77,6	68,7	16,2																																																												
→4)-α-L-Fucp-(3Ac)-(1→	5,18	4,12	5,30	4,11	4,45	1,36																																																												
<i>Ascophyllum nodosum</i> <i>Fucus vesiculosus</i>	→3)-α-L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)-α-L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	<sup>1</sup> H, TOCSY, NOESY, ROESY, HSQC	[48,53]  [54]																																																															

1	2	3	4
<i>Fucus serratus</i>	<p>Основная часть:  <math>\rightarrow 3)</math>-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(2R<sub>1</sub>, 4R<sub>2</sub><sup>a</sup>)-(1<math>\rightarrow</math>4)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 3R<sub>2</sub><sup>a</sup>)-(1<math>\rightarrow</math>            а) R<sub>1</sub> = OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>; R<sub>2</sub> = OH; OCOCH<sub>3</sub>            б) R<sub>1</sub> = OH;            R<sub>2</sub> = <math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>4)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math>3)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math>            Минорные компоненты:  <math>\rightarrow 3)</math>-<math>\beta</math>-Xylp-(1<math>\rightarrow</math></p>	<p>Анализ десульфатированной, деацетиловойанной и одновременно десульфатированной и деацетиловойанной фракций: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, TOCSY, ROESY, NOESY, HSQC, HMBC</p>	[55]
<i>Fucus distichus</i>	<p><math>\rightarrow 3)</math>-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(2,4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math>4)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math></p>	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, ROESY, HSQC	[56,57]

Известно, что водоросль *Fucus evanescens* синтезирует сульфатированный полисахарид, основная цепь которого состоит из чередующихся 2-сульфатированных 1→3- и 1→4-связанных остатков α-L-фукопиранозы. Немногочисленные сульфатные группы расположены при C4 некоторых 1→3-связанных остатков, ацетильные – в третьем положении 1→4-связанных остатков и/или четвёртом положении 1→3-связанных остатков [23]. Исследования методом ферментативной деполимеризации с последующим анализом полученных продуктов при помощи спектроскопии ЯМР показали, что, по крайней мере, 2% фукоидана составляют боковые цепи, состоящие из моносахаридных остатков несulfатированной фукозы [52] (Таблица 3).

Схожую структуру имел фукоидан из водоросли *Coccophora langsdorfii*, сульфатированный при C2 и C4 1→3-связанного остатка фукозы [58]. Из *Fucus distichus* был получен высокорегулярный фукоидан с сульфатами при C2 и C4 1→3-связанного остатка и при C2 1→4-связанного остатка [56,57] (Таблица 3).

Из водоросли *Fucus serratus* был получен разветвлённый фукоидан, боковые цепи которого состоят из трёх остатков фукозы: α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→. Сульфатные группы расположены преимущественно при C2 и в меньшей степени при C4, хотя возможно, что 3,4-дигликозилированные и некоторые концевые остатки фукозы являются несulfатированными. Ацетатные группы присутствуют в четвёртом положении у 1→3-связанных остатков фукозы и в третьем – у 1→4-связанных остатков фукозы [55] (Таблица 3).

Неточность спектров ЯМР и близкое расположение химических сдвигов зачастую приводят к неоднозначным результатам. Так, Ху с соавторами указывают, что основная цепь фукоидана из водоросли *Sargassum fusiforme* состоит преимущественно из соединённых 1→3- и 1→4-связями остатков β-L-фукозы. Однако приведённые ими данные вызывают сомнения в истинности предложенной структуры [59].

При изучении структуры фукана из водоросли *Stoechospermum marginatum* применялись только одномерные методы ЯМР спектроскопии. Было показано, что полученный фукоидан предположительно состоит из остатков α-фукозы, сульфатированных преимущественно при C2 и C4 и соединённых между собой 1→3- и 1→4- гликозидными связями [60], однако эти данные нуждаются в уточнении.

#### 1.2.4 Фукоиданы с основной цепью, состоящей из фукозы и содержащей 1→2-связанные остатки

Фукоидан, полученный из бурой водоросли *Laminaria longipes*, состоял исключительно из остатков фукозы. Основная цепь состояла из трисахаридного повторяющегося фрагмента  $\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow 2)-\alpha\text{-L-Fucp}-(4\text{SO}_3^-)-(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Fucp}-(2\text{SO}_3^-)-(1\rightarrow$  [29]. Необходимо отметить, что у остатка, на который приходится 1→3-связь, сигналы C4 и H4 заметно смещены в сторону слабого поля, причём сдвиг C4 менее значителен, чем характерно для гликозидных связей, либо сульфатных групп в 4-м положении, тогда как сдвиг H4, напротив, сильнее, чем обычно в таких случаях. У другого остатка, на который приходится 1→2-связь, отсутствует характерное смещение C2 в сторону слабого поля (Таблица 4). Таким образом, структура этого фукоидана требует дальнейшего исследования.

Ранее в ряде работ сообщалось о фукоиданах, предположительно содержащих 1→2-связи в основной цепи. Однако эти фукоиданы не были исследованы с помощью современных методов установления структуры. В частности, сообщалось о присутствии 1→2-связей в структуре фукоидана из *F. vesiculosus*, что было опровергнуто более поздними исследованиями [22].

#### 1.2.5 Сульфатированные галактофуканы, содержащие галактозу в основной цепи

Хотя в большинстве случаев фукоиданы бурых водорослей состоят преимущественно из сульфатированной фукозы [22], существует группа полисахаридов, в состав которых входят не только остатки фукозы, но и галактозы. Такие полисахариды называют галактофуканами. В этой группе полисахаридов можно выделить несколько подгрупп:

1. С галактозой в основной цепи.
2. С галактозой в боковых цепях.
3. Полисахариды, содержащие галактозу, положение остатков которой в структуре не установлено.

Наиболее простую структуру имеет галактофукан, выделенный из бурой водоросли *Sargassum thunbergii*. Он состоит из повторяющегося дисахаридного фрагмента, включавшего один остаток фукозы и один – галактозы:  $\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Galp}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-L-Fucp}-(1\rightarrow$  [61] (Таблица 5).

Таблица 4 – Структуры фукоиданов. Фуканы со структурой основной цепи, содержащей 1→2-связи

Источник фукоидана	Структура	Методы ЯМР, использованные при установлении структуры; химические сдвиги, м.д.	Ссылка																																																																													
<i>Laminaria longipes</i>	Основная часть: →4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1→2)- $\alpha$ -L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→ Минорные компоненты: →4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1→4)-; →)- $\alpha$ -L-Fucp-(3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, HSQC, ROESY: <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th></th> <th>C1/ H1</th> <th>C2/ H2</th> <th>C3/ H3</th> <th>C4/ H4</th> <th>C5/ H5</th> <th>C6/ H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>→3)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→4)-</td> <td>98,2</td> <td>76,1</td> <td>75,8</td> <td>74,5</td> <td>68,1</td> <td>16,6</td> </tr> <tr> <td>→2)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→3)-</td> <td>5,40</td> <td>4,55</td> <td>4,27</td> <td>4,55</td> <td>4,33</td> <td>1,26</td> </tr> <tr> <td>→4)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(1→2)-</td> <td>95,2</td> <td>71,5</td> <td>70,1</td> <td>80,3</td> <td>68,3</td> <td>16,6</td> </tr> <tr> <td>→4)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(1→4)-</td> <td>5,32</td> <td>4,12</td> <td>4,44</td> <td>4,90</td> <td>4,52</td> <td>1,38</td> </tr> <tr> <td>→4)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(1→2)-</td> <td>95,5</td> <td>69,5</td> <td>69,6</td> <td>82,1</td> <td>67,4</td> <td>17,0</td> </tr> <tr> <td>→4)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(1→4)-</td> <td>5,16</td> <td>3,85</td> <td>4,08</td> <td>4,64</td> <td>4,47</td> <td>1,31</td> </tr> <tr> <td>→)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→</td> <td>101,3</td> <td>70,1</td> <td>69,6</td> <td>82,2</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,29</td> <td>3,69</td> <td>4,04</td> <td>4,60</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>95,5</td> <td>67,4</td> <td>76,3</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,20</td> <td>4,01</td> <td>4,68</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)-	98,2	76,1	75,8	74,5	68,1	16,6	→2)- $\alpha$ -L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	5,40	4,55	4,27	4,55	4,33	1,26	→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1→2)-	95,2	71,5	70,1	80,3	68,3	16,6	→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1→4)-	5,32	4,12	4,44	4,90	4,52	1,38	→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1→2)-	95,5	69,5	69,6	82,1	67,4	17,0	→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1→4)-	5,16	3,85	4,08	4,64	4,47	1,31	→)- $\alpha$ -L-Fucp-(3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	101,3	70,1	69,6	82,2				5,29	3,69	4,04	4,60				95,5	67,4	76,3					5,20	4,01	4,68				[29]
	C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6																																																																										
→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)-	98,2	76,1	75,8	74,5	68,1	16,6																																																																										
→2)- $\alpha$ -L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	5,40	4,55	4,27	4,55	4,33	1,26																																																																										
→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1→2)-	95,2	71,5	70,1	80,3	68,3	16,6																																																																										
→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1→4)-	5,32	4,12	4,44	4,90	4,52	1,38																																																																										
→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1→2)-	95,5	69,5	69,6	82,1	67,4	17,0																																																																										
→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1→4)-	5,16	3,85	4,08	4,64	4,47	1,31																																																																										
→)- $\alpha$ -L-Fucp-(3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→	101,3	70,1	69,6	82,2																																																																												
	5,29	3,69	4,04	4,60																																																																												
	95,5	67,4	76,3																																																																													
	5,20	4,01	4,68																																																																													

Таблица 5 – Структуры фукоиданов. Галактофуканы с галактозой в основной цепи

Источник фукоидана	Структура	Методы ЯМР, использованные при установлении структуры; химические сдвиги, м.д.	Ссылка																																																															
1	2	3	4																																																															
<i>Saccharina japonica</i>	Основная часть: $\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2,4R)-(1}\rightarrow$ $R = \text{OSO}_3^-; \text{Gal; Glc; Man}$ $\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow;$ $\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, \text{COSY}, \text{HSQC}, \text{HMBC}$ после десульфатирования <table border="1" data-bbox="920 395 1812 762"> <thead> <tr> <th></th> <th>C1/ H1</th> <th>C2/ H2</th> <th>C3/ H3</th> <th>C4/ H4</th> <th>C5/ H5</th> <th>C6/ H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><math>\alpha\text{-L-Fucp-}</math></td> <td>95,7</td> <td>69,4</td> <td>69,7</td> <td>81,7</td> <td>67,4</td> <td>16,1</td> </tr> <tr> <td><math>(4\text{SO}_3^-)\text{-}(1}\rightarrow</math></td> <td>5,10</td> <td>3,87</td> <td>4,09</td> <td>4,63</td> <td>4,44</td> <td>1,24</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 2,3)\text{-}\alpha\text{-L-}</math></td> <td>92,7</td> <td>70,1</td> <td>73,8</td> <td>68,7</td> <td>67,6</td> <td>16,1</td> </tr> <tr> <td><math>\text{Fucp-(1}\rightarrow</math></td> <td>5,39</td> <td>4,12</td> <td>4,22</td> <td>4,13</td> <td>4,25</td> <td>1,25</td> </tr> <tr> <td><math>\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow</math></td> <td>95,7</td> <td>69,1</td> <td>71,1</td> <td>72,9</td> <td>68,3</td> <td>16,1</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,16</td> <td>3,84</td> <td>3,76</td> <td>3,82</td> <td>4,18</td> <td>1,26</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 4,6)\text{-}\beta\text{-D-}</math></td> <td>105,1</td> <td>72,4</td> <td>72,2</td> <td>76,2</td> <td>75,8</td> <td>70,3</td> </tr> <tr> <td><math>\text{Galp-(1}\rightarrow</math></td> <td>4,64</td> <td>3,61</td> <td>3,74</td> <td>4,03</td> <td>3,97</td> <td>3,95</td> </tr> </tbody> </table>		C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6	$\alpha\text{-L-Fucp-}$	95,7	69,4	69,7	81,7	67,4	16,1	$(4\text{SO}_3^-)\text{-}(1}\rightarrow$	5,10	3,87	4,09	4,63	4,44	1,24	$\rightarrow 2,3)\text{-}\alpha\text{-L-}$	92,7	70,1	73,8	68,7	67,6	16,1	$\text{Fucp-(1}\rightarrow$	5,39	4,12	4,22	4,13	4,25	1,25	$\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow$	95,7	69,1	71,1	72,9	68,3	16,1		5,16	3,84	3,76	3,82	4,18	1,26	$\rightarrow 4,6)\text{-}\beta\text{-D-}$	105,1	72,4	72,2	76,2	75,8	70,3	$\text{Galp-(1}\rightarrow$	4,64	3,61	3,74	4,03	3,97	3,95	[62,63]
	C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6																																																												
$\alpha\text{-L-Fucp-}$	95,7	69,4	69,7	81,7	67,4	16,1																																																												
$(4\text{SO}_3^-)\text{-}(1}\rightarrow$	5,10	3,87	4,09	4,63	4,44	1,24																																																												
$\rightarrow 2,3)\text{-}\alpha\text{-L-}$	92,7	70,1	73,8	68,7	67,6	16,1																																																												
$\text{Fucp-(1}\rightarrow$	5,39	4,12	4,22	4,13	4,25	1,25																																																												
$\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow$	95,7	69,1	71,1	72,9	68,3	16,1																																																												
	5,16	3,84	3,76	3,82	4,18	1,26																																																												
$\rightarrow 4,6)\text{-}\beta\text{-D-}$	105,1	72,4	72,2	76,2	75,8	70,3																																																												
$\text{Galp-(1}\rightarrow$	4,64	3,61	3,74	4,03	3,97	3,95																																																												
<i>Saccharina latissima</i>	$\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(3R}_1\text{)-(1}\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galp-}$ $(3R_1, 4R_2)\text{-}(1}\rightarrow$ $R_1 = \text{OH; OSO}_3^-$ $R_2 = \text{OH; OSO}_3^-;$ $R_2 = \beta\text{-D-Galp-(3R}_2\text{)-(1}\rightarrow (20\%);$ $R_2 = \alpha\text{-L-Fucp-(2/3/4SO}_3^-)\text{-}(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-}$ $\text{Galp-(1}\rightarrow (15\%);$ $R_2 = \dots \rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(3R}_1\text{)-(1}\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-}$ $\text{D-Galp-(3R}_1, 4R_3\text{)-(1}\rightarrow (5\%)$ $R_3 = \beta\text{-D-Galp-(3R}_1\text{)-(1}\rightarrow$	После метилирования и десульфатирования: $^1\text{H}, ^{13}\text{C}, \text{COSY},$ $\text{TOCSY}, \text{HSQC}, \text{HMQC-TOCSY}$ <table border="1" data-bbox="920 847 1812 1214"> <thead> <tr> <th></th> <th>C1/ H1</th> <th>C2/ H2</th> <th>C3/ H3</th> <th>C4/ H4</th> <th>C5/ H5</th> <th>C6/ H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><math>\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galp-}</math></td> <td>105,0</td> <td>72,3</td> <td>74,2</td> <td>70,2</td> <td>75,2</td> <td>71,5</td> </tr> <tr> <td><math>(1}\rightarrow</math></td> <td>4,53</td> <td>3,58</td> <td>3,73</td> <td>4,01</td> <td>3,97</td> <td>4,08/3,97</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 4,6)\text{-}\beta\text{-D-Galp-}</math></td> <td>105,0</td> <td>73,1</td> <td>74,8</td> <td>79,4</td> <td>75,2</td> <td>71,5</td> </tr> <tr> <td><math>(1}\rightarrow</math></td> <td>4,54</td> <td>3,66</td> <td>3,83</td> <td>4,22</td> <td>4,03</td> <td>4,08/3,97</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-}</math></td> <td>105,7</td> <td>72,4</td> <td>82,2</td> <td>70,2</td> <td>76,6</td> <td>62,5</td> </tr> <tr> <td><math>(1}\rightarrow</math></td> <td>4,68</td> <td>3,81</td> <td>3,74</td> <td>4,03</td> <td>3,72</td> <td>3,81</td> </tr> <tr> <td><math>\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow</math></td> <td>105,8</td> <td>73,1</td> <td>74,2</td> <td>70,2</td> <td>76,6</td> <td>62,5</td> </tr> <tr> <td></td> <td>4,62</td> <td>3,65</td> <td>3,70</td> <td>3,95</td> <td>3,72</td> <td>3,81</td> </tr> </tbody> </table>		C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6	$\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galp-}$	105,0	72,3	74,2	70,2	75,2	71,5	$(1}\rightarrow$	4,53	3,58	3,73	4,01	3,97	4,08/3,97	$\rightarrow 4,6)\text{-}\beta\text{-D-Galp-}$	105,0	73,1	74,8	79,4	75,2	71,5	$(1}\rightarrow$	4,54	3,66	3,83	4,22	4,03	4,08/3,97	$\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-}$	105,7	72,4	82,2	70,2	76,6	62,5	$(1}\rightarrow$	4,68	3,81	3,74	4,03	3,72	3,81	$\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$	105,8	73,1	74,2	70,2	76,6	62,5		4,62	3,65	3,70	3,95	3,72	3,81	[35]
	C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6																																																												
$\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galp-}$	105,0	72,3	74,2	70,2	75,2	71,5																																																												
$(1}\rightarrow$	4,53	3,58	3,73	4,01	3,97	4,08/3,97																																																												
$\rightarrow 4,6)\text{-}\beta\text{-D-Galp-}$	105,0	73,1	74,8	79,4	75,2	71,5																																																												
$(1}\rightarrow$	4,54	3,66	3,83	4,22	4,03	4,08/3,97																																																												
$\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-}$	105,7	72,4	82,2	70,2	76,6	62,5																																																												
$(1}\rightarrow$	4,68	3,81	3,74	4,03	3,72	3,81																																																												
$\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$	105,8	73,1	74,2	70,2	76,6	62,5																																																												
	4,62	3,65	3,70	3,95	3,72	3,81																																																												
<i>Laminaria bongardiana</i>		После деацетилирования, десульфатирования и частичного кислотного гидролиза: $^1\text{H}, ^{13}\text{C}, \text{ROESY}, \text{HSQC}$	[11]																																																															

1	2	3	4																																																	
<i>Sargassum thunbergii</i>	→4)-α-D-Galp-(1→3)-β-L-Fucp-(1→	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC после метилирования <table border="1" data-bbox="1256 328 1839 552"> <thead> <tr> <th></th> <th>C1/ H1</th> <th>C2/ H2</th> <th>C3/ H3</th> <th>C4/ H4</th> <th>C5/ H5</th> <th>C6/ H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>→3)-β-L-Fucp-(1→</td> <td>100,0</td> <td>69,9</td> <td>75,8</td> <td>70,1</td> <td></td> <td>18,6</td> </tr> <tr> <td></td> <td>4,59</td> <td>3,98</td> <td>3,70</td> <td>3,93</td> <td></td> <td>1,21</td> </tr> <tr> <td>→4)-α-D-Galp-(1→</td> <td>99,9</td> <td>70,1</td> <td>71,4</td> <td>77,9</td> <td></td> <td>63,2</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,06</td> <td>3,91</td> <td>3,70</td> <td>3,82</td> <td></td> <td>3,90</td> </tr> </tbody> </table>		C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6	→3)-β-L-Fucp-(1→	100,0	69,9	75,8	70,1		18,6		4,59	3,98	3,70	3,93		1,21	→4)-α-D-Galp-(1→	99,9	70,1	71,4	77,9		63,2		5,06	3,91	3,70	3,82		3,90	[61]														
	C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6																																														
→3)-β-L-Fucp-(1→	100,0	69,9	75,8	70,1		18,6																																														
	4,59	3,98	3,70	3,93		1,21																																														
→4)-α-D-Galp-(1→	99,9	70,1	71,4	77,9		63,2																																														
	5,06	3,91	3,70	3,82		3,90																																														
<i>Padina boryana</i>	<p>В нативном полисахариде также присутствуют Glu, Man и UA</p> <p>Основная часть:  →4)-α-L-Fucp-(2,3R<sub>1</sub>)(1→3)-β-D-Galp-(2R<sub>1</sub>,4R<sub>2</sub>)-(1→  R<sub>1</sub> = OH; OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>  R<sub>2</sub> = α-L-Fucp-(1→4)-; OH; OSO<sub>3</sub><sup>-</sup></p> <p>Минорные компоненты:  1→3- и/или 1→4-связанные  α-Fucp-α-Fucp и β-Galp-β-Galp</p>	<p>Спектры <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C показали присутствие ацетатов и уруновых кислот. После деацетилирования и десульфатирования: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, HMBC</p> <table border="1" data-bbox="1256 663 1839 967"> <thead> <tr> <th></th> <th>C1/ H1</th> <th>C2/ H2</th> <th>C3/ H3</th> <th>C4/ H4</th> <th>C5/ H5</th> <th>C6/ H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>α-L-Fucp-(1→4)-</td> <td>101,3</td> <td>69,7</td> <td>69,7</td> <td>72,6</td> <td>67,6</td> <td>16,1</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,08</td> <td>3,85</td> <td>3,72</td> <td>3,60</td> <td>4,08</td> <td>1,03</td> </tr> <tr> <td>→4)-α-L-Fucp-(1→3)-</td> <td>96,3</td> <td>69,3</td> <td>69,5</td> <td>79,4</td> <td>67,4</td> <td>16,1</td> </tr> <tr> <td></td> <td>4,90</td> <td>3,82</td> <td>3,75</td> <td>4,03</td> <td>4,11</td> <td>1,04</td> </tr> <tr> <td>→3,4)-β-D-Galp-(1→</td> <td>104,0</td> <td>71,2</td> <td>75,8</td> <td>81,1</td> <td>69,2</td> <td>61,5</td> </tr> <tr> <td></td> <td>4,23</td> <td>3,56</td> <td>3,51</td> <td>3,55</td> <td>3,92</td> <td>3,59</td> </tr> </tbody> </table>		C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6	α-L-Fucp-(1→4)-	101,3	69,7	69,7	72,6	67,6	16,1		5,08	3,85	3,72	3,60	4,08	1,03	→4)-α-L-Fucp-(1→3)-	96,3	69,3	69,5	79,4	67,4	16,1		4,90	3,82	3,75	4,03	4,11	1,04	→3,4)-β-D-Galp-(1→	104,0	71,2	75,8	81,1	69,2	61,5		4,23	3,56	3,51	3,55	3,92	3,59	[64]
	C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6																																														
α-L-Fucp-(1→4)-	101,3	69,7	69,7	72,6	67,6	16,1																																														
	5,08	3,85	3,72	3,60	4,08	1,03																																														
→4)-α-L-Fucp-(1→3)-	96,3	69,3	69,5	79,4	67,4	16,1																																														
	4,90	3,82	3,75	4,03	4,11	1,04																																														
→3,4)-β-D-Galp-(1→	104,0	71,2	75,8	81,1	69,2	61,5																																														
	4,23	3,56	3,51	3,55	3,92	3,59																																														
<i>Sargassum duplicatum</i>	<p>В нативном полисахариде присутствуют сульфатные и ацетатные группы.</p> <p>Основная часть:  →4)-α-L-Fucp-(2,3R<sub>1</sub>)-(1→4)-β-D-Galp-(2,3R<sub>1</sub>,6R<sub>2</sub>)-(1→  R<sub>1</sub> = OH; OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>  R<sub>2</sub> = OH; OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>;  α-L-Fucp-(2,4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→[3)-α-L-Fucp-(2,4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-1→]<sub>n</sub>, разветвления при C2,  n ≥ 5</p>	<p>После деацетилирования и десульфатирования: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, HMBC. Сигналы при 78-85 м.д., по-видимому, соответствуют сульфатным группам при C2 и C3. После десульфатирования увеличилась интенсивность C6 Galp: вероятно, нативный фукоидан частично сульфатирован при C6 Galp.</p> <table border="1" data-bbox="1256 1174 1839 1463"> <thead> <tr> <th></th> <th>C1/ H1</th> <th>C2/ H2</th> <th>C3/ H3</th> <th>C4/ H4</th> <th>C5/ H5</th> <th>C6/ H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>→4)-α-L-Fucp-(1→4)-</td> <td>101,3</td> <td>70,0</td> <td>69,5</td> <td>79,5</td> <td>67,7</td> <td>16,1</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,30</td> <td>3,86</td> <td>3,94</td> <td>3,94</td> <td>4,24</td> <td>1,21</td> </tr> <tr> <td>→4)-β-D-Galp-(1→4)-</td> <td>103,9</td> <td>72,6</td> <td>75,9</td> <td>81,1</td> <td>72,6</td> <td>61,7</td> </tr> <tr> <td></td> <td>4,42</td> <td>3,81</td> <td>3,72</td> <td>3,76</td> <td>4,17</td> <td>3,79</td> </tr> <tr> <td>α-L-Fucp-(1→</td> <td>98,0</td> <td>69,1</td> <td>71,3</td> <td></td> <td></td> <td>16,2</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,15</td> <td>4,13</td> <td>3,77</td> <td></td> <td></td> <td>1,21</td> </tr> </tbody> </table>		C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6	→4)-α-L-Fucp-(1→4)-	101,3	70,0	69,5	79,5	67,7	16,1		5,30	3,86	3,94	3,94	4,24	1,21	→4)-β-D-Galp-(1→4)-	103,9	72,6	75,9	81,1	72,6	61,7		4,42	3,81	3,72	3,76	4,17	3,79	α-L-Fucp-(1→	98,0	69,1	71,3			16,2		5,15	4,13	3,77			1,21	[65]
	C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6																																														
→4)-α-L-Fucp-(1→4)-	101,3	70,0	69,5	79,5	67,7	16,1																																														
	5,30	3,86	3,94	3,94	4,24	1,21																																														
→4)-β-D-Galp-(1→4)-	103,9	72,6	75,9	81,1	72,6	61,7																																														
	4,42	3,81	3,72	3,76	4,17	3,79																																														
α-L-Fucp-(1→	98,0	69,1	71,3			16,2																																														
	5,15	4,13	3,77			1,21																																														

1	2	3	4																																																	
<i>Sargassum feldmannii</i>	<p>Основная часть:  <math>\rightarrow 3</math>)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(2R<sub>1</sub>,4R<sub>2</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>3)-<math>\beta</math>-D-Galp-(2R<sub>2</sub>,4,6R<sub>1</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>;  R<sub>1</sub> = OH; <math>\alpha</math>-L-Fucp-(2,3,4R<sub>2</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>4)-;  R<sub>1</sub> = OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>  R<sub>2</sub> = OH; OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>  Минорные компоненты:  1<math>\rightarrow</math>4-связанные <math>\alpha</math>-L-Fucp-<math>\alpha</math>-L-Fucp и  1<math>\rightarrow</math>3- и/или 1<math>\rightarrow</math>4-связанные <math>\beta</math>-D-Galp-<math>\beta</math>-D-Galp</p>	<p>После деацитилирования и десульфатирования: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, HMBC</p> <table border="1" data-bbox="1265 343 1848 638"> <thead> <tr> <th></th> <th>C1/ H1</th> <th>C2/ H2</th> <th>C3/ H3</th> <th>C4/ H4</th> <th>C5/ H5</th> <th>C6/ H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>4)-</td> <td>101,2</td> <td>69,6</td> <td>69,5</td> <td></td> <td></td> <td>16,3</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,25</td> <td>3,83</td> <td>3,92</td> <td></td> <td></td> <td>1,20</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 3</math>)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>;</td> <td>96,4</td> <td>70,3</td> <td>76,0</td> <td>72,3</td> <td>67,7</td> <td>16,1</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,09</td> <td>4,01</td> <td>3,70</td> <td>3,83</td> <td>4,29</td> <td>1,23</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 4</math>)-<math>\beta</math>-D-Galp-(1<math>\rightarrow</math>3)-</td> <td>105,1</td> <td>72,9</td> <td>74,2</td> <td>78,4</td> <td>69,5</td> <td>61,6</td> </tr> <tr> <td></td> <td>4,62</td> <td>3,67</td> <td>3,75</td> <td>4,18</td> <td>4,03</td> <td>3,78</td> </tr> </tbody> </table>		C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6	$\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 4)-	101,2	69,6	69,5			16,3		5,25	3,83	3,92			1,20	$\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ ;	96,4	70,3	76,0	72,3	67,7	16,1		5,09	4,01	3,70	3,83	4,29	1,23	$\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-	105,1	72,9	74,2	78,4	69,5	61,6		4,62	3,67	3,75	4,18	4,03	3,78	[66]
	C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6																																														
$\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 4)-	101,2	69,6	69,5			16,3																																														
	5,25	3,83	3,92			1,20																																														
$\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ ;	96,4	70,3	76,0	72,3	67,7	16,1																																														
	5,09	4,01	3,70	3,83	4,29	1,23																																														
$\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-	105,1	72,9	74,2	78,4	69,5	61,6																																														
	4,62	3,67	3,75	4,18	4,03	3,78																																														
<i>Sargassum polycystum</i>	<p><math>\rightarrow 3</math>)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math>3)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math>3)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(4R<sub>1</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>2)-<math>\alpha</math>-D-Galp-(4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math>;  <math>\rightarrow 2</math>)-<math>\alpha</math>-D-Galp-(4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math>3)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math>3)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(4R<sub>1</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>2)-<math>\alpha</math>-D-Galp-(4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math>;  <math>\rightarrow 2</math>)-<math>\alpha</math>-D-Galp-(1<math>\rightarrow</math>3)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>2)-<math>\alpha</math>-D-Galp-(1<math>\rightarrow</math>;  R<sub>1</sub> = OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>; <math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>;  R<sub>1</sub> = <math>\beta</math>-D-Galp-(1<math>\rightarrow</math>4)-<math>\alpha</math>-D-Galp-(1<math>\rightarrow</math>;</p>	<p>После десульфатирования: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, TOCSY, ROESY, HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY, HSQC-NOESY</p> <table border="1" data-bbox="1187 790 1848 1085"> <thead> <tr> <th></th> <th>C1/ H1</th> <th>C2/ H2</th> <th>C3/ H3</th> <th>C4/ H4</th> <th>C5/ H5</th> <th>C6/ H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><math>\rightarrow 3,4</math>)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>2)-</td> <td>101,4</td> <td>67,8</td> <td>76,0</td> <td>81,2</td> <td>69,0</td> <td>17,4</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,19</td> <td>3,94</td> <td>3,92</td> <td>3,88</td> <td>4,36</td> <td>1,37</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 2</math>)-<math>\alpha</math>-D-Galp-(1<math>\rightarrow</math>3)-</td> <td>101,2</td> <td>75,8</td> <td>70,2</td> <td>69,6</td> <td>72,7</td> <td>62,5</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,26</td> <td>3,93</td> <td>4,13</td> <td>4,06</td> <td>4,08</td> <td>3,74</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 4</math>)-<math>\alpha</math>-D-Galp-(1<math>\rightarrow</math>4)-</td> <td>101,8</td> <td>68,8</td> <td>68,8</td> <td>79,8</td> <td>72,9</td> <td>62,1</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,30</td> <td>3,86</td> <td>3,95</td> <td>4,24</td> <td>4,00</td> <td>3,82/3,78</td> </tr> </tbody> </table>		C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6	$\rightarrow 3,4$ )- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 2)-	101,4	67,8	76,0	81,2	69,0	17,4		5,19	3,94	3,92	3,88	4,36	1,37	$\rightarrow 2$ )- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-	101,2	75,8	70,2	69,6	72,7	62,5		5,26	3,93	4,13	4,06	4,08	3,74	$\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-	101,8	68,8	68,8	79,8	72,9	62,1		5,30	3,86	3,95	4,24	4,00	3,82/3,78	[67]
	C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6																																														
$\rightarrow 3,4$ )- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 2)-	101,4	67,8	76,0	81,2	69,0	17,4																																														
	5,19	3,94	3,92	3,88	4,36	1,37																																														
$\rightarrow 2$ )- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-	101,2	75,8	70,2	69,6	72,7	62,5																																														
	5,26	3,93	4,13	4,06	4,08	3,74																																														
$\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-	101,8	68,8	68,8	79,8	72,9	62,1																																														
	5,30	3,86	3,95	4,24	4,00	3,82/3,78																																														

1	2	3	4																																																																																																									
<i>Undaria pinnatifida</i>	<p>Основная цепь:  <math>\rightarrow 4</math>)-<math>\beta</math>-Galp-(2R<sub>1</sub>,3R<sub>2</sub>,6R<sub>3</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>  R<sub>1</sub> = OH; OCOCH<sub>3</sub>  R<sub>2</sub> = OH; OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>; OCOCH<sub>3</sub>  R<sub>3</sub> = OH; OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>  Компоненты боковых цепей:  <math>\rightarrow 3</math>)-<math>\alpha</math>-Fucp-(2,4R<sub>3</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>  <math>\rightarrow 6</math>)-<math>\beta</math>-Galp-(2,4R<sub>1</sub>,3R<sub>2</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>  <math>\rightarrow 4</math>)-<math>\alpha</math>-Fucp-(2,3R<sub>3</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>  <math>\rightarrow 3</math>)-<math>\beta</math>-Galp-(2,4R<sub>1</sub>, 6R<sub>3</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>  <math>\beta</math>-Galp-(2,4R<sub>1</sub>,3R<sub>2</sub>,6R<sub>3</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>  <math>\alpha</math>-Fucp-(2,3,4R<sub>3</sub>)-(1<math>\rightarrow</math></p>	<p><sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, TOCSY, ROESY, HSQC, HMBC нативного фукоидана и его десульфатированной и деацетилированной производной</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>C1/ H1</th> <th>C2/ H2</th> <th>C3/ H3</th> <th>C4/ H4</th> <th>C5/ H5</th> <th>C6/ H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><math>\rightarrow 6</math>)-<math>\beta</math>-Galp-(3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math></td> <td>103,4</td> <td>70,8</td> <td>80,9</td> <td>67,5</td> <td>73,7</td> <td>67,1</td> </tr> <tr> <td>(1<math>\rightarrow</math></td> <td>4,63</td> <td>3,56</td> <td>4,27</td> <td>4,19</td> <td>3,97</td> <td>3,94</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 4</math>)-<math>\beta</math>-Galp-(3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math></td> <td>104,8</td> <td>70,0</td> <td>80,7</td> <td>76,6</td> <td>75,3</td> <td>61,6</td> </tr> <tr> <td>(1<math>\rightarrow</math></td> <td>4,61</td> <td>3,63</td> <td>4,24</td> <td>4,35</td> <td>3,54</td> <td>3,64</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 6</math>)-<math>\beta</math>-Galp-(2,4Ac,3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math></td> <td>103,1</td> <td>70,9</td> <td>76,0</td> <td>69,5</td> <td>67,7</td> <td>66,8</td> </tr> <tr> <td>(1<math>\rightarrow</math></td> <td>4,85</td> <td>4,97</td> <td>4,60</td> <td>5,52</td> <td>4,08</td> <td>3,99</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 6</math>)-<math>\beta</math>-Galp-(3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,4Ac)-(1<math>\rightarrow</math></td> <td>104,8</td> <td>69,8</td> <td>78,3</td> <td>69,5</td> <td>67,7</td> <td>66,8</td> </tr> <tr> <td>(1<math>\rightarrow</math></td> <td>4,69</td> <td>3,67</td> <td>4,39</td> <td>5,52</td> <td>4,08</td> <td>3,99</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 6</math>)-<math>\beta</math>-Galp-(2Ac,3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math></td> <td>103,1</td> <td>70,9</td> <td>78,4</td> <td>67,5</td> <td>73,6</td> <td>66,8</td> </tr> <tr> <td>(1<math>\rightarrow</math></td> <td>4,75</td> <td>4,97</td> <td>4,43</td> <td>4,19</td> <td>3,94</td> <td>3,98</td> </tr> <tr> <td><math>\beta</math>-Galp-(2Ac,3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math></td> <td>103,3</td> <td>70,7</td> <td>76,4</td> <td>67,5</td> <td>75,2</td> <td>61,8</td> </tr> <tr> <td>(1<math>\rightarrow</math></td> <td>4,72</td> <td>4,92</td> <td>4,45</td> <td>4,23</td> <td>3,63</td> <td>3,68</td> </tr> <tr> <td><math>\beta</math>-Galp-(3,6SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math></td> <td>104,7</td> <td>61,8</td> <td>80,6</td> <td>67,4</td> <td>73,0</td> <td>67,9</td> </tr> <tr> <td>(1<math>\rightarrow</math></td> <td>4,61</td> <td>3,63</td> <td>4,25</td> <td>4,23</td> <td>3,86</td> <td>4,08</td> </tr> </tbody> </table>		C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6	$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -Galp-(3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	103,4	70,8	80,9	67,5	73,7	67,1	(1 $\rightarrow$	4,63	3,56	4,27	4,19	3,97	3,94	$\rightarrow 4$ )- $\beta$ -Galp-(3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	104,8	70,0	80,7	76,6	75,3	61,6	(1 $\rightarrow$	4,61	3,63	4,24	4,35	3,54	3,64	$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -Galp-(2,4Ac,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	103,1	70,9	76,0	69,5	67,7	66,8	(1 $\rightarrow$	4,85	4,97	4,60	5,52	4,08	3,99	$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -Galp-(3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ,4Ac)-(1 $\rightarrow$	104,8	69,8	78,3	69,5	67,7	66,8	(1 $\rightarrow$	4,69	3,67	4,39	5,52	4,08	3,99	$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -Galp-(2Ac,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	103,1	70,9	78,4	67,5	73,6	66,8	(1 $\rightarrow$	4,75	4,97	4,43	4,19	3,94	3,98	$\beta$ -Galp-(2Ac,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	103,3	70,7	76,4	67,5	75,2	61,8	(1 $\rightarrow$	4,72	4,92	4,45	4,23	3,63	3,68	$\beta$ -Galp-(3,6SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	104,7	61,8	80,6	67,4	73,0	67,9	(1 $\rightarrow$	4,61	3,63	4,25	4,23	3,86	4,08	[68]
	C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6																																																																																																						
$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -Galp-(3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	103,4	70,8	80,9	67,5	73,7	67,1																																																																																																						
(1 $\rightarrow$	4,63	3,56	4,27	4,19	3,97	3,94																																																																																																						
$\rightarrow 4$ )- $\beta$ -Galp-(3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	104,8	70,0	80,7	76,6	75,3	61,6																																																																																																						
(1 $\rightarrow$	4,61	3,63	4,24	4,35	3,54	3,64																																																																																																						
$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -Galp-(2,4Ac,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	103,1	70,9	76,0	69,5	67,7	66,8																																																																																																						
(1 $\rightarrow$	4,85	4,97	4,60	5,52	4,08	3,99																																																																																																						
$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -Galp-(3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ,4Ac)-(1 $\rightarrow$	104,8	69,8	78,3	69,5	67,7	66,8																																																																																																						
(1 $\rightarrow$	4,69	3,67	4,39	5,52	4,08	3,99																																																																																																						
$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -Galp-(2Ac,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	103,1	70,9	78,4	67,5	73,6	66,8																																																																																																						
(1 $\rightarrow$	4,75	4,97	4,43	4,19	3,94	3,98																																																																																																						
$\beta$ -Galp-(2Ac,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	103,3	70,7	76,4	67,5	75,2	61,8																																																																																																						
(1 $\rightarrow$	4,72	4,92	4,45	4,23	3,63	3,68																																																																																																						
$\beta$ -Galp-(3,6SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	104,7	61,8	80,6	67,4	73,0	67,9																																																																																																						
(1 $\rightarrow$	4,61	3,63	4,25	4,23	3,86	4,08																																																																																																						
<i>Spatoglossum schroederi</i>	<p><math>\rightarrow 4</math>)-<math>\beta</math>-Galp-(3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow 4</math>)-<math>\beta</math>-Galp-(2R)-(1<math>\rightarrow</math>  R = OH;  R = <math>\beta</math>-Xylp-(1<math>\rightarrow 4</math>)-<math>\beta</math>-Xylp-(1<math>\rightarrow 4</math>)-<math>\alpha</math>-Fucp-(1<math>\rightarrow 4</math>)-<math>\alpha</math>-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>;  R = <math>\beta</math>-Xylp-(1<math>\rightarrow 4</math>)-<math>\alpha</math>-Fucp-(1<math>\rightarrow 4</math>)-<math>\alpha</math>-Fucp-(1<math>\rightarrow 4</math>)-<math>\alpha</math>-Fucp-(1<math>\rightarrow</math></p>	<p><sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, TOCSY, HMQC, NOESY</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>C1/ H1</th> <th>C2/ H2</th> <th>C3/ H3</th> <th>C4/ H4</th> <th>C5/ H5</th> <th>C6/ H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><math>\rightarrow 2,4</math>)-<math>\beta</math>-Galp-(1<math>\rightarrow</math></td> <td>105,0</td> <td>76,1</td> <td>75,9</td> <td>82,2</td> <td>72,0</td> <td>63,3</td> </tr> <tr> <td>(1<math>\rightarrow</math></td> <td>4,69</td> <td>3,81</td> <td>3,94</td> <td>4,54</td> <td>3,68</td> <td>3,76/3,82</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 4</math>)-<math>\alpha</math>-D-Galp-(3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow</math></td> <td>103,1</td> <td>71,0</td> <td>71,8</td> <td>81,4</td> <td>74,1</td> <td>62,9</td> </tr> <tr> <td>(1<math>\rightarrow</math></td> <td>5,20</td> <td>4,17</td> <td>4,70</td> <td>4,50</td> <td>4,35</td> <td>3,90</td> </tr> </tbody> </table>		C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6	$\rightarrow 2,4$ )- $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$	105,0	76,1	75,9	82,2	72,0	63,3	(1 $\rightarrow$	4,69	3,81	3,94	4,54	3,68	3,76/3,82	$\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-Galp-(3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	103,1	71,0	71,8	81,4	74,1	62,9	(1 $\rightarrow$	5,20	4,17	4,70	4,50	4,35	3,90	[69]																																																																						
	C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6																																																																																																						
$\rightarrow 2,4$ )- $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$	105,0	76,1	75,9	82,2	72,0	63,3																																																																																																						
(1 $\rightarrow$	4,69	3,81	3,94	4,54	3,68	3,76/3,82																																																																																																						
$\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-Galp-(3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	103,1	71,0	71,8	81,4	74,1	62,9																																																																																																						
(1 $\rightarrow$	5,20	4,17	4,70	4,50	4,35	3,90																																																																																																						

Фукоидан из бурой водоросли *Padina boryana* помимо фукозы и галактозы содержит также глюкозу, маннозу и уроновые кислоты, однако являются ли они компонентами основной цепи или боковых цепей, неизвестно. После деацетилирования и десульфатирования фукоидана было установлено, что его основная цепь состоит преимущественно из остатков 1→4-связанной α-L-фукозы и 1→3-связанной β-D-галактозы. К остаткам галактозы в 4-м положении примыкают боковые цепи из одиночных остатков α-L-фукозы [64] (Таблица 5).

Из *Saccharina japonica* был получен ряд фракций фукоидана, результаты исследования которых методами ИК-спектроскопии, метилирования и масс-спектрометрии показали, что в его состав входят 1→3-связанные остатки сульфатированной при С2 и С4 α-L-фукопиранозы с боковыми цепями в виде остатков маннозы, глюкозы и галактозы, а также остатки 1→3- и 1→6-связанной галактозы [62]. Вей и др. исследовали фукоидан из *S. japonica* при помощи спектроскопии ЯМР, предварительно подвергнув его десульфатированию. Основная цепь этого фукоидана состоит преимущественно из 1→3-связанных остатков фукозы, как минимум, частично сульфатированных при С4, к некоторым из которых примыкают при С2 несульфатированные моносахаридные боковые цепи. Также было подтверждено присутствие в составе фукоидана галактозы, однако имеющиеся данные не позволяют однозначно утверждать, относятся ли они к основной цепи или боковым [63]. Следует заметить, что у остатка фукозы, к которому предположительно примыкает боковая цепь, отсутствует заметный сдвиг С2 в сторону слабого поля, который должна была вызвать гликозидная связь (Таблица 5). Также в спектре HSQC присутствует кросс-пик 4,18/77,0, характерный для 1→4-связанных остатков фукозы. Присутствие в составе фукоидана 1→4- и 1→6-связанных остатков галактозы, а также маннозы, было определено лишь на основании сигналов С1/Н1, которые могут быть отнесены и к другим моносахаридным остаткам. Таким образом, структура этого фукоидана требует дальнейшего уточнения.

Из *S. latissima*, помимо описанного выше фукана (Таблица 1), также был получен галактофукан. Его основная цепь состоит из 1→6-связанных остатков β-D-галактопиранозы, к половине из которых примыкали в положении 4 боковые цепи с различной структурой, в том числе содержащие остатки фукозы [35]. Как и в

случае фукана, аналогичный полисахарид был получен из *L. bongardiana* [11], (Таблица 5).

Спектры ЯМР фукоидана из водоросли *Sargassum duplicatum* был слишком сложен для расшифровки. После его деацетилирования и десульфатирования методом спектроскопии ЯМР было установлено, что его основная цепь состоит из чередующихся 1→4-связанных остатков  $\alpha$ -L-фукозы и  $\beta$ -D-галактозы. Методом масс-спектропии также было установлено, что боковые цепи фукоидана представляют собой длинные разветвлённые цепи из 1→3-связанных остатков фукозы с сульфатными группами при C2 и C4 [65] (Таблица 5).

Из чередующихся остатков фукозы и галактозы, но связанных 1→3-связями состоит галактофукан из *Sargassum feldmannii*. Его боковые цепи, примыкающие к основной при C2 (фукоза) и C4, C6 (галактоза), представляют собой одиночные остатки  $\alpha$ -L-фукозы [66] (Таблица 5).

Основная цепь фукоидана, полученного из водоросли *Sargassum polycystum*, состоит преимущественно из 1→3-связанных остатков фукозы с сульфатными группами при C4 и 1→2-связанных остатков  $\alpha$ -D-галактозы – также сульфатированных в 4-м положении. Боковые цепи, примыкающие к некоторым остаткам фукозы, состоят либо из моносахаридных остатков фукозы, либо из 1→4-связанных остатков  $\beta$ - и  $\alpha$ -галактозы [67] (Таблица 5).

Широко распространённая в холодных морях России, Китая, Японии, Кореи, а также в морях Австралии и Новой Зеландии бурая водоросль *Undaria pinnatifida* [70,71] является богатым источником фукоидана [72]. Фукоидан, полученный из её спорофилла, имеет чрезвычайно сложную высокоразветвлённую структуру. Предположительно, его основная цепь состоит из 1→4-связанных сульфатированных и/или ацетилированных остатков  $\beta$ -D-галактозы. В составе боковых цепей присутствуют 1→3- и 1→4-связанные сульфатированные остатки  $\alpha$ -фукозы и 1→3- и 1→6-связанные сульфатированные и/или ацетилированные остатки  $\beta$ -галактозы [68] (Таблица 5).

Из *Spatoglossum schroederi* было получено несколько типов фуканов [73-75]. Одним из них является галактофукан, основная цепь которого состоит из 1→4-связанных частично сульфатированных при C3 остатков  $\beta$ -D-галактозы. Приблизительно на каждый четвёртый такой остаток приходится боковая цепь (как

правило, тетрасахаридная), состоящая из 1→4-связанных сульфатированных при С3 остатков фукозы и одного или двух несulfатированных остатков ксилозы [69] (Таблица 5).

#### 1.2.6 Сульфатированные галактофуканы, содержащие галактозу в боковых цепях

Из галактофуканов, содержащих галактозу в боковых цепях, наиболее простую структуру имел фукоидан, полученный из бурой водоросли *Hizikia fusiformis*. Его основная цепь состоит из 1→3-связанных остатков фукозы, к каждому четвёртому из которых в положении 4 примыкает боковая цепь из двух 1→4-связанных остатков α-L-фукозы или α-D-галактозы [76] (Таблица 6).

Исследования сульфатированного галактофукана, выделенного из водоросли *Saccharina gurjanovae*, показали, что его основная цепь состоит из 1→3-связанных остатков α-L-фукопиранозы с сульфатными группами при С2 и С4. Остатки галактозы, связанные 1→4- либо 1→6-гликозидными связями, формируют боковые цепи, примыкающие к основной при С2 [77] (Таблица 6).

Основная цепь фукоидана из водоросли *Hormophysa cuneiformis* также состоит из 1→3-связанных остатков фукозы. Боковые цепи, состоящие преимущественно из остатков фукозы, примыкают к основной при С4. Кроме того, на периферии молекул также имелись боковые цепи, состоящие из одиночных остатков или 1→6-связанных дисахаридных звеньев галактозы. Сульфатные группы присутствовали в большом количестве, однако их положение установить не удалось [6] (Таблица 6).

Из *U. pinnatifida* был получен частично ацетилированный галактофукан, основная цепь которого состоит из 1→3- и 1→4-связанных остатков α-L-фукопиранозы. Сульфатные группы располагаются преимущественно при С2, в меньшей степени при С4 остатков фукозы и галактозы [78].

Таблица 6 – Структуры фукоиданов. Галактофуканы с галактозой в боковых цепях

Источник фукоидана	Структура	Методы ЯМР, использованные при установлении структуры; химические сдвиги, м.д.	Ссылка
<i>Hizikia fusiformis</i>	$\rightarrow 3)$ - $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(4R)- (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ R = $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ R = $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , COSY, НОНАНА, NOESY, HMQC	[76]
<i>Saccharina gurjanovae</i>	Основная часть: $\rightarrow 3)$ - $\alpha$ -L-Fucp-(2R <sub>1</sub> ,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$ R <sub>1</sub> = OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ; $\rightarrow 4)$ -Galp-(2,3R <sub>2</sub> )-(1 $\rightarrow$ ; $\rightarrow 6)$ -Galp-(2,3R <sub>2</sub> )-(1 $\rightarrow$ R <sub>2</sub> = OH; OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Минорные компоненты: $\rightarrow 3)$ -Galp-(2,3R <sub>2</sub> )-(1 $\rightarrow$	$^{13}\text{C}$ после автогидролиза: $\rightarrow 3)$ - $\alpha$ -L-Fucp-                    C1    C2    C3    C4    C5    C6 (4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$ 99,7   67,9   77,5   81,0   68,4   16,8	[77]

1	2	3	4																																																																																																																														
<i>Hormophysa cuneiformis</i>	<p>Основная часть:  <math>\rightarrow 3</math>)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(4R)-(1<math>\rightarrow</math>  R = <math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>4)-  Боковые цепи на периферии молекул:  <math>\beta</math>-Galp-(1<math>\rightarrow</math>6)-<math>\beta</math>-Galp-(1<math>\rightarrow</math>4)-;  <math>\alpha</math>-Galp-(1<math>\rightarrow</math>4)-  Фукоидан содержит значительное  количество сульфатных групп,  расположение которых не  установлено.</p>	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , TOCSY, HSQC-TOCSY, ROESY, HSQC-NOESY, HMBC после десульфатирования: <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>C1/ H1</th> <th>C2/ H2</th> <th>C3/ H3</th> <th>C4/ H4</th> <th>C5/ H5</th> <th>C6/ H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><math>\alpha</math>-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>3)-</td> <td>96,3</td> <td>69,3</td> <td>70,9</td> <td>73,2</td> <td>67,7</td> <td>16,5</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,08</td> <td>3,84</td> <td>3,97</td> <td>3,83</td> <td>4,32</td> <td>1,24</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 3</math>)-<math>\alpha</math>-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>3)-</td> <td>96,8</td> <td>67,6</td> <td>76,2</td> <td>69,7</td> <td>67,8</td> <td>16,5</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,12</td> <td>3,97</td> <td>4,03</td> <td>4,05</td> <td>4,32</td> <td>1,25</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 3</math>)-<math>\alpha</math>-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>3)-(разв.,4)</td> <td>97,0</td> <td>68,0</td> <td>76,8</td> <td>69,0</td> <td>67,8</td> <td>16,5</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,18</td> <td>3,95</td> <td>3,96</td> <td>3,94</td> <td>4,32</td> <td>1,25</td> </tr> <tr> <td><math>\alpha</math>-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>4)-</td> <td>101,9</td> <td>70,1</td> <td>70,5</td> <td>73,2</td> <td>67,7</td> <td>16,5</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,05</td> <td>3,84</td> <td>3,99</td> <td>3,83</td> <td>4,32</td> <td>1,24</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 3</math>)-<math>\alpha</math>-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>3)-</td> <td>96,7</td> <td>68,3</td> <td>76,1</td> <td>80,0</td> <td>69,3</td> <td>17,2</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,16</td> <td>4,06</td> <td>4,06</td> <td>4,10</td> <td>4,37</td> <td>1,37</td> </tr> <tr> <td><math>\beta</math>-Galp-(1<math>\rightarrow</math>6)</td> <td>104,6</td> <td>72,1</td> <td>74,0</td> <td>70,1</td> <td>76,3</td> <td>62,5</td> </tr> <tr> <td></td> <td>4,48</td> <td>3,56</td> <td>3,68</td> <td>3,98</td> <td>3,73</td> <td>3,80</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 6</math>)-<math>\beta</math>-Galp-(1<math>\rightarrow</math>4)-</td> <td>104,4</td> <td>72,1</td> <td>74,0</td> <td>70,1</td> <td>75,0</td> <td>70,6</td> </tr> <tr> <td></td> <td>4,45</td> <td>3,56</td> <td>3,68</td> <td>3,98</td> <td>3,90</td> <td>4,05</td> </tr> <tr> <td><math>\alpha</math>-Galp-(1<math>\rightarrow</math>4)-</td> <td>101,7</td> <td>70,2</td> <td>70,9</td> <td>70,7</td> <td>72,8</td> <td>62,3</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,30</td> <td>3,85</td> <td>3,95</td> <td>4,02</td> <td>4,10</td> <td>3,81</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>3,81</td> </tr> </tbody> </table>		C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6	$\alpha$ -Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-	96,3	69,3	70,9	73,2	67,7	16,5		5,08	3,84	3,97	3,83	4,32	1,24	$\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-	96,8	67,6	76,2	69,7	67,8	16,5		5,12	3,97	4,03	4,05	4,32	1,25	$\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-(разв.,4)	97,0	68,0	76,8	69,0	67,8	16,5		5,18	3,95	3,96	3,94	4,32	1,25	$\alpha$ -Fucp-(1 $\rightarrow$ 4)-	101,9	70,1	70,5	73,2	67,7	16,5		5,05	3,84	3,99	3,83	4,32	1,24	$\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-	96,7	68,3	76,1	80,0	69,3	17,2		5,16	4,06	4,06	4,10	4,37	1,37	$\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 6)	104,6	72,1	74,0	70,1	76,3	62,5		4,48	3,56	3,68	3,98	3,73	3,80	$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-	104,4	72,1	74,0	70,1	75,0	70,6		4,45	3,56	3,68	3,98	3,90	4,05	$\alpha$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-	101,7	70,2	70,9	70,7	72,8	62,3		5,30	3,85	3,95	4,02	4,10	3,81							3,81	[6]
	C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6																																																																																																																											
$\alpha$ -Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-	96,3	69,3	70,9	73,2	67,7	16,5																																																																																																																											
	5,08	3,84	3,97	3,83	4,32	1,24																																																																																																																											
$\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-	96,8	67,6	76,2	69,7	67,8	16,5																																																																																																																											
	5,12	3,97	4,03	4,05	4,32	1,25																																																																																																																											
$\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-(разв.,4)	97,0	68,0	76,8	69,0	67,8	16,5																																																																																																																											
	5,18	3,95	3,96	3,94	4,32	1,25																																																																																																																											
$\alpha$ -Fucp-(1 $\rightarrow$ 4)-	101,9	70,1	70,5	73,2	67,7	16,5																																																																																																																											
	5,05	3,84	3,99	3,83	4,32	1,24																																																																																																																											
$\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-	96,7	68,3	76,1	80,0	69,3	17,2																																																																																																																											
	5,16	4,06	4,06	4,10	4,37	1,37																																																																																																																											
$\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 6)	104,6	72,1	74,0	70,1	76,3	62,5																																																																																																																											
	4,48	3,56	3,68	3,98	3,73	3,80																																																																																																																											
$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-	104,4	72,1	74,0	70,1	75,0	70,6																																																																																																																											
	4,45	3,56	3,68	3,98	3,90	4,05																																																																																																																											
$\alpha$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-	101,7	70,2	70,9	70,7	72,8	62,3																																																																																																																											
	5,30	3,85	3,95	4,02	4,10	3,81																																																																																																																											
						3,81																																																																																																																											

*Сульфатированные галактофуканы с неустановленным положением галактозы*

Фукоиданы, полученные из бурой водоросли *Eisenia bicyclis*, представляют собой сульфатированные и ацетилированные гетерополисахариды, содержащие 1→3-связанные остатки фукозы, 1→6-, 1→2- и 1→4-связанные остатки галактозы, а также остатки маннозы, ксилозы и глюкозы в качестве минорных компонентов [79,80].

Сульфатированный и ацетилированный галактофукан из бурой водоросли *Costaria costata* состоит преимущественно из сульфатированных при С2 и в меньшей степени при С4 1→3-связанных остатков фукозы, а также из коротких фрагментов, состоящих из остатков галактозы, сульфатированных при С2 или С6 [81]. Галактофукан из водоросли *Saccharina longicruris* содержит структурные фрагменты, состоящие из остатков сульфатированной при С4 фукозы, связанных 1→3-связями, а также остатков галактозы, тоже частично сульфатированных при С4 и связанных 1→6- и 1→4,6- гликозидными связями [82].

Разветвлённый фукоидан был выделен из бурой водоросли *Ecklonia kurome*. Фукоидан состоит преимущественно из остатков фукозы, связанных 1→3-связями, также в его составе присутствуют остатки фукозы, соединённые 1→4- и 1→2-связями. Сульфатные группы расположены, в основном, в положении 4. Кроме того, в составе фукоидана были обнаружены остатки галактопиранозы, связанные различными гликозидными связями [83].

Из водоросли *Sargassum mcclurei* было получено несколько фукоиданов. Структура наиболее изученного из них состоит из основной цепи, состоящей преимущественно из 1→3-связанных остатков фукозы, сульфатированных при С2 и С4, а также, по-видимому, включающей фрагменты →4)-α-L-Fucp-(3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→ и 1→6-связанные остатки β-D-галактозы. Боковые цепи предположительно состоят из концевых остатков галактозы и/или чередующихся 1→3-связанных остатков фукозы и 1→4-связанных остатков галактозы. Как и остатки фукозы, остатки галактозы сульфатированы при С2 и С4, а кроме того, частично при С6 и, возможно, при С3 [84].

В фукоидане, выделенном из водоросли *Sargassum trichophyllum*, были обнаружены фрагменты, состоящие из 1→3- и 1→4-связанных остатков фукозы и концевых, 1→2- и 1→6-связанных остатков галактозы. Содержание сульфатных групп составляло 23,5% [85].

### 1.2.7 Фукоиданы сложного состава

Основу сульфатированного фукана, выделенного из водоросли *Padina tetrastratica*, составляют остатки  $\alpha$ -фукопиранозы, связанные 1 $\rightarrow$ 2- и 1 $\rightarrow$ 3-связями и частично сульфатированные в положении 2 и 4. К ней примыкают боковые цепи, состоящие из остатков фукозы и ксилозы (одна цепь на каждые два остатка) [86].

Из водоросли *Ascophyllum nodosum* был получен фукоидан, основной структуры которого является повторяющееся дисахаридное звено  $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1 $\rightarrow$  [48]. Помимо фукозы (52,1%) он также содержит значительное количество галактозы (6,1%), глюкозы (21,3%) и ксилозы (16,5%) [53].

Сульфатированный ксилофукан был получен из водоросли *Punctaria plantaginea*. Его основная цепь состоит из 1 $\rightarrow$ 3-связанных остатков  $\alpha$ -L-фукозы, две трети которых содержат сульфатные группы в положении 2, а остатки несulfатированной  $\beta$ -D-ксилозы образуют боковые цепи, примыкающие к остаткам основной цепи при C4 [87] (Таблица 7).

Фукоидан, состоящий из фукозы и глюкуроновой кислоты, был выделен из водоросли *Chordaria flagelliformis*. В отличие от большинства фукоиданов, фукоза в нём присутствует не только в пиранозной, но и в фуранозной форме. Основную его цепь образуют 1 $\rightarrow$ 3-связанные остатки  $\alpha$ -L-фукопиранозы. Примерно треть из них гликозилирована при C2 остатками  $\alpha$ -D-глюкопиранозилуруновой кислоты, примерно половина которых гликозилирована при C4 моносахаридными или 1 $\rightarrow$ 2-связанными дисахаридным остатками  $\alpha$ -L-фукофуранозы. Остатки фукофуранозы моно- и дисульфатированы в разных положениях. Некоторое количество сульфатных групп также присутствует при C2 и C4 остатков фукопиранозы, образующих основную цепь, они также частично ацетилированы при C4 [10] (Таблица 7).

Таблица 7 – Структуры фукоиданов. Фукоиданы сложного состава

Источник фукоидана	Структура	Методы ЯМР, использованные при установлении структуры; химические сдвиги, м.д.	Ссылка																																																								
<i>Spatoglossum schroederi</i>	Основная цепь: $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -GlcUA-(1 $\rightarrow$ Боковые цепи: $\alpha$ -Fuc-(2R <sub>1</sub> ,4R <sub>2</sub> )-(1 $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -Fuc- (2R <sub>1</sub> ,4R <sub>2</sub> )-(1 $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -Fuc-(2R <sub>1</sub> ,4R <sub>2</sub> )- (1 $\rightarrow 4$ )- R <sub>1</sub> = OH; $\beta$ -Xyl-(1 $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -Xyl-(1 $\rightarrow$ R <sub>2</sub> = OH; OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ;	<sup>13</sup> C. Данные отнесли следующим образом: $\beta$ -GlcUA: 105,0 (C1), 75,2 (C3), 80,0 (C4), 175,0 (C6); $\alpha$ -L-Fuc: 98,2-98,4 (C1), 17,0 (C6); $\beta$ -Xyl: 99,0 (C1). <sup>1</sup> H. Данные отнесли следующим образом: $\alpha$ -L-Fuc: 5,00 (H1); $\beta$ -D-Xyl: 4,65. <sup>13</sup> C после кислотного гидролиза: $\beta$ -GlcUA: 105 (C1), 86 (C2), 73 (C3), 76 (C4), 177 (C6)	[73]																																																								
<i>Punctaria plantaginea</i>	Основная цепь: $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -L- Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ Боковые цепи: $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow 4$ )-	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, HSQC, ROESY, HMBC после десульфатирования.	[87]																																																								
<i>Chordaria flagelliformis</i>	Основная часть: $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -Fucp-(2R <sub>1</sub> ,4R <sub>2</sub> )-(1 $\rightarrow \dots \rightarrow 3$ )- $\alpha$ - Fucp-(2R <sub>2</sub> ,4Ac)-(1 $\rightarrow$ R <sub>1</sub> = OH; OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ; $\alpha$ -D-GlcUAp-(1 $\rightarrow$ ; R <sub>1</sub> = $\alpha$ -L-Fucf-(1 $\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-GlcUAp- (1 $\rightarrow$ ; R <sub>1</sub> = $\alpha$ -L-Fucf-(1 $\rightarrow 2$ )- $\alpha$ -L-Fucf-(1 $\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-GlcUAp-(1 $\rightarrow$ R <sub>2</sub> = OH; OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, TOCSY, HSQC, HMQC-TOCSY, ROESY, HMBC после десульфатирования. <table border="1" data-bbox="1232 989 1814 1356"> <thead> <tr> <th></th> <th>C1/ H1</th> <th>C2/ H2</th> <th>C3/ H3</th> <th>C4/ H4</th> <th>C5/ H5</th> <th>C6/ H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><math>\alpha</math>-D-GlcUAp-(1<math>\rightarrow 2</math>)-</td> <td>100,8</td> <td>72,2</td> <td>74,1</td> <td>72,7</td> <td>73,5</td> <td>176,0</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 4</math>)-<math>\alpha</math>-D-GlcUAp-</td> <td>100,8</td> <td>72,7</td> <td>73,1</td> <td>81,4</td> <td>72,9</td> <td>176,0</td> </tr> <tr> <td>(1<math>\rightarrow 2</math>)-</td> <td>5,29</td> <td>3,70</td> <td>3,80</td> <td>3,60</td> <td>4,10</td> <td></td> </tr> <tr> <td><math>\alpha</math>-L-Fucf-(1<math>\rightarrow 4</math>)-</td> <td>103,5</td> <td>77,7</td> <td>75,9</td> <td>86,2</td> <td>68,2</td> <td>19,8</td> </tr> <tr> <td><math>\rightarrow 2</math>)-<math>\alpha</math>-L-Fucf-</td> <td>5,02</td> <td>4,08</td> <td>4,08</td> <td>3,63</td> <td>3,91</td> <td>1,22</td> </tr> <tr> <td>(1<math>\rightarrow 4</math>)-</td> <td>101,0</td> <td>81,7</td> <td>73,5</td> <td>85,4</td> <td>68,0</td> <td>19,8</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5,14</td> <td>4,21</td> <td>4,21</td> <td>3,65</td> <td>3,91</td> <td>1,23</td> </tr> </tbody> </table>		C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6	$\alpha$ -D-GlcUAp-(1 $\rightarrow 2$ )-	100,8	72,2	74,1	72,7	73,5	176,0	$\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-GlcUAp-	100,8	72,7	73,1	81,4	72,9	176,0	(1 $\rightarrow 2$ )-	5,29	3,70	3,80	3,60	4,10		$\alpha$ -L-Fucf-(1 $\rightarrow 4$ )-	103,5	77,7	75,9	86,2	68,2	19,8	$\rightarrow 2$ )- $\alpha$ -L-Fucf-	5,02	4,08	4,08	3,63	3,91	1,22	(1 $\rightarrow 4$ )-	101,0	81,7	73,5	85,4	68,0	19,8		5,14	4,21	4,21	3,65	3,91	1,23	[10]
	C1/ H1	C2/ H2	C3/ H3	C4/ H4	C5/ H5	C6/ H6																																																					
$\alpha$ -D-GlcUAp-(1 $\rightarrow 2$ )-	100,8	72,2	74,1	72,7	73,5	176,0																																																					
$\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-GlcUAp-	100,8	72,7	73,1	81,4	72,9	176,0																																																					
(1 $\rightarrow 2$ )-	5,29	3,70	3,80	3,60	4,10																																																						
$\alpha$ -L-Fucf-(1 $\rightarrow 4$ )-	103,5	77,7	75,9	86,2	68,2	19,8																																																					
$\rightarrow 2$ )- $\alpha$ -L-Fucf-	5,02	4,08	4,08	3,63	3,91	1,22																																																					
(1 $\rightarrow 4$ )-	101,0	81,7	73,5	85,4	68,0	19,8																																																					
	5,14	4,21	4,21	3,65	3,91	1,23																																																					

1	2	3	4
<i>Hizikia fusiforme</i>	<p>Основная часть:  <math>\rightarrow 2</math>)-<math>\alpha</math>-D-Manp-(3R<sub>1</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>  <math>\rightarrow 4</math>)-<math>\beta</math>-D-GlcUAp-(1<math>\rightarrow</math>  R<sub>1</sub> = OH; <math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>;  R<sub>1</sub> = <math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow 3</math>)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>;  R<sub>1</sub> = <math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow 4</math>)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>;  R<sub>1</sub> = <math>\alpha</math>-D-Xylp-(1<math>\rightarrow 4</math>)-<math>\alpha</math>-D-Xylp-(1<math>\rightarrow</math>;  R<sub>1</sub> = <math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow 2</math>)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow 3</math>)-  <math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow</math>  Минорные компоненты:  <math>\rightarrow 4</math>)-<math>\beta</math>-D-Galp-(2R<sub>2</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>  R<sub>1</sub> = OH; <math>\beta</math>-D-Galp-(1<math>\rightarrow 6</math>)-<math>\beta</math>-D-Galp-  (2R<sub>3</sub>)-(1<math>\rightarrow 6</math>)-<math>\beta</math>-D-Galp-(2R<sub>4</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>  R<sub>3</sub> = <math>\alpha</math>-D-Xylp-(1<math>\rightarrow</math>  R<sub>4</sub> = <math>\beta</math>-D-Galp-(1<math>\rightarrow</math></p>	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, HSQC, HMBC	[88]
<i>Cladosiphon okamuranus</i>	<p><math>\rightarrow 3</math>)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow 3</math>)-<math>\alpha</math>-L-  Fucp-(4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1<math>\rightarrow 3</math>)-<math>\alpha</math>-L-Fucp-(1<math>\rightarrow 3</math>)-  <math>\alpha</math>-L-Fucp-(2R)-(1<math>\rightarrow</math>  R = OH; <math>\alpha</math>-D-GlcUAp-(1<math>\rightarrow</math></p>	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, НОНАНА, HSQC, HMBC после воздействия фукоиданазой из морской бактерии <i>Fucophilus fucoidanolyticus</i>	[89]
<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	<p><math>\rightarrow 4</math>)-<math>\beta</math>-D-GlcUAp-(1<math>\rightarrow 2</math>)-<math>\alpha</math>-D-Manp-  (3R<sub>1</sub>,6R<sub>2</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>  R<sub>1</sub> = <math>\alpha</math>-L-Fucp-(2,3,4R<sub>2</sub>)-(1<math>\rightarrow</math>  R<sub>2</sub> = OH; OSO<sub>3</sub><sup>-</sup></p>	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, COSY, НОНАНА, HSQC, HMBC	[90]

Восемьдесят процентов фукоиданов, полученных из водоросли *Spatoglossum schroederi*, составляет полисахарид, основная цепь которого состоит из  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-связанных остатков глюкуроновой кислоты с ответвлениями  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-связанных трисахаридов фукозы при C4. Большинство остатков фукозы сульфатировано при C4, а некоторые замещены при C2  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-связанными дисахаридами ксилозы, 50% которых, в свою очередь, сульфатировано [73]. Следует отметить, что данный фукоидан был исследован только методами одномерной спектроскопии ЯМР и не включал анализ интегральных интенсивностей пиков. Часть химических сдвигов может соответствовать и сигналам других протонов/углеродов, например, 4,65 – сульфату  $\alpha$ -L-фукозы при C2. Структура этого фукоидана также требует дальнейшего изучения.

В результате воздействия на фукоидан из *S. okamuranus* фукоиданазой из морской бактерии *Fucophilus fucoidanolyticus* был получен ряд олигосахаридов со схожей структурой. Основная цепь каждого из них состоит из 1 $\rightarrow$ 3-связанных остатков  $\alpha$ -L-фукозы, что согласуется с другими исследованиями [43,44]. Эти олигосахариды также содержат значительное количество остатков галактурановой кислоты, предположительно примыкающих к основной цепи при C2 примерно каждого четвёртого остатка [89] (Таблица 7). Примечательно, что у сигналов ядер  $^{13}\text{C}$ , принадлежащих предположительно гликозилированным C2 остатков фукозы отсутствуют характерные сдвиги в сторону слабого поля.

Путём комбинации метода ферментативной деполимеризации (с применением ферментов, выделенных из морской бактерии *Fucobacter marina*) и частичного кислотного гидролиза была установлена структура фукоидана из бурой водоросли *Saccharina sculpera* (*Kjellmaniella crassifolia*). Основная его цепь состояла из 1 $\rightarrow$ 2-связанных остатков  $\alpha$ -D-маннозы, часть которых была сульфатирована при C6, и 1 $\rightarrow$ 4-связанных остатков  $\beta$ -D-глюкуроновой кислоты. Остатки сульфатированной фукозы образовывали его боковые цепи [90] (Таблица 7).

Фукоидан, основная цепь которого преимущественно состоит из остатков  $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$  и  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcUAp-(1 $\rightarrow$ , а также небольшого количества остатков  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ , был получен из водоросли *Hizikia fusiforme*. Разветвлённые боковые цепи, состоящие из остатков фукозы или ксилозы, примыкают к основной при C3 остатков маннозы, а состоящие из 1 $\rightarrow$ 6-связанных

остатков галактозы примыкают к ней при С2 остатков галактозы (Таблица 7). Сульфатные группы присутствуют у остатков фукозы, маннозы и галактозы. Необходимо отметить, что, как указывают авторы, предложенная структура является лишь одной из возможных [88].

Остатки фукозы входят в состав боковых цепей и фукоидана, выделенного из водоросли *Sargassum stenophyllum*. Основную его цепь образуют остатки галактозы и маннозы, а боковые цепи также включают остатки глюкуроновой кислоты, ксилозы и глюкозы [91]. Следует заметить, что при исследовании данного фукоидана методами ЯМР были использованы только методы одномерной спектроскопии.

Одним из фукоиданов, выделенных из водоросли *Costaria costata*, был разветвлённый сульфатированный гетерополисахарид с высоким содержанием фукозы и значительным количеством маннозы, глюкуроновой кислоты и галактозы. Предположительно, его основная цепь состоит из остатков маннозы и глюкуроновой кислоты, а фукоза и галактоза содержатся преимущественно в боковых цепях [81].

Полисахарид со структурой, похожей на фукоидан, был получен из бактерии *Vadicella arenosi*. Он состоит из остатков  $\alpha$ -фукопиранозы, соединённых 1→3-гликозидными связями. Но, в отличие от фукоиданов, остатки фукозы, образующие этот полисахарид, являются D-изомерами [92] (Таблица 8).

Таблица 8 – Полисахариды с похожей на фукоиданы структурой

Источник фукоидана	Структура	Методы ЯМР, использованные при установлении структуры; химические сдвиги, м.д.	Ссылка																		
Фуканоподобный полисахарид из бактерии <i>Vadicella arenosi</i>	$\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Fucp}-(2\text{SO}_3^-)-(1\rightarrow$	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , COSY, TOCSY, ROESY, HSQC, HMBC после мягкого кислотного гидролиза, приведшего к потере сульфатных групп <table border="1" data-bbox="936 384 1800 496"> <thead> <tr> <th>C1/H1</th> <th>C2/H2</th> <th>C3/H3</th> <th>C4/H4</th> <th>C5/H5</th> <th>C6/H6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96,9</td> <td>75,8</td> <td>70,3</td> <td>68,6</td> <td>68,5</td> <td>16,7</td> </tr> <tr> <td>5,41</td> <td>4,58</td> <td>4,26</td> <td>3,95</td> <td>4,24</td> <td>1,31</td> </tr> </tbody> </table>	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6	96,9	75,8	70,3	68,6	68,5	16,7	5,41	4,58	4,26	3,95	4,24	1,31	[92]
C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6																
96,9	75,8	70,3	68,6	68,5	16,7																
5,41	4,58	4,26	3,95	4,24	1,31																

### 1.3. Использование фукоиданов для конструирования наночастиц

#### 1.3.1 Общие сведения

В последнее десятилетие интенсивное развитие получила персонализированная медицина, определяемая как «подходящее лекарство подходящему пациенту в подходящее время» [93,94]. Наносистемы, такие как наночастицы, полимеры-носители, нанотрубки, мицеллы и липосомы, обладают особыми свойствами, зависящими от размера. Вот уже более полувека их изучают как терапевтические и диагностические агенты.

Перспективность наночастиц для медицинских целей связана с их способностью эффективно адсорбировать и переносить другие соединения к мишеням [95]. Важным свойством наночастиц является отношение поверхности к массе, которое значительно превышает таковое у других типов частиц, благодаря чему они способны эффективно связываться с другими соединениями, такими как низкомолекулярные соединения, зонды и белки, связывать и переносить их. В отличие от более крупных частиц (микроразмера), наночастицы способны легко проникать в нужные области. Их поверхность может содержать лиганды для связывания с целевыми рецепторами. Таким образом, они могут доставлять лекарственные препараты, применяться в диагностике *in vitro* и *in vivo*, выступать в качестве нутрицевтиков и улучшенных биосовместимых материалов. Не все частицы, используемые в медицинских целях, имеют размер менее 100 нм, однако это не обязательно влияет на их функциональность. Для доставки лекарств требуются сравнительно большие наночастицы, которые можно нагрузить достаточным количеством действующих веществ.

Использование для контролируемого введения лекарственного средства полиэлектролитных комплексов из противоположно заряженных макромолекул привлекает особое внимание, поскольку процесс их получения несложный для реализации и обычно проводится в мягких условиях. Формирование комплексов осуществляется путём физического связывания, через электростатические взаимодействия, что позволяет исключить появление токсичности, связанной со сшивающими реагентами, применяемыми в процессах химического связывания [96].

### 1.3.2 Получение наночастиц на основе фукоиданов

Существует два типа частиц, которые могут быть созданы с использованием фукоидана: покрытые фукоиданом частицы с металлической основой и полиэлектролитные комплексы, состоящие из фукоидана и положительно заряженного соединения, например, хитозана.

Полиэлектролитные комплексы полисахаридов создают преимущественно путём смешивания положительно заряженного хитозана или его олигомеров с отрицательно заряженными полианионными полисахаридами, такими как карбоксиметилцеллюлоза [97], декстрансульфат [98], гепарин [99] или фукоидан (Рисунок 5).

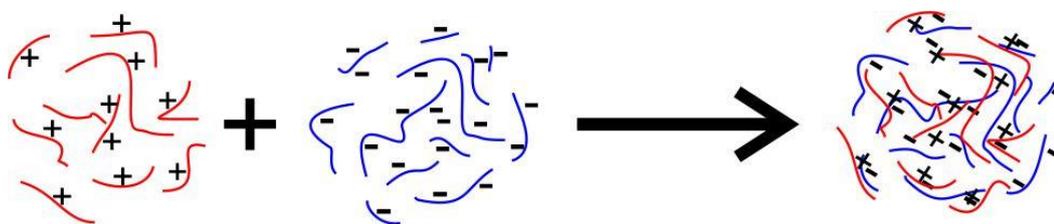


Рисунок 5 – Образование полиэлектролитных комплексов

Для получения наночастиц раствор одного полисахарида по каплям вливают в раствор другого полисахарида, при этом может использоваться магнитная мешалка. Также часто применяется ультразвук для гомогенизации получившейся суспензии. В настоящее время нельзя сказать, какой из методов является наилучшим. Ввиду разнообразия структур исходных компонентов, каждый исследователь должен оптимизировать процедуру с учётом используемых соединений.

В большинстве случаев вторым компонентом, используемым для создания наночастиц, является хитозан. Такая система отличается своей простотой, но не лишена недостатков. В частности, pH необходимо учитывать не только во время получения наночастиц, но и при их использовании, по причине возможной агрегации наночастиц, либо их набухания и последующего разрушения.

Необходимо учитывать значение констант ионизации, которое для аминогрупп хитозана ( $-\text{NH}_3^+$ ) составляет около 6,5, а для сульфатных групп фукоидана ( $-\text{SO}_3^-$ ) колеблется в диапазоне от 1,0 до 2,5 [100]. При  $\text{pH} = 1,2$  и  $\text{pH}$

$\approx 2,5$  (значения рН в желудке до и после еды) ионизируются и аминогруппы хитозана, и сульфатные группы фукоидана. Поэтому при этих значениях рН наночастицы могут быть стабильными и сохранять свою форму. При рН = 6,5 и выше аминогруппы хитозана начинают терять протоны, что приводит к значительному увеличению размеров хитозан-фукоидановых наночастиц из-за ослабления электростатического взаимодействия между хитозаном и фукоиданом. При достижении рН значения 7,4 электростатическое взаимодействие ослабевает настолько, что частицы распадаются. Влияние значения рН на размер частиц наиболее отчётливо наблюдается при соотношении фукоидана/хитозана 1:1 [101,102]. Из-за их короткого периода полураспада в кровеносной системе возможности применения наночастиц этого типа в терапии, как носителей терапевтических веществ для их внутривенной доставки, могут быть ограничены.

Следует заметить, что на параметры наночастиц также влияет порядок смешивания компонентов. Например, добавление к фукоидану гидрохлорида полиаллиламина приводило к образованию наночастиц в два раза меньшего размера, по сравнению с полученными в ходе эксперимента, где к раствору гидрохлорида полиаллиламина добавляли фукоидан [103].

### *1.3.3 Влияние молекулярной массы на параметры наночастиц*

Размер наночастиц заметно изменяется в зависимости от молекулярной массы используемых соединений. Так, например, повышение молекулярной массы хитозана с 50 кДа до 150 кДа приводило к образованию частиц меньшего размера. Вероятно, это вызвано ростом взаимодействия хитозана с фукоиданом через ионные связи: чем больше молекулярный вес хитозана, тем больше мест связывания, что позволяет цепям молекул образовывать более компактные структуры; в результате размер частиц уменьшается [104]. Однако в некоторых случаях сообщалось о противоположной взаимосвязи [105].

### *1.3.4 Влияние соотношения компонентов на параметры наночастиц*

Размер и стабильность наночастиц также зависят от соотношения фукоидана и хитозана. Не существует единого оптимального протокола конструирования наночастиц – для каждого выбранного компонента требуется продолжительная

оптимизация. Использование литературных данных осложняется тем, что исследователи используют неохарактеризованные соединения либо недостаточно описывают структуру используемого фукоидана. Соотношение компонентов влияет не только на размер наночастиц, но и на их заряд. Очевидно, когда требуются отрицательно заряженные наночастицы, количество фукоидана должно превышать количество положительно заряженного компонента. Например, при использовании хитозана (X) и фукоидана (Ф) из *F. vesiculosus* стабильные наночастицы были получены при следующих соотношениях: Ф:Х = 3:1, 5:1, а также 1:3 и 1:5 [104,106]. В большинстве случаев, когда требовались рН-чувствительные частицы, фукоидан и хитозан использовались в соотношении 1:1. Такие наночастицы сохраняли стабильность при кислых значениях рН, набухали при рН = 6,0 и разрушались при рН = 7,4 [104,106].

Для оптимизации создания наночастиц удобно использовать матрицу, включающую следующие критерии: соотношение фукоидана и второго соединения, концентрация исходных растворов и рН (Рисунок 6).

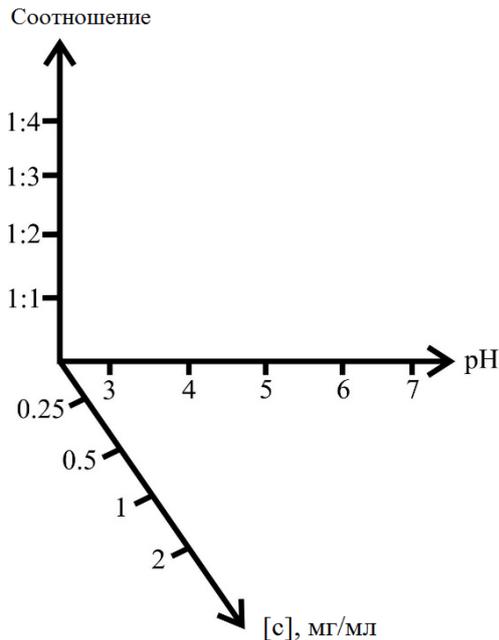


Рисунок 6 – Оптимизационная матрица для создания наночастиц

В целом, частицы получаются более стабильными при избытке одного из компонентов. Когда компоненты в равном количестве, наночастицы становятся более чувствительными к изменению рН и склонными к агрегации [107].

Соотношение компонентов влияет и на форму наночастиц. При  $pH = 3.0$  и соотношении  $F:X = 1:1$  наночастицы были круглыми, при  $F:X = 3:1$  их форма перестала быть сферической, а при  $F:X = 5:1$  они превратились в агрегаты нерегулярной формы [106]. В доставке лекарств форма наночастиц не менее важна, чем их размер. Хотя сферические наночастицы могут быть хорошими носителями лекарств, иногда частицы с нерегулярными структурами более эффективны, ввиду большего соотношения их поверхности к объёму. Результатом нерегулярности структуры носителя может стать конфигурация, способствующая более эффективному взаимодействию с клетками [108].

Другим важным параметром наночастиц является их поверхностный заряд. Обычно он описывается через дзета-потенциал наночастицы, который отражает её электростатический потенциал и зависит от её состава, а также среды, в которой находятся наночастицы [109]. Было показано, что наночастицы, абсолютная величина дзета-потенциала которых превышает 30 мВ, сохраняют стабильность в суспензиях, поскольку их поверхностные силы отталкивания препятствуют агрегации частиц. Кроме того, внутренняя поверхность кровеносных сосудов и поверхность клеток имеют отрицательный заряд, что отталкивает наночастицы с отрицательным зарядом. Увеличение поверхностного заряда наночастицы (положительного или отрицательного) делает её более восприимчивой к захвату макрофагами. Таким образом, контроль поверхностного заряда может способствовать минимизации неспецифических взаимодействий между наночастицами и фагоцитами, что не даёт наночастицам потеряться в нежелательных местах [110]. Полностью исключить неспецифические взаимодействия на сегодняшний день, однако, невозможно.

Иногда для улучшения определённых свойств наночастиц применяются модифицированные хитозаны. Как уже было сказано, хитозан положительно заряжен при  $pH$  ниже 6,5 и может образовывать полиэлектролитные комплексы с анионными полимерами. Однако при  $pH$  выше 6,5 он становится нерастворимым, что ограничивает его применение в биомедицинских целях, особенно когда требуется доставка лекарства при физиологических значениях  $pH$  [111]. Хороший пример – триметил-хитозан (ТМХ). Он обладает растворимостью в широком диапазоне  $pH$ , включая  $pH = 7,4$ . У ТМХ есть и другие преимущества. Например,

его четвертичные аминогруппы способны влиять на функции F-актина и белков, участвующих в плотных контактах между клетками эпителия. ТМХ может открывать плотные контакты, значительно повышая эффективность параклеточного транспорта макромолекул сквозь кишечный эпителий [112]. ТМХ способен защищать белковые лекарства от деградации, инкапсулируя их в наночастицы с основой из ТМХ. Кроме того, ТМХ может напрямую связываться с мукозным слоем (состоящим преимущественно из отрицательно заряженного муцина). Благодаря своим хорошим мукоадгезивным свойствам ТМХ способен увеличивать время удержания лекарств в мукозном слое клеток.

О-карбоксиметилированный хитозан является водорастворимым производным, чья карбоксильная группа позволяет ему эффективно связывать ионы  $Ca^{2+}$ . Наночастицы из фукоидана и О-карбоксиметилированного хитозана способны инкапсулировать куркумин, который сохранял стабильность при pH = 2,5. В инкапсулированной форме его цитотоксичность по отношению к фибробластам была ниже, чем в свободной форме. Поглощение куркумина кишечными клетками Caco-2 через энергозависимые эндоцитозные каналы указывает на то, что эти наночастицы являются многообещающими носителями перорально вводимых лекарств [113].

### *1.3.5 Металлические наночастицы, покрытые фукоиданом*

Как и полимерные наночастицы, металлические могут быть использованы в клинических целях и для доставки лекарств. Используя различные соединения, можно модифицировать их поверхность, повышая время циркуляции частиц в крови, повышая их проницаемость и понижая токсичность.

Магнитные металлические наночастицы часто включают в качестве основных компонентов оксиды железа  $Fe_2O_3$ , FeO и  $Fe_3O_4$ . Суперпарамагнитные наночастицы из оксида железа имеют очень маленький размер и являются биосовместимыми, они обладают большим потенциалом как агенты, используемые в биомедицине. Например, из них получают превосходные зонды, которые можно применять в качестве контрастных агентов для получения изображения методом магнитного резонанса, поскольку интенсивность их сигналов существенно изменяется без ущерба для стабильности частиц в экспериментах *in vivo*. Наночастицы на основе

оксидов железа могут быть получены путём совместного осаждения  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  путём добавления к ним основания. Их размер, форма и структура варьируются, в зависимости от используемой соли, соотношения  $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$ , pH и ионной силы раствора [114,115].

Поверхность наночастиц на основе оксидов железа можно модифицировать для применения в медицине и биотехнологиях при помощи биосовместимых соединений, подходящих для их стабилизации, предотвращения их разрушения в крови и других биологических жидкостях, подавления их агрегации и позволяющих им переносить лекарственные препараты и/или связываться с целевым лигандом [102]. Эта стадия функционализации может проходить во время или после синтеза наночастиц [116].

Размер серебряных наночастиц варьируется от 1 до 100 нм. Некоторые из них действительно содержат большой процент оксида серебра, благодаря высокому значению их площади поверхности относительно объёма. Золотые наночастицы имеют размер в пределах нескольких нанометров и существуют в виде суспензии (или коллоидного раствора).

Существуют разные способы синтеза наночастиц. Чаще всего используются химические методы. Серебряные наночастицы чаще всего получают путём восстановительной реакции из соли серебра и восстановителей, в качестве которых выступают цитрат натрия, аскорбат натрия, борогидрид натрия и т.д. Стабилизируют наночастицы обычно при помощи таких агентов как (поли-) виниловый спирт, (поли-) винилпирролидон, (поли-) этиленгликоль, (поли-) метакриловая кислота, (поли-) метилметакрилат [117].

Для создания золотых наночастиц обычно используется метод восстановления солей золота, таких как тетрахлоуроурат водорода ( $\text{HAuCl}_4$ ), где в качестве восстановителя используется соль или эфир лимонной кислоты [118]. Золотые наностержни с фукоидановым покрытием были получены благодаря электростатическим взаимодействиям при физической адсорбции между положительно заряженными  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -группами золотых наностержней и отрицательно заряженными сульфатными группами фукоидана [119].

Функционализация золотых наночастиц осуществляется путём растворения фукоидана в горячем растворе тетрахлоуроурата водорода, с последующим

охлаждением до комнатной температуры и очисткой путём центрифугирования [120,121].

По итогам анализа литературных данных можно сказать, что спектроскопия ЯМР является эффективным инструментом для установления структур полисахаридов. Большинство фукоиданов, структура которых была исследована методами спектроскопии ЯМР, имеют основную цепь, состоящую из 1→3- или 1→3-, 1→4-связанных остатков фукозы. Следующей по распространённости группой фукоиданов являются галактофуканы, основные цепи которых включают остатки галактозы. В состав фукоиданов также могут входить остатки других сахаров. Фукоиданы являются перспективным компонентом для создания наночастиц, чаще всего путём образования полиэлектролитных комплексов с положительно заряженными компонентами, такими как хитозан.

## 2. Результаты и обсуждение

### 2.1. Получение и исследование структуры высоко- и низкомолекулярных продуктов ферментативного расщепления фукоидана из *Fucus evanescens*

В данном исследовании использовался фукоидан, выделенный из водоросли, собранной в июле 2008 г. у побережья острова Итуруп, и обозначенный как **FeF1**. Для его деполимеризации была использована фукоиданазы FFA1 из морской бактерии *Formosa algae* – фермент, расщепляющий  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4-связи между остатками фукозы. В результате ферментативной реакции молекулярная масса фукоидана значительно снизилась. Анализ методом гель-фильтрации показал, что большинство низкомолекулярных продуктов реакции (LMP) имеют массу около 5 кДа, а высокомолекулярных продуктов реакции (НМР) – около 50 кДа (Рисунок 7а).

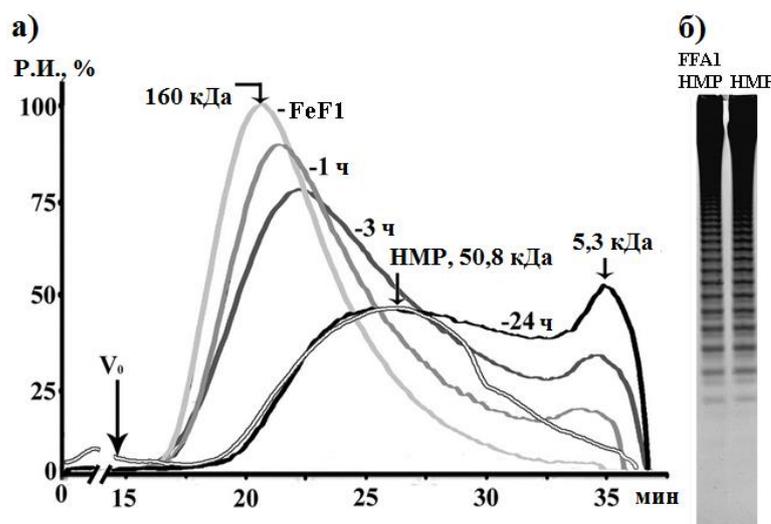


Рисунок 7 – Проникающая хроматография продуктов расщепления фукоидана из *F. evanescens* фукоиданазой FFA1 из *Formosa algae* (а) и электрофорез продуктов реакции фукоиданазы FFA1 и НМР (б). Р.И. – рефрактометрический индекс

Выход НМР и LMP составил 55% и 45% от веса исходной фракции соответственно. С помощью электрофореза было показано, что дальнейшее воздействие фермента на НМР не вызывало образования продуктов реакции: электрофореграмма НМР не изменилась (Рисунок 7б).

Структура НМР была установлена с помощью методов ЯМР. В аномерной области протонного спектра продукта присутствовали два ярко выраженных сигнала (5,39 и 5,37 м.д.). В области сильного поля также имелись два интенсивных сигнала (1,37 и 1,31 м.д.), характерных для остатков  $\alpha$ -L-фукопиранозы (Рисунок 8а). На  $\alpha$ -конфигурацию гликозидных связей указывало характерное значение констант  $J_{1,2}$  3,4–3,5 Гц. Углеродный спектр НМР также содержал два сигнала в аномерной области (98,9 м.д. и 99,1 м.д.) и два в области сильного поля (16,9 и 17,1 м.д.) (Рисунок 8б).

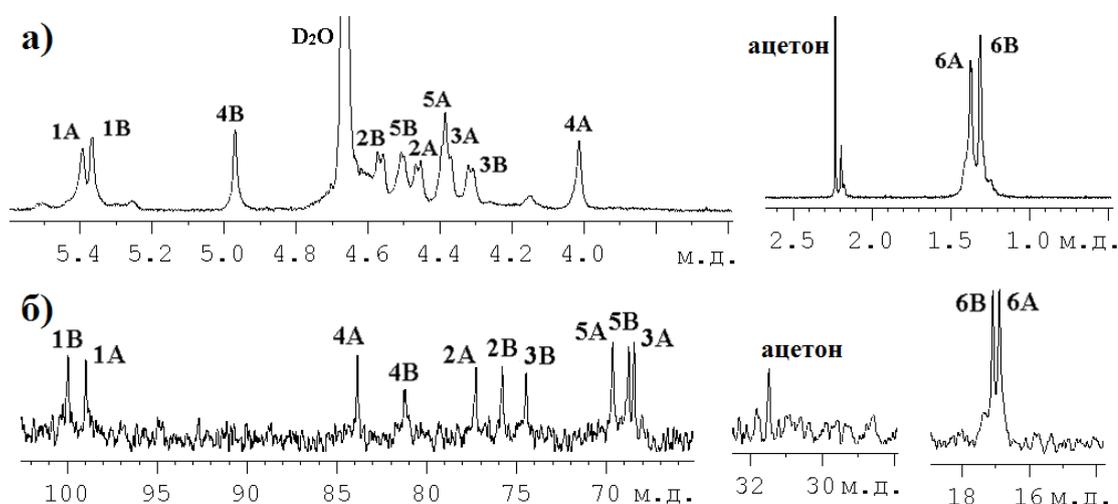


Рисунок 8 – Одномерные спектры ЯМР фракции НМР:  $^1\text{H}$  (а) и  $^{13}\text{C}$  (б). 1А, 1В и т.д. – сигналы соответствующих протонов и углеродов остатков **А** и **В**

Чтобы отнести все сигналы одномерных спектров, были проведены дальнейшие исследования с использованием двумерной спектроскопии ЯМР. Из спектра COSY было установлено соответствие сигналов спектра  $^1\text{H}$  протонам двух моносахаридных остатков (**А** и **В**) (Рисунок 9а). В спектре ROESY присутствовали кросс-пики между Н1 остатка **А** и Н3 остатка **В**, а также между Н1 остатка **В** и Н4 остатка **А**, что указывало на гликозидные связи 1→3 и 1→4 (Рисунок 9б). При помощи спектра HSQC сигналы атомов углерода были соотнесены с сигналами непосредственно связанных с ними протонов остатков **А** и **В** (Рисунок 9в). Данные спектра HMBC подтвердили наличие связи между Н1 остатка **В** и С4 остатка **А** (корреляционный пик 5,35/83,9 м.д.) и между С1 остатка **В** и Н4 остатка **А** (Рисунок 9г). Химические сдвиги НМР приведены в Таблице 9.

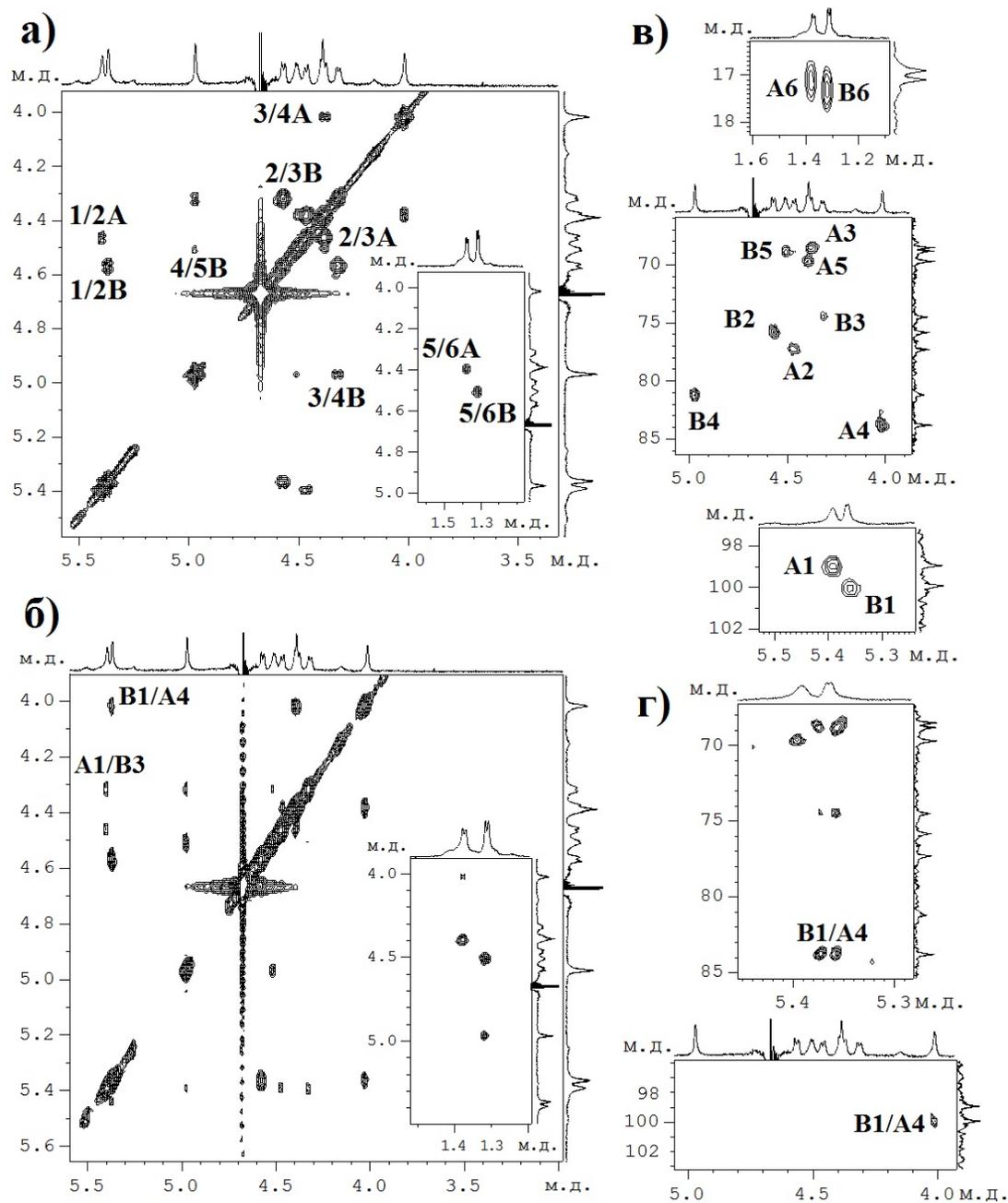


Рисунок 9 – Двумерные спектры ЯМР фракции, содержащей высокомолекулярные продукты реакции (НМР): COSY (а), ROESY (б), HSQC (в) и HMBC (г)

Таблица 9 – Химические сдвиги (м.д.) НМР

Остаток	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
А	5,39	4,46	4,36	4,01	4,39	1,38
	99,0	77,1	68,4	83,9	69,7	16,8
В	5,35	4,55	4,30	4,95	4,50	1,32
	100,0	75,7	74,7	81,0	68,7	17,1

Расположение сульфатных групп было определено путём сравнения химических сдвигов его протонов и углеродов со сдвигами  $\alpha$ -L-фукопиранозы. Значительные смещения в сторону слабого поля, наблюдаемые для H2 и C2 обоих моносахаридных остатков (а также небольшое смещение в сторону слабого поля C3 остатка **A**), указывали на наличие у них сульфатных групп в положении 2. Столь же существенное смещение наблюдалось для H4 и C4 остатка **B**, что также являлось признаком сульфатирования.

Таким образом, согласно данным, полученным с помощью спектроскопии ЯМР, НМР является регулярным полисахаридом со структурой  $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2,4SO}_3^-)-(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2SO}_3^-)-(1\rightarrow)]_n$  (Рисунок 11).

LMP разделили на олигосахариды с помощью анионообменной хроматографии на Q-Sepharose HP (Рисунок 10а). Самую большую по количественному содержанию фракцию составлял сульфатированный тетрасахарид (ОС LMP1) (Рисунок 10б). Его химические сдвиги были идентичны таковым у тетрасахарида, ранее полученного при помощи фукоиданазы FFA2, также полученной из *F. algae* [122]. Дополнительное воздействие на него фукоиданазой FFA1 не привело к дальнейшему расщеплению.

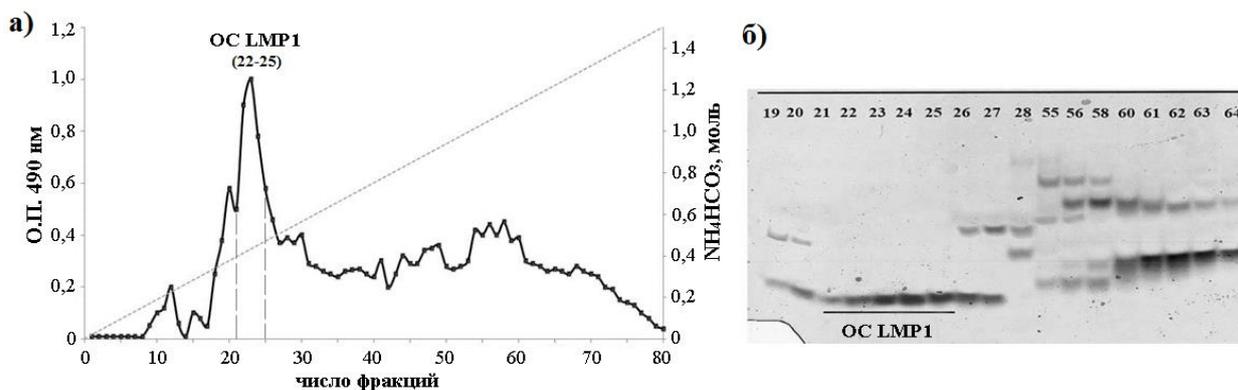


Рисунок 10 – Разделение LMP на Q-Sepharose HP. (а) Элюция олигосахаридов, проведенная линейным градиентом 0–1,5 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . О.П. – оптическая плотность. (б) Электрофорез полученных фракций

ОС LMP1 и полисахарид НМР являлись конечными продуктами ферментативного гидролиза (Рисунок 11). Ранее было показано, что в структуре фукоидана из *F. evanescens* присутствуют протяженные фрагменты, в которых

остатки фукозы сульфатированы только при С2. Некоторые из этих фрагментов также включали боковые ветви [52]. Совокупность полученных нами в разное время сведений позволяет сделать заключение, что молекула фукоидана из *F. evanescens* содержит протяженные фрагменты, состоящие из остатков фукозы, сульфатированной при С2. Некоторые из остатков фукозы этой части молекулы могут содержать боковые цепи, состоящие из несulfатированных остатков фукозы. Другая часть молекулы фукоидана **FeF1**, составляющая около 55% является более регулярной и содержит повторяющиеся дисахаридные звенья:  $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(2,4\text{SO}_3^-)\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(2\text{SO}_3^-)\text{-}(1\rightarrow)]_n$ .

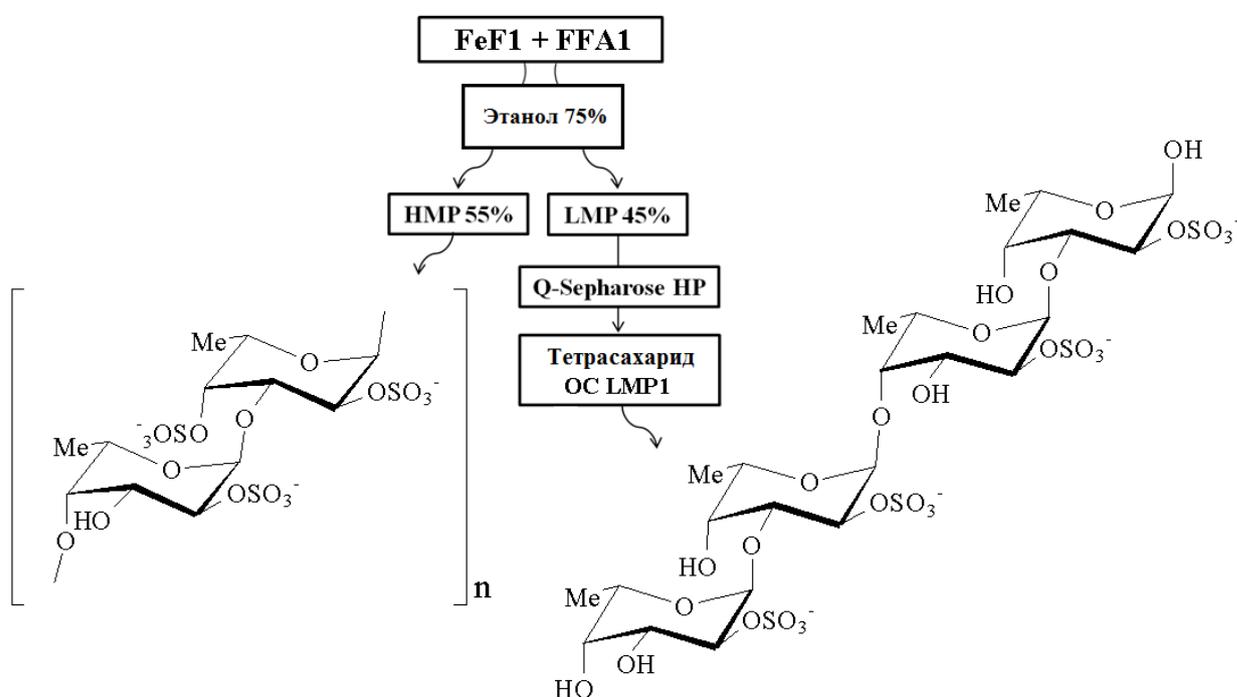


Рисунок 11 – Схема получения и разделения продуктов ферментативного гидролиза фукоидана и их структуры

## 2.2. Получение и исследование структуры низкомолекулярных регулярных продуктов ферментативного расщепления фукоидана из *Sargassum horneri*

Фукоидан, полученный из бурой водоросли *S. horneri*, состоял из остатков фукозы (90 мол %) и галактозы (9 мол %) и содержал значительное количество сульфатных групп (23 мол %). Хотя в состав фукоидана входили всего два типа

моносахаридных остатков, по его протонному спектру было видно, что он имеет сложную и, по-видимому, нерегулярную структуру (Рисунок 12). Соотнести сигналы такого спектра не представлялось возможным.

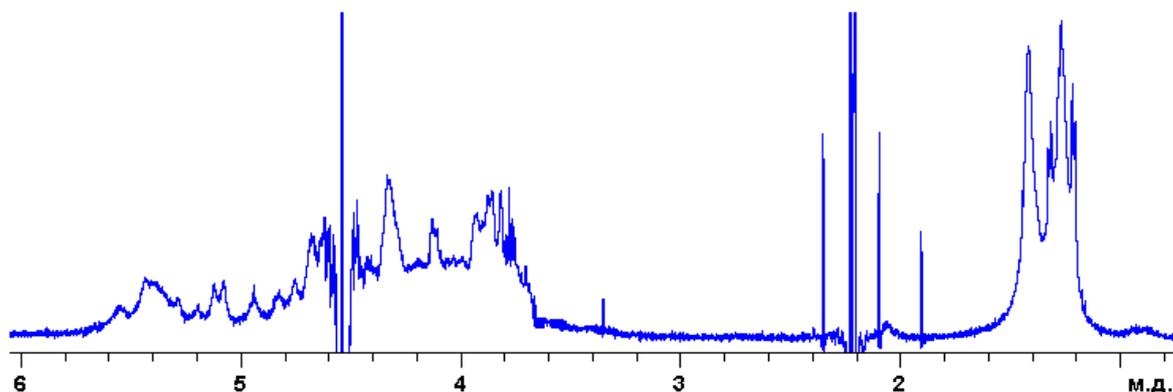


Рисунок 12 –  $^1\text{H}$  спектр ЯМР исходного фукоидана

Для упрощения структуры полисахарида фукоидан был деполимеризован с помощью фукоиданазы FFA1. В результате была получена смесь продуктов различного молекулярного веса, которую осаждением 75% этанолом разделили на высоко- и низкомолекулярную фракцию, выход которых составил 52% и 40% соответственно. Низкомолекулярная фракция, в свою очередь, была разделена при помощи анионообменной хроматографии на Q-sepharose. Были получены семь олигосахаридов (Рисунок 13). Спектры большинства фракций имели достаточно хорошее разрешение для установления их структуры методом спектроскопии ЯМР.

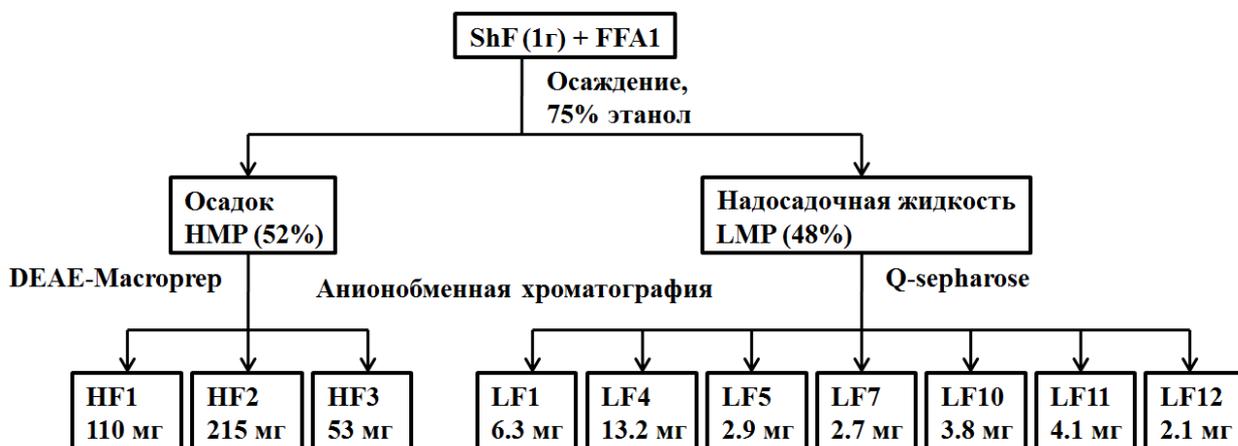


Рисунок 13 – Схема получения и разделения поли- и олигосахаридов, полученных путём ферментативной деполимеризации фукоидана из *S. horneri*

Самую низкую степень полимеризации из полученных фракций имели тетрасахариды. В аномерной области протонного спектра фракции LF1 наблюдались четыре дублета. В области метильных групп присутствовали несколько сигналов, интегральная интенсивность которых также говорила о наличии четырёх различных остатков  $\alpha$ -L-фукопиранозы (**a**, **b**, **c** и **d**) (Рисунок 14а). Углеродный спектр LF1 содержал четыре сигнала в аномерной области и четыре в области сильного поля (Рисунок 14б).

С помощью спектра COSY фракции LF1 были выявлены спин-спиновые взаимодействия между большинством соседних протонов. Однако корреляция между четвертым и пятым протонами фукопиранозных остатков **b** и **c** была слабо выражена и в спектре COSY не проявилась (Рисунок 14в). Соответствующие кросс-пики присутствовали в спектре ROESY (Рисунок 14г), это позволило полностью установить принадлежность сигналов протонов. Сигналы непосредственно связанных с этими протонами атомов углерода были установлены при помощи спектра HSQC (Рисунок 14д). По спектрам ROESY и HMBC были установлены гликозидные связи между остатками. На ROESY наблюдались кросс-пики между H1 остатка **b** и H3, H4 остатка **d**, H1 остатка **c** и H3, H4 остатка **a**, что соответствует 1→3-связям, а также между H1 остатка **d** и H4, H6 остатка **c**, что указывает на наличие 1→4-связи (Рисунок 15б). Данные спектра HMBC это подтверждают: на нём видна корреляция между аномерными протонами **b**<sub>1</sub>, **d**<sub>1</sub> и **c**<sub>1</sub> и атомами углерода **d**<sub>3</sub>, **c**<sub>4</sub> и **a**<sub>3</sub> соответственно, равно как и между аномерными атомами углерода **b**<sub>1</sub>, **d**<sub>1</sub> и **c**<sub>1</sub> и протонами **d**<sub>3</sub>, **c**<sub>4</sub> и **a**<sub>3</sub> (Рисунок 14е).

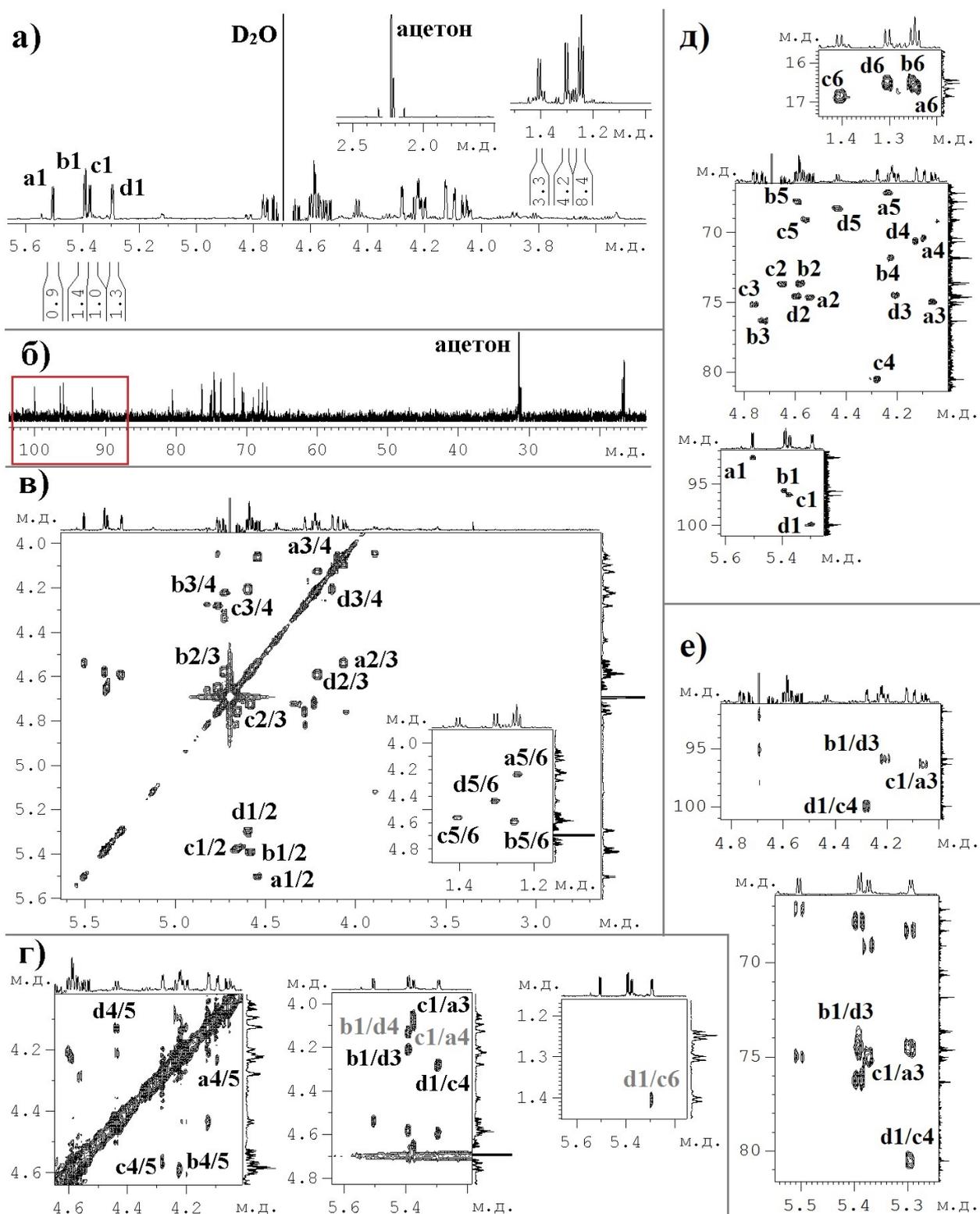


Рисунок 14 – Спектры ЯМР тетрасахарида LF1:  $^1\text{H}$  (а),  $^{13}\text{C}$  (б), COSY (в), ROESY (г), HSQC (д) и HMBC (е)

Значительные сдвиги в сторону слабого поля сигналов, соответствующих атомам водорода и углерода в положении 2, а также 3, в случае остатков **b** и **c**

(Таблица 10), свидетельствовали о наличии сульфатных групп при соответствующих атомах углерода. Таким образом, структура фракции LF1 была полностью установлена (Рисунок 16а).

Таблица 10 – Химические сдвиги (м.д.) олигосахарида LF1

Остаток	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
<b>a</b>	5,50	4,54	4,06	4,09	4,24	1,24
	91,74	74,62	74,99	70,40	67,12	16,65
<b>b</b>	5,39	4,58	4,72	4,22	4,59	1,26
	95,86	73,61	76,33	71,81	67,74	16,44
<b>c</b>	5,37	4,65	4,76	4,27	4,57	1,41
	96,35	73,75	75,16	80,54	69,07	16,85
<b>d</b>	5,30	4,59	4,20	4,12	4,44	1,30
	99,93	74,62	74,50	70,62	68,28	16,51

Структуры других фракций устанавливали аналогичным способом. По  $^1\text{H}$ -спектру фракции LF5 видно, что эта фракция, как и LF1, является тетрасахаридом и имеет схожую структуру (Рисунок 15а, б). LF5 от LF1 отличает присутствие ещё одной сульфатной группы – в положении 4 второго остатка (Рисунок 16б), на что указывают сдвиги сигналов, соответствующих его атомам водорода (+1,14 м.д.) и углерода (+7,9 м.д.), в слабое поле относительно  $\alpha$ -L-фукопиранозы (Таблица 15), а также смещение сигнала C3 фракции LF5 в сторону сильного поля по сравнению с LF1 (-1 м.д.) и C5 – в сторону слабого (+0,5 м.д.).

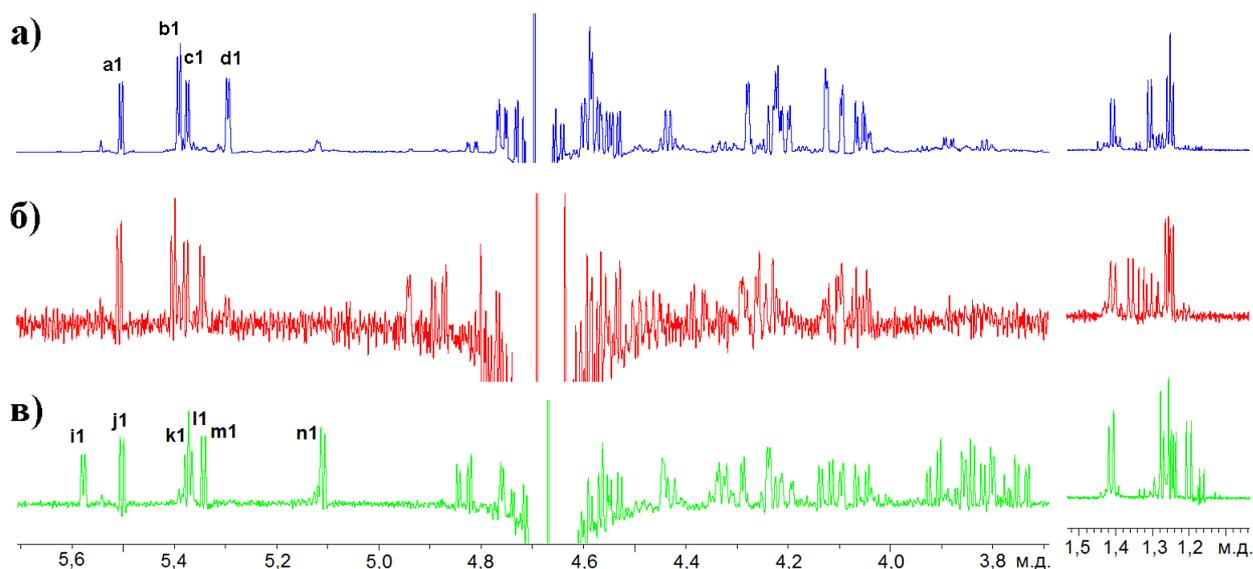


Рисунок 15 –  $^1\text{H}$ -спектры ЯМР LF1 (а), LF5 (б) и LF4 (в)

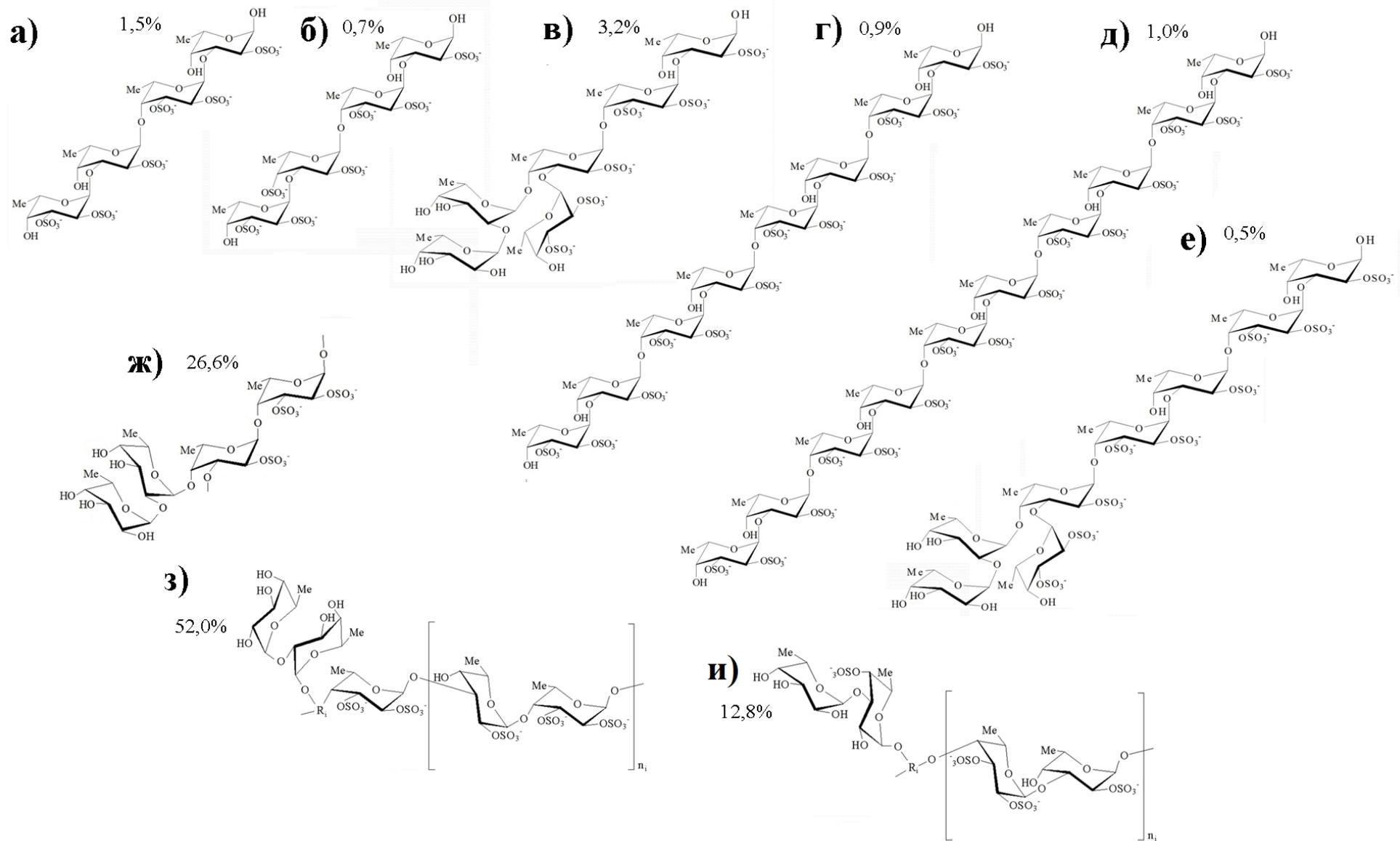


Рисунок 16 – Структура фракций, полученных из фукоидана бурой водоросли *S. horneri*, и их процент от общей массы полученных фракций: LF1 (а); LF5 (б); LF4 (в); LF10 (г); LF11 (д); LF12 (е); HF1 (ё); HF2 (ж); HF3 (з)

В протонном спектре LF4 присутствовали сигналы шести остатков  $\alpha$ -L-фукопиранозы (Рисунок 15в). Сигналы атомов водорода и углерода были отнесены при помощи спектров COSY и HSQC (Таблица 11).

Таблица 11 – Химические сдвиги (м.д.) олигосахарида LF4

Остаток	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
<b>i</b>	5,58	3,74	4,13	3,86	4,33	1,26
	98,57	79,84	69,64	73,90	68,41	16,71
<b>j</b>	5,50	4,54	4,05	4,09	4,23	1,24
	91,75	74,61	74,86	70,31	67,10	16,66
<b>k</b>	5,38	4,64	4,75	4,29	4,56	1,41
	96,20	73,75	75,30	80,70	69,13	17,03
<b>l</b>	5,37	4,70	4,20	4,44	4,43	1,41
	100,14	75,41	77,54	79,16	70,00	17,36
<b>m</b>	5,34	4,58	4,83	4,24	4,61	1,25
	98,28	73,88	76,43	71,81	67,70	16,55
<b>n</b>	5,11	3,83	3,91	3,80	4,32	1,20
	100,67	69,33	70,36	73,20	67,99	16,49

В спектре ROESY присутствовали кросс-пики между протонами **n**<sub>1</sub> и **i**<sub>2</sub>; **i**<sub>1</sub> и **l**<sub>4</sub>; **l**<sub>6</sub>; **m**<sub>1</sub> и **l**<sub>3</sub>, **l**<sub>4</sub>; **l**<sub>1</sub> и **k**<sub>4</sub>, **k**<sub>6</sub>; **k**<sub>1</sub> и **j**<sub>3</sub>, **j**<sub>4</sub> (Рисунок 17а). Гликозидные связи аномерных протонов двух остатков – **i** и **m** – с протонами остатка **l** указывали на наличие разветвления. Это подтвердили данные спектра HMBC, показавший, что атомы углерода **n**<sub>1</sub>, **i**<sub>1</sub>, **l**<sub>1</sub>, **k**<sub>1</sub> и **m**<sub>1</sub> были связаны с протонами **i**<sub>2</sub>, **l**<sub>4</sub>, **k**<sub>4</sub>, **j**<sub>3</sub> и **l**<sub>3</sub> соответственно, а соответствующие протоны – с соответствующими атомами углерода (Рисунок 17б). При сопоставлении структуры LF4 с LF1 и LF5 видно, что 1→3-1→4-1→3-связи между моносахаридными остатками **m**, **l**, **k** и **j**, равно как и расположение их сульфатных групп, аналогичны таковым у LF1 и LF5, однако вместо гидроксильной или сульфатной группы к С4 второго остатка (**l**) присоединена боковая цепь, состоящая из двух нессульфатированных остатков фукозы, связанных 1→2-связью (Рисунок 16в).

Наличие боковой цепи при С4 оказывает на сигналы остатка, к которому она примыкает, воздействие, отличающееся от эффекта, возникающего при сульфатировании в том же положении (LF5). Сигналы его H1, H2, H4 и H6

сместились в сторону слабого поля на 0,07, 0,11, 0,34 и 0,11 м.д. соответственно, по сравнению с аналогичным остатком LF1, тогда как сульфатная группа при C4 у остатка LF5 вызвала смещение сигналов соответствующих протонов невосстанавливающего остатка в слабое поле на 0,04, 0,03, 0,82 и 0,05 м.д. по сравнению с LF1, а кроме того вызвала смещение в слабое поле на 0,17 и 0,05 м.д. сигналов H3 и H5 (Таблица 15).

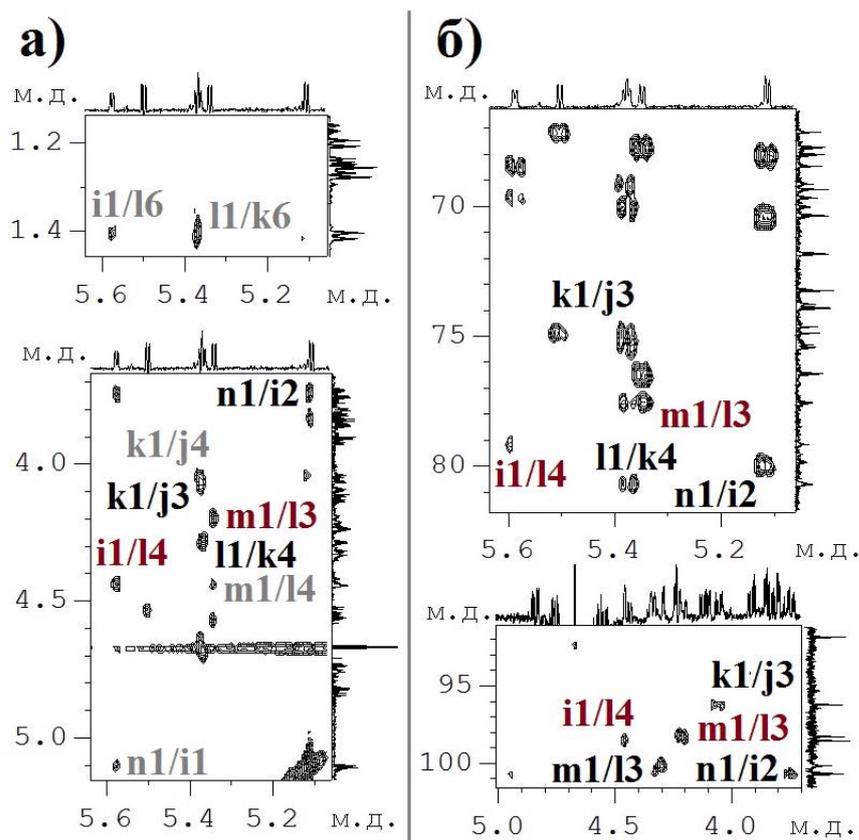


Рисунок 17 – Двумерные спектры ЯМР LF4: ROESY (а) и HMBC (б)

Исследование структур остальных олигосахаридов осложнялось высокой степенью их полимеризации, из-за чего сигналы были расположены близко и сливались. Так, например, протонный спектр фракции LF10 походил на спектр фракции LF1, однако исследование интегральных интенсивностей его сигналов показало присутствие вдвое большего числа моносахаридных остатков (Рисунок 18б, в).

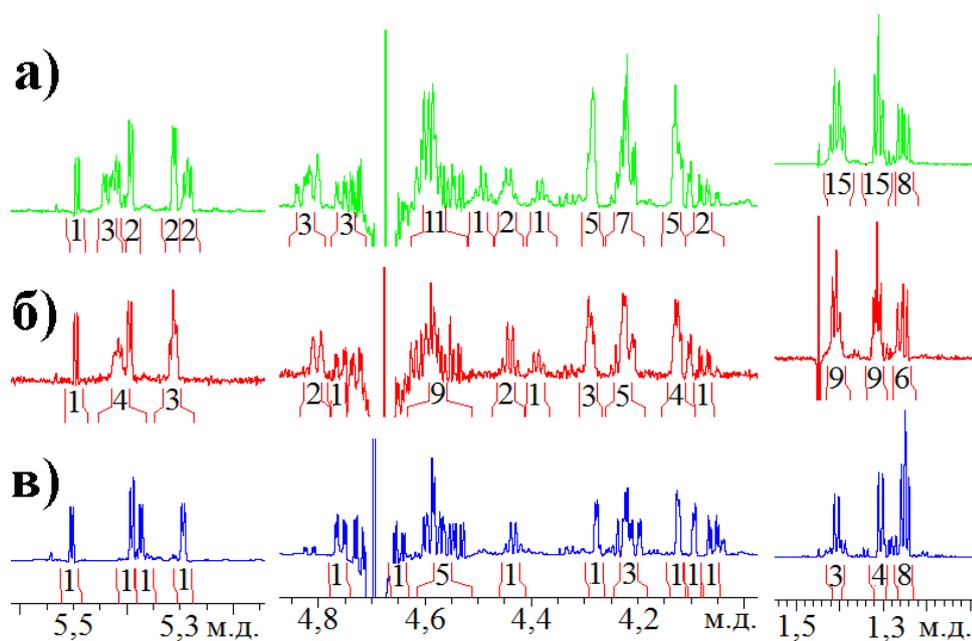


Рисунок 18 –  $^1\text{H}$ -спектры ЯМР олигосахаридов LF11 (а), LF10 (б) и LF1 (в)

Близость сигналов осложняла их отнесение к определённым протонам и установление типа гликозидных связей между ними. Кроме того, в связи с более высокой степенью полимеризации, кросс-пики спектра COSY фракции LF10 были менее выраженными, чем у фракций LF1, LF4 и LF5. Принадлежность сигналов протонов была определена при помощи спектра 2D TOCSY. Было установлено, что структура LF10 представляла собой линейный октасахарид, состоящий из остатков фукозы, сульфатированных при C2 и C3 и связанных чередующимися 1→3- и 1→4-связями (Рисунок 16г).

Аналогичная картина наблюдалась для  $^1\text{H}$ -спектра ЯМР фракции LF11, схожего со спектром LF10. Анализ интегральных интенсивностей сигналов показал наличие десяти остатков  $\alpha$ -L-фукопиранозы (Рисунок 18а). В результате исследования структуры LF11 методами двумерной спектроскопии ЯМР было подтверждено, что LF11 является декасахаридом, состоящим из остатков фукозы, сульфатированных при C2 и C3 и связанных чередующимися 1→3- и 1→4-связями (Рисунок 16д).

$^1\text{H}$ -спектр ЯМР LF12 был очень похож на спектр LF4, однако в его аномерной области, и в области метильных групп, были заметны сигналы, отсутствующие в спектре LF4 (Рисунок 19). В ходе дальнейших исследований было установлено, что LF12 – разветвлённый октасахарид, имеющий структуру, аналогичную LF4, с тем

отличаем, что его основная цепь состоит не из четырёх повторяющихся остатков, а из шести (Рисунок 16е).

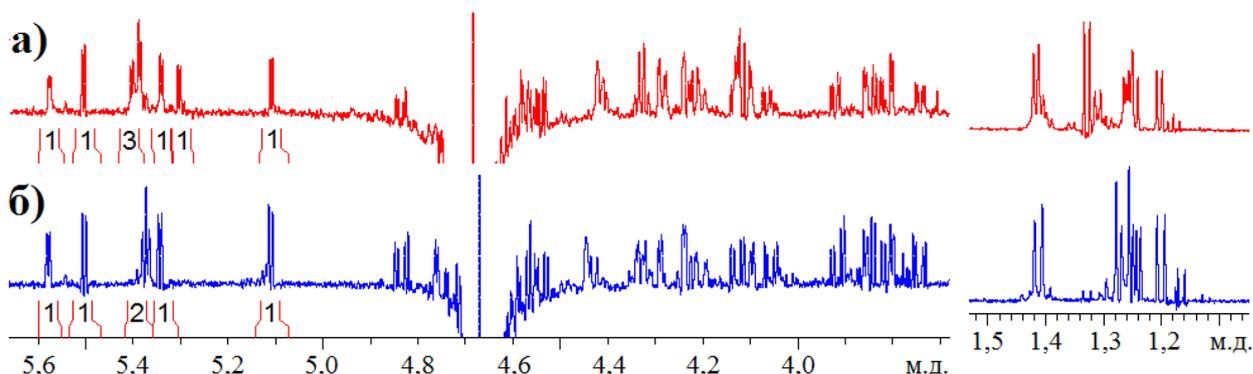


Рисунок 19 –  $^1\text{H}$ -спектры ЯМР LF12 (а) и LF4 (б)

Химические сдвиги сигналов атомов водорода и углерода боковых цепей LF12, остатка на невосстанавливающем конце и примыкающего к нему остатка с боковой цепью, а также остатка на восстанавливающем конце и остатка его гликозилирующего являются идентичными химическим сдвигам сигналов соответствующих атомов LF4. Находящийся в середине основной цепи остаток  $\rightarrow 4$ - $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1 $\rightarrow$ 3)- показал небольшое (0,07 м.д.) смещение в сторону слабого поля сигнала H5 по сравнению с остатком, гликозилирующим остаток на восстанавливающем конце. Химические сдвиги остатка  $\rightarrow 3$ - $\alpha$ -L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1 $\rightarrow$ 4)- были аналогичны таковым у соответствующего остатка LF1 (Таблица 15).

### 2.3. Получение и исследование структуры высокомолекулярных регулярных продуктов ферментативного расщепления фукоидана из *S.*

#### *horneri*

Исследование протонного спектра высокомолекулярной фракции НМР показало, что её структура отличается слишком большой сложностью, чтобы его можно было расшифровать. Для дальнейшего структурного анализа мы разделили её при помощи анионообменной хроматографии (Рисунок 7). В результате было получено три фракции, HF1, HF2 и HF3, различного молекулярного веса и с

разным содержанием сульфатных групп (Таблица 12). Их выходы составили 22% (HF1), 43% (HF2), и 10,6% (HF3).

Таблица 12 – Структурные характеристики фракции НМР и фракций HF1, HF2 и HF3

<b>Название</b>	<b>Молекулярный вес, кДа</b>	<b>Содержание сульфатных групп, %</b>
<b>НМР</b>	20-140	41
<b>HF1</b>	63	36
<b>HF2</b>	114	34
<b>HF3</b>	138	42

Исследование полученных полисахаридов при помощи спектроскопии ЯМР дало следующие результаты. Наиболее простым для изучения был  $^1\text{H}$  спектр ЯМР HF1 (Рисунок 20а). В нём наблюдались сигналы, соответствующие четырём разным остаткам  $\alpha$ -L-фукопиранозы. Исследования методами двумерной спектроскопии позволили установить, что два из них представляют собой дисахаридный фрагмент основной цепи с 1 $\rightarrow$ 3- и 1 $\rightarrow$ 4-связями и сульфатными группами при C2 и C3, а другие два являются компонентами несulfатированных дисахаридных боковых цепей с 1 $\rightarrow$ 2-связью, примыкающих к каждому дисахаридному звену основной цепи при C4 (Рисунок 16ж).

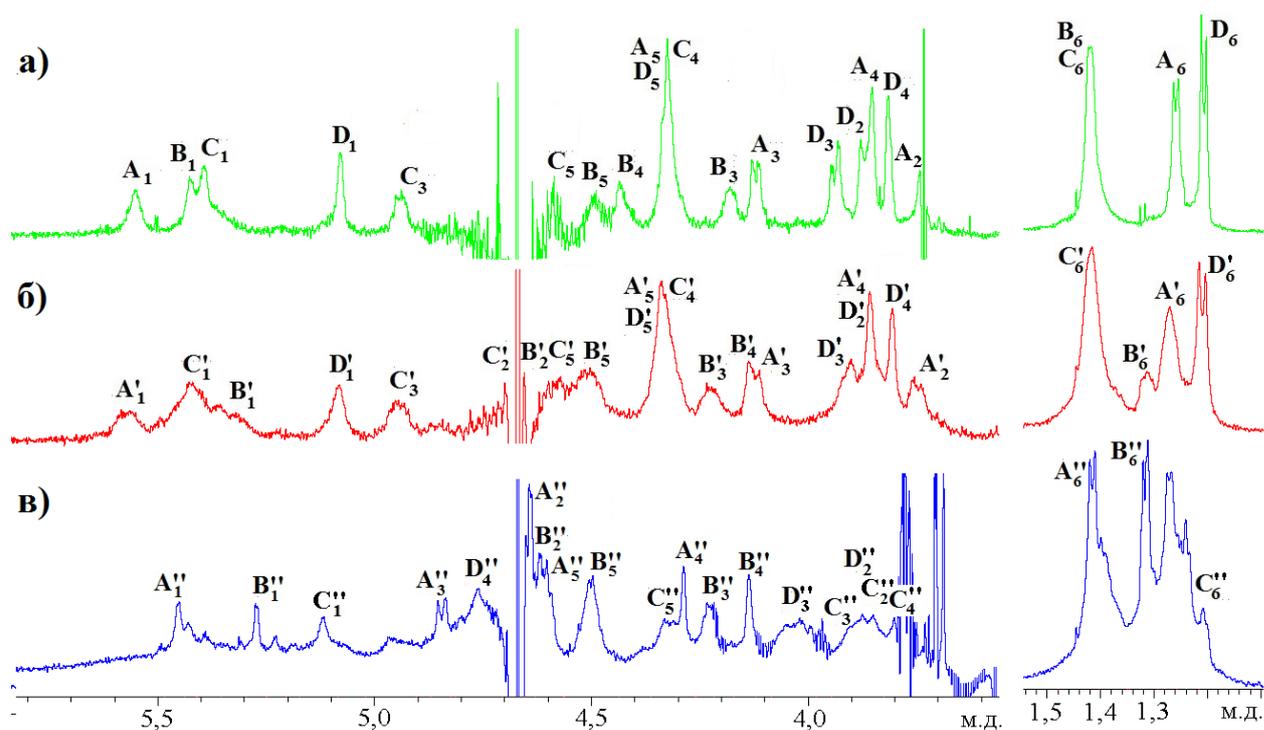


Рисунок 19 –  $^1\text{H}$ -спектры ЯМР HF1 (а), HF2 (б) и HF3 (в)

Спектры двух других высокомолекулярных фракций были более сложными. Их структуру удалось установить лишь частично. Так, хотя в углеродном спектре HF2 наблюдались сигналы, как минимум, пяти различных моносахаридных остатков, удалось отнести сигналы атомов водорода и углерода только четырёх из них. Заметное сходство протонного спектра ЯМР HF2 со спектром HF1 указывало на схожую структуру (Рисунок 20а, б). Изучение двумерных спектров подтвердило наличие у HF2 боковых цепей со структурой  $\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{}$  (остатки **D'** и **A'**), а также 2,3-дисульфатированного 1 $\rightarrow$ 4-связанного остатка в составе основной цепи (остаток **C'**). Эти структурные элементы также присутствовали в составе HF1. Кроме того, в составе основной цепи HF2 присутствует 2-сульфатированный остаток **B'** с 1 $\rightarrow$ 3-гликозидной связью и гидроксильной группой при C4.

Хотя структуру остатка, к которому примыкала боковая цепь, установить не удалось, в области метильных групп присутствует сигнал, похожий на сигнал C6 остатка **B**, к которому примыкает боковая цепь у HF1. Также в спектре ROESY присутствует кросс-пик между H1 остатка **A'** и сигналом при 4,49 м.д., предположительно принадлежащим остатку основной цепи. Химический сдвиг этого сигнала близок по величине к C4 остатка **B**. Таким образом, можно

предположить, что боковые цепи у HF2 также соединены с основной 1→4-связями. В отличие от HF1, основная цепь HF2 содержит участки, где к 2-сульфатированным остаткам не примыкают боковые цепи при C4 (Рисунок 16з).

<sup>1</sup>H спектр ЯМР HF3 значительно отличался от спектров HF1 и HF2 (Рисунок 20). В результате исследования при помощи двумерной спектроскопии было установлено, что его основная цепь состоит преимущественно из регулярно повторяющихся остатков со структурой →4)-α-L-Fucp-(2,3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→3)-α-L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→ (A'' и B''). Сигналы, принадлежащие остальным элементам структуры, выражены значительно слабее, что затрудняет их отнесение.

Структура боковых цепей была установлена путём сопоставления кросс-пиков спектра HSQC с известными данными. Отсутствие заметных сдвигов по сравнению со стандартом у сигналов атомов остатка C'' и их близость к значениям сдвигов D и D' указывали, что это несulfатированный остаток α-L-фукозы на невозстанавливаемом конце боковой цепи. Однако, в отличие от HF1 и HF2, в <sup>1</sup>H-спектре HF3 отсутствуют выраженные сигналы, которые можно было бы отнести к 1→2-связанным остаткам боковых цепей. Однако в спектре ROESY имеется кросс-пик между H1 остатка C'' и H3 остатка D'' с частично установленной структурой. Значения химических сдвигов его H4 и C4 характерны для остатка, сульфатированного при C4.

В протонном спектре HF3 можно наблюдать и ряд сигналов, принадлежащих другим остаткам. Из-за низкой интенсивности этих сигналов и их кросс-пиков на двумерных спектрах отнести их не удалось. Кроме того, наличие в спектре HSQC корреляции между протоном при 5,12 м.д. (C''<sub>1</sub>) и двумя разными атомами углерода указывает на наличие в составе HF3 большего количества повторяющихся остатков A'' и B'', чем C'' и D'' (Рисунок 16и).

Таким образом, основная цепь фукоидана из *S. horneri* состоит из чередующихся 1→3- и 1→4-связанных остатков α-L-фукопиранозы, сульфатированных при C2 и C2, C3. Свободные гидроксильные группы при C4 основной цепи могут быть замещены сульфатными группами или боковыми цепями, состоящими из 1→2-связанных несulfатированных остатков α-L-фукопиранозы, либо имеющими структуру α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→.

## 2.4. Характерные химические сдвиги сигналов атомов некоторых сульфатированных фукоолигосахаридов

Исследование структур фукоиданов часто включает их деполимеризацию химическими или ферментативными методами с последующим установлением структур полученных фрагментов. Сопоставление химических сдвигов сигналов на их одномерных спектрах ЯМР (прежде всего, протонных, ввиду простоты получения) с химическими сдвигами сигналов олигосахаридов с установленной структурой позволяет значительно сократить время расшифровки спектров ЯМР. В этой главе мы обобщаем структурные данные полученных нами фукоолигосахаридов с различной структурой в надежде на то, что это ускорит установление структур новых фукоиданов и фукоолигосахаридов (Таблица 13).

На химический сдвиг каждого атома каждого моносахаридного остатка оказывает влияние ряд факторов, таких как тип моносахаридного остатка, его расположение в структуре и наличие заместителей (сульфатных групп, ацетатных групп и т.д.) [7-9].

Сопоставление протонных спектров ЯМР тетрасахарида T2, имеющего структуру  $\alpha\text{-L-Fucp}-(2\text{SO}_3^-)-(1\rightarrow3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}-(2\text{SO}_3^-)-(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}-(2\text{SO}_3^-)-(1\rightarrow3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}-(2\text{SO}_3^-)$  [122], и его производного T1, полученного в результате воздействия на него сульфатазы SWF1 [123] (Рисунок 21), показало, что отщепление сульфатной группы при C2 остатка на невозстанавливающем конце под действием SWF1 не оказало влияния на химические сдвиги других остатков. Аналогично, отщепление под действием сульфатазы SWF4 [123] сульфатной группы при C3 остатка на невозстанавливающем конце тетрасахарида LF1 не повлияло на химические сдвиги атомов других остатков (тетрасахарид T3) (Таблица 13).

Сопоставление химических сдвигов сигналов тетрасахаридов T2 и T3 (Таблица 13) показало, что наличие сульфатной группы при C3 остатка фукозы, связанного с остатком на восстанавливающем конце 1→3-связью, не оказывает заметного влияния на сигналы протонов остатка на восстанавливающем конце. Однако у остатка, связанного с ним 1→4-связью, это вызывает смещение сигнала H6 на 0,05 м.д. в сторону слабого поля.

На примере тетрасахаридов LF1 и LF5, а также их производных T3 и T4, полученных в результате воздействия на них сульфатазой SWF4 [123] и FWf1 [124] соответственно, видно, что в случае сульфатирования С4 остатка фукозы, связанного с остатком на невосстанавливаемом конце 1→3-связью, влияния на химические сдвиги остатка, связанного с ним 1→4-связью, также не наблюдалось. Однако присутствовало смещение сигналов остатка на невосстанавливаемом конце: Н3 на 0,16 м.д. в сторону слабого поля, Н5 на 0,11-0,14 м.д. в сторону сильного. Сравнение сдвигов сигналов T4 и тетрасахарида T5, отличающегося от T4 наличием сульфатной группы при С4 остатка фукозы на восстанавливаемом конце (Рисунок 22), выявило у связанного с ним 1→3-связью остатка аналогичное смещение сигналов Н3 и Н5, а также смещение Н1 на 0,07 м.д. в сторону слабого поля (Таблица 13).

Анализ спектров дисахарида D1, имеющего структуру  $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), и тетрасахарида LF5 показал, что в случае образования дисахаридом 1→4-связи с восстанавливаемого конца, химические сдвиги сигналов почти всех протонов его невосстанавливаемого остатка (кроме Н3) смещаются в сторону слабого поля на 0,1-0,8 м.д. Сравнение же сдвигов D1 и тетрасахарида T5 показало, что образование 1→4-связи с восстанавливаемого конца заметного влияния на химические сдвиги восстанавливаемого остатка не оказывает (Таблица 13).

Таким образом, на химические сдвиги моносахаридных остатков олигосахаридов оказывают заметное влияние количество и структура моносахаридных остатков, примыкающих к ним с восстанавливаемого конца молекулы, но не с невосстанавливаемого её конца.

Таблица 13 – Фукоолигосахариды с различным расположением сульфатных групп

Структура	Остаток	Химические сдвиги, м.д.						Ссылка
		H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6	
$\alpha$ -L-Fucp-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )- (1→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ - L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )  (T1)	$\alpha$ -L-Fucp-(1→3)-	5,06	3,80	3,96	3,83	4,46	1,21	[123]
		96,8	69,4	70,7	73,3	68,1	16,5	
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)-	5,27	4,57	4,19	4,11	4,44	1,24	
		100,3	74,6	72,9	70,1	68,6	16,5	
	→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	5,34	4,49	4,16	3,99	4,52	1,38	
		95,4	76,6	68,6	83,7	68,9	16,8	
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	5,48	4,51	4,05	4,08	4,23	1,24	
		91,7	74,7	73,9	69,9	67,2	16,7	
$\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp- (2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )- (1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )  (T2)	$\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	5,35	4,45	4,10	3,90	4,51	1,23	[122]
		95,1	76,5	68,6	73,4	68,0	16,4	
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)-	5,28	4,58	4,18	4,12	4,42	1,24	
		100,4	74,7	73,5	70,0	68,6	16,7	
	→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	5,34	4,48	4,16	3,99	4,52	1,38	
		95,4	76,6	68,6	83,7	68,9	16,8	
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	5,49	4,51	4,05	4,08	4,23	1,24	
		91,7	74,6	73,9	69,9	67,2	16,5	
$\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp- (2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )- (1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )  (T3)	$\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	5,36	4,46	4,11	3,90	4,51	1,23	[123]
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)-	5,28	4,57	4,19	4,11	4,43	1,29	
	→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	5,37	4,65	4,76	4,28	4,55	1,40	
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	5,50	4,54	4,06	4,09	4,23	1,24	
$\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L- Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)- $\alpha$ -L-Fucp- (2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )  (LF1)	$\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- (b)	5,39	4,58	4,72	4,22	4,59	1,26	[125]
		95,9	73,6	76,3	71,8	67,7	16,4	
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)- (d)	5,30	4,59	4,20	4,12	4,44	1,30	
		99,9	74,6	74,5	70,6	68,3	16,5	
	→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- (c)	5,37	4,65	4,76	4,27	4,57	1,41	
		96,4	73,8	75,2	80,5	69,1	16,9	
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (a)	5,50	4,54	4,06	4,09	4,24	1,24	
		91,7	74,6	75,0	70,4	67,1	16,7	

Структура	Остаток	Химические сдвиги, м.д.						Ссылка
		H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6	
$\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) <b>(LF5)</b>	$\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	5,40	4,58	4,88	4,26	4,45	1,25	[125]
	$\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	97,9	73,8	76,4	71,7	67,9	16,5	
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-	5,34	4,62	4,37	4,94	4,49	1,35	
	(1→4)-	99,9	75,3	73,5	80,8	68,8	17,1	
	→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-	5,37	4,64	4,75	4,29	4,55	1,40	
	(1→3)-	96,2	73,7	75,2	80,9	69,0	16,8	
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	5,50	4,54	4,05	4,09	4,23	1,24	
		91,7	74,6	74,9	70,3	67,1	16,6	
$\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) <b>(T4)</b>	$\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	5,34	4,46	4,28	3,90	4,40	1,24	[124]
	$\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	97,9	76,7	68,5	73,4	68,5	16,4	
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-	5,32	4,58	4,32	4,94	4,49	1,35	
	(1→4)-	100,0	75,1	73,4	80,9	68,7	17,1	
	→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-	5,37	4,63	4,75	4,28	4,55	1,40	
	(1→3)-	96,3	73,8	75,2	80,9	69,0	16,8	
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	5,50	4,54	4,05	4,09	4,23	1,24	
		91,8	74,7	75,0	70,4	67,1	16,7	
$\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) <b>(T5)</b>	$\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	5,35	4,46	4,27	3,90	4,39	1,25	
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-	5,33	4,58	4,32	4,92	4,50	1,34	
	(1→4)-	5,44	4,63	4,90	4,29	4,41	1,39	
	→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-	5,52	4,55	4,35	4,91	4,34	1,31	
	(1→3)-							
$\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) <b>(D1)</b>	$\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	5,39	4,53	4,89	4,21	4,37	1,23	
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	5,53	4,53	4,31	4,92	4,34	1,30	

Структура	Остаток	Химические сдвиги, м.д.						Ссылка		
		H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6			
$\alpha$ -L-Fucp-(1→2)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 ↓ $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3,4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) <b>(LF4)</b>	$\alpha$ -L-Fucp-(1→2)- <b>(n)</b>	5,11 100,7	3,83 69,3	3,91 70,4	3,80 73,2	4,32 68,0	1,20 16,5	[125]		
	→2)- $\alpha$ -L-Fucp-(1→4)- <b>(i)</b>	5,58 98,6	3,74 79,8	4,13 69,6	3,86 73,9	4,33 68,4	1,26 16,7			
	$\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- <b>(m)</b>	5,34 98,3	4,58 73,9	4,83 76,4	4,24 71,8	4,61 67,7	1,25 16,6			
	→3,4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)- <b>(l)</b>	5,37 100,1	4,70 75,4	4,20 77,5	4,44 79,2	4,43 70,0	1,41 17,4			
	→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- <b>(k)</b>	5,38 96,2	4,64 73,8	4,75 75,3	4,29 80,7	4,56 69,1	1,41 17,0			
	→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) <b>(j)</b>	5,50 91,8	4,54 74,6	4,05 74,9	4,09 70,3	4,23 67,1	1,24 16,7			
	$\alpha$ -L-Fucp-(1→2)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 ↓ $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3,4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) <b>(LF12)</b>	$\alpha$ -L-Fucp-(1→2)-	5,11 100,7	3,83 69,4	3,92 70,4	3,80 73,2	4,33 68,0		1,20 16,5	
	→2)- $\alpha$ -L-Fucp-(1→4)-	5,57 98,6	3,74 79,8	4,13 69,7	3,86 74,0	4,33 68,2	1,26 16,7			
	$\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	5,34 98,6	4,57 73,9	4,84 76,5	4,24 71,8	4,59 67,8	1,25 16,5			
	→3,4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)-	5,38 100,3	4,69 75,6	4,20 78,0	4,42 79,4	4,41 70,0	1,42 17,4			
→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	5,40 96,1	4,65 73,8	4,77 75,3	4,29 81,1	4,63 69,2	1,41 17,1				
→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)-	5,30 100,1	4,59 74,7	4,22 74,7	4,13 70,7	4,41 68,2	1,31 16,5				
→4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-	5,39 96,3	4,64 73,7	4,76 75,3	4,28 80,9	4,56 69,1	1,41 16,9				
→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	5,50 91,8	4,54 74,7	4,06 75,0	4,10 70,4	4,23 67,1	1,24 16,6				

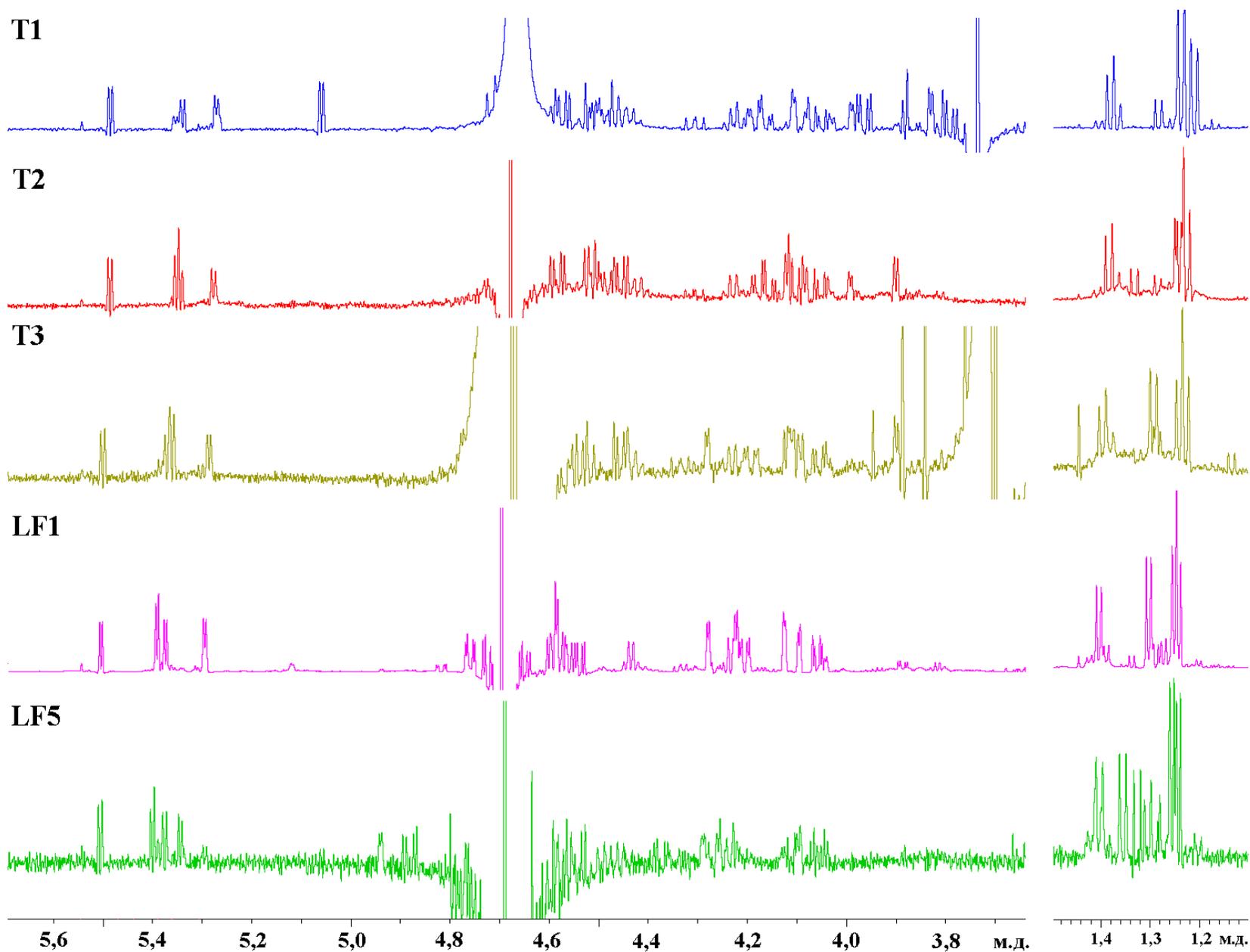


Рисунок 21 –  $^1\text{H}$  спектры ЯМР фукоолигосахаридов с различным расположением сульфатных групп

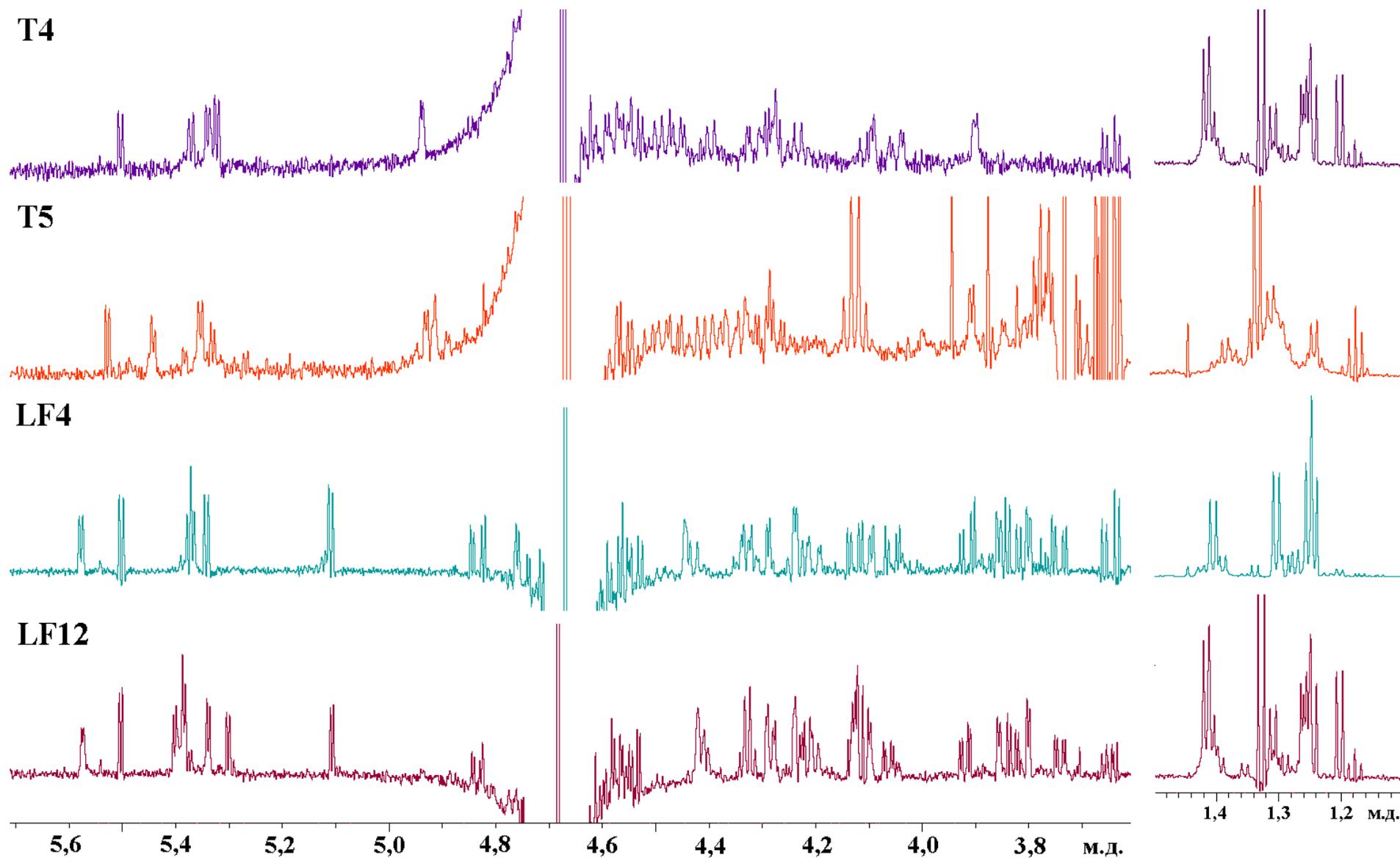


Рисунок 22 –  $^1\text{H}$  спектры ЯМР фукоолигосахаридов с различным расположением сульфатных групп (Т4 и Т5) и одинаковыми боковыми цепями при различной длине основной цепи

## 2.5. Получение фукоидан-хитозановых наночастиц

### 2.5.1 Компоненты наночастиц

Фукоиданы являются распространённым компонентом, который используется для создания наночастиц [126]. Однако применяемые фукоиданы зачастую недостаточно полно охарактеризованы и имеют неустановленную структуру, из-за чего сложно определить, какие характерные особенности полисахарида являются наиболее оптимальными для конструирования наночастиц.

Одним из факторов, влияющих на структуру фукоидана, является сезон сбора водоросли [127]. Было отмечено, что с ростом содержания полисахаридов в слоевище во время размножения моносахаридный состав фукоиданов заметно меняется [128].

Фукоидан **FeF2** с регулярной структурой был получен из водоросли *F. evanescens*, собранной на стадии размножения. Его изучение методом анионообменной хроматографии на колонке DEAE Macro-prep показало наличие всего одной фракции (Рисунок 23). Это необычно для экстрактов из *F. evanescens*, таких как фукоидан **FeF1**, которые обычно состоят из нескольких фракций [129]. Однако в случае **FeF2** единственная фракция была получена без каких-либо дополнительных модификаций.

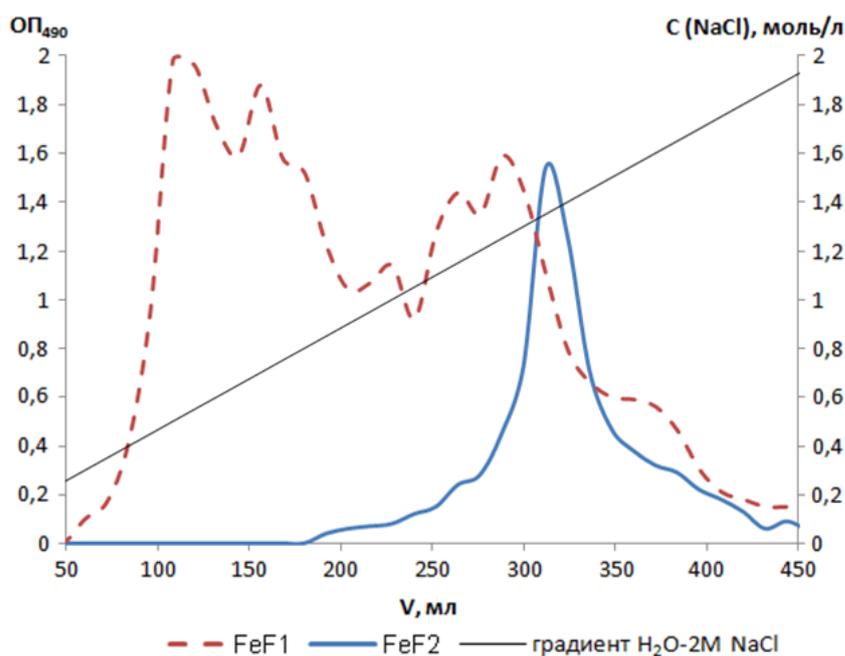


Рисунок 23 – Анионообменная хроматография фукоиданов **FeF1** и **FeF2** на колонке DEAE Macro-Prep (8×2,5 см)

В ходе исследования структуры **FeF2** методом ЯМР спектроскопии было установлено, что его структура аналогична структуре ранее выделенной из **FeF1** высокомолекулярной фракции:  $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2,4SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow ]_n$  (Рисунок 24). Для получения наночастиц нами был выбран способ самосборки, заключающийся в образовании ионных связей между положительно заряженными молекулами хитозана и отрицательно заряженными молекулами фукоидана.

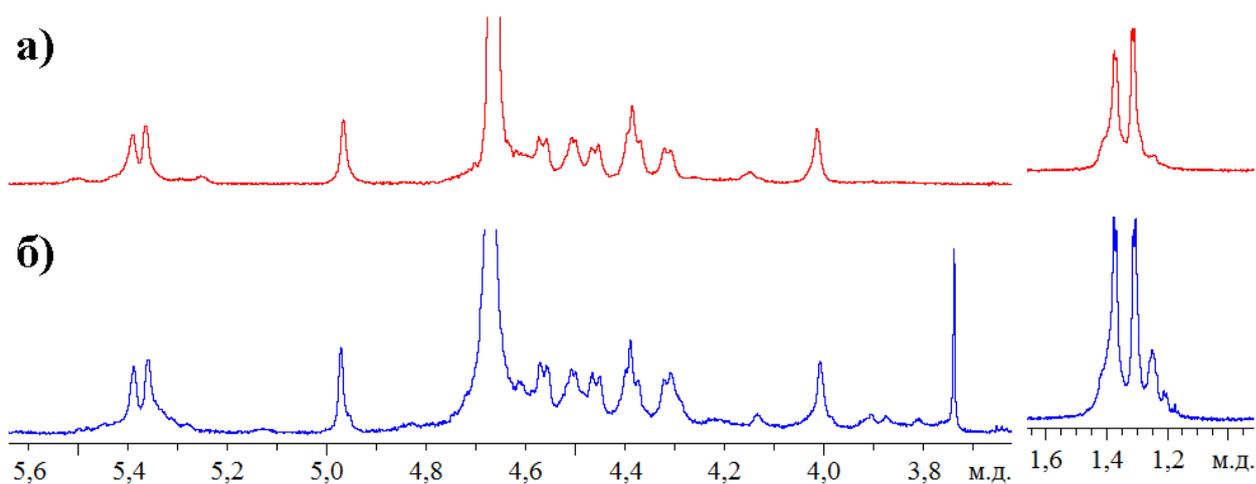


Рисунок 24 –  $^1\text{H}$  спектры ЯМР высокомолекулярной фракции, выделенной из **FeF1** (а) и регулярного фукоидана **FeF2** (б)

В нашей работе мы сравнили характеристики полиэлектролитных комплексов, полученных одинаковым способом и с использованием одного и того же хитозана, но с фукоиданами разной структуры, а именно: фукоидана из *F. evanescens* с регулярной структурой (**FeF2**), фукоидана из *F. evanescens* с менее регулярной структурой (**FeF1**), фукоидана **ScF** из *Saccharina cichorioides* и фукоидана **ShF** из *S. horneri* (Таблица 14). Нашей целью было установить, как структурные отличия этих фукоиданов могут влиять на их способность к образованию наночастиц.

Таблица 14 – Структурные характеристики используемых фукоиданов

Фукоидан / источник	Повторяющийся структурный фрагмент	Молекулярный вес, кДа	3D-структура
<b>FeF1</b> , <i>F. evanescens</i>	$\rightarrow 3)$ - $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , 4R <sub>1</sub> )-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , R <sub>2</sub> )-(1 $\rightarrow$ R <sub>1</sub> = OH; OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ; OCOCH <sub>3</sub> ; R <sub>1</sub> = $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ (2%)) R <sub>2</sub> = OH; OCOCH <sub>3</sub>	123	$\rightarrow 3)$ - $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ : J <sub>φ</sub> = 3,8-3,9 Hz J <sub>ψ</sub> = 4,5-5,6 Hz $\rightarrow 4)$ - $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ : J <sub>φ</sub> = 3,1-3,9 Hz J <sub>ψ</sub> = 3,3-3,8 Hz [130]
<b>FeF2</b> , <i>F. evanescens</i>	$\rightarrow 3)$ - $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , 4 SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$	340	
<b>ScF</b> , <i>S. cichorioides</i>	$\rightarrow 3)$ - $\alpha$ -L-Fucp-(2R <sub>1</sub> ,4R <sub>2</sub> )-(1 $\rightarrow$ R <sub>1</sub> = $\alpha$ -L-Fucp-(2,4R <sub>2</sub> )-(1 $\rightarrow$ 2)-; OH; OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> R <sub>2</sub> = OH; OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	773	
<b>ShF</b> , <i>S. horneri</i>	$\rightarrow 3)$ - $\alpha$ -L-Fucp-(2SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , 4R)-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2,3SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$ R = OH; OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ; $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ ; $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(4SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1 $\rightarrow$ .	> 1000	

Структура хитозана была исследована методом ЯМР. Химические сдвиги сигналов, наблюдаемые в его протонном и углеродном спектрах (Рисунок 25), соответствуют ранее полученным данным [131]. Путём анализа интегралов сигналов протонов хитозана было установлено, что его степень деацетилирования составляет 94%.

Используемые фукоиданы сильно отличались не только структурой, но и молекулярным весом. Молекулярный вес **FeF1** составлял 123 кДа, **FeF2** – 340 кДа, **ScF** – 773 кДа, а **ShF** – более 1000 кДа. Применение **ScF** и **ShF** для создания наночастиц привело к образованию агрегатов, по-видимому, в связи с их большим молекулярным весом. Иная трёхмерная конфигурация – основная цепь из 1 $\rightarrow$ 3-связанных остатков фукозы (**ScF**) или большое количество несультфатированных боковых цепей (**ShF**) – также могла оказать влияние на способность фукоиданов к формированию полиэлектролитных комплексов с молекулами хитозана. В

дальнейшем исследовании мы использовали только фукоиданы **FeF1** и **FeF2**, выделенные из *F. evanescens*.

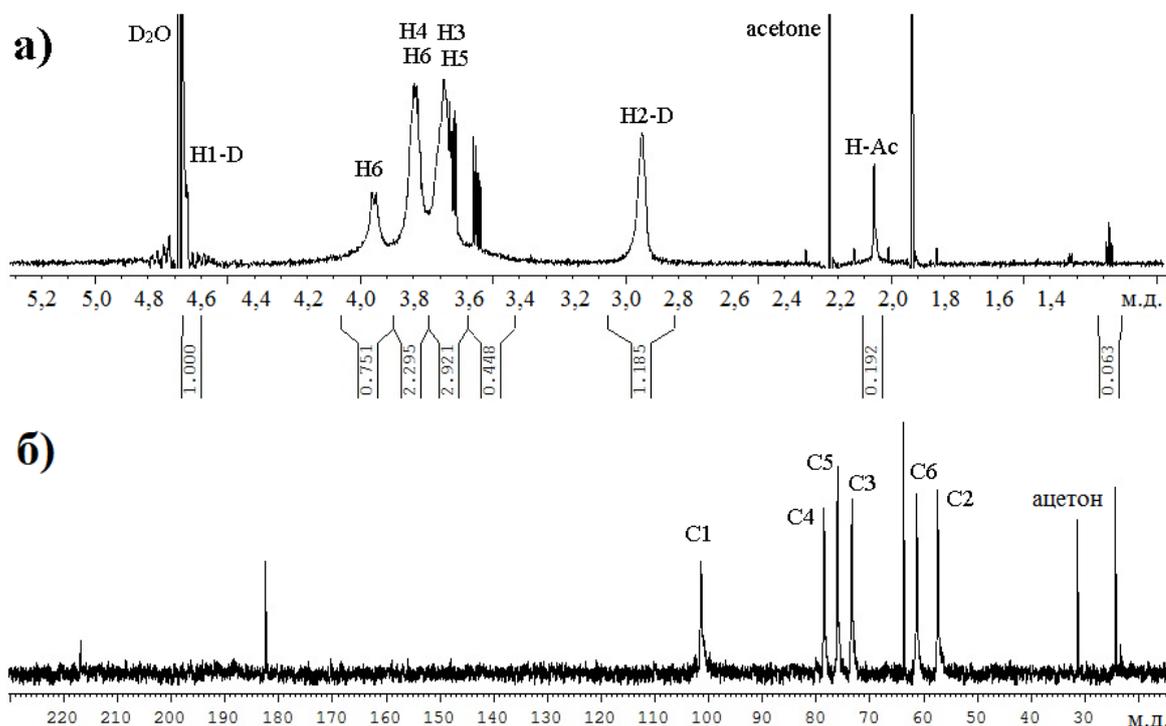


Рисунок 25 – Спектры ЯМР хитозана  $^1\text{H}$  (а) и  $^{13}\text{C}$  (б)

### 2.5.2 Характеристика наночастиц

Известно, что соотношение компонентов значительно влияет на параметры получающихся наночастиц, в частности, на их размер и  $\zeta$ -потенциал. Нами были получены наночастицы при следующих значениях соотношения объёмов фукоидана (0,1% водный раствор) к хитозану (0,1% раствор в 0,2% уксусной кислоте) 1:1, 1,25:1, 1,5:1, 1,75:1 и 2:1. В обоих случаях с ростом количества фукоидана увеличивался и размер частиц. Частицы, образованные с участием **FeF2**, были крупнее, чем образованные с участием **FeF1**, предположительно из-за большего молекулярного веса **FeF2** (Рисунок 26а). Дзета-потенциал частиц при соотношении 1:1 в обоих случаях был положительным, что говорит о том, что на их поверхности находился положительно заряженный хитозан. С ростом содержания фукоидана дзета-потенциал наночастиц сместился в область отрицательных значений, по-видимому, в результате пространственной трансформации полиэлектролитных комплексов таким образом, что снаружи оказался фукоидан. В случае наночастиц, образованных с участием **FeF2**, это

произошло, как только массовое соотношение содержащегося в растворе фукоидана к хитозану превысило 1:1, в то время как дзета-потенциал частиц, образованных с участием **FeF1**, сместился в область отрицательных значений, только когда соотношение **FeF1**:хитозан превысило 1,5:1 (Рисунок 26б).

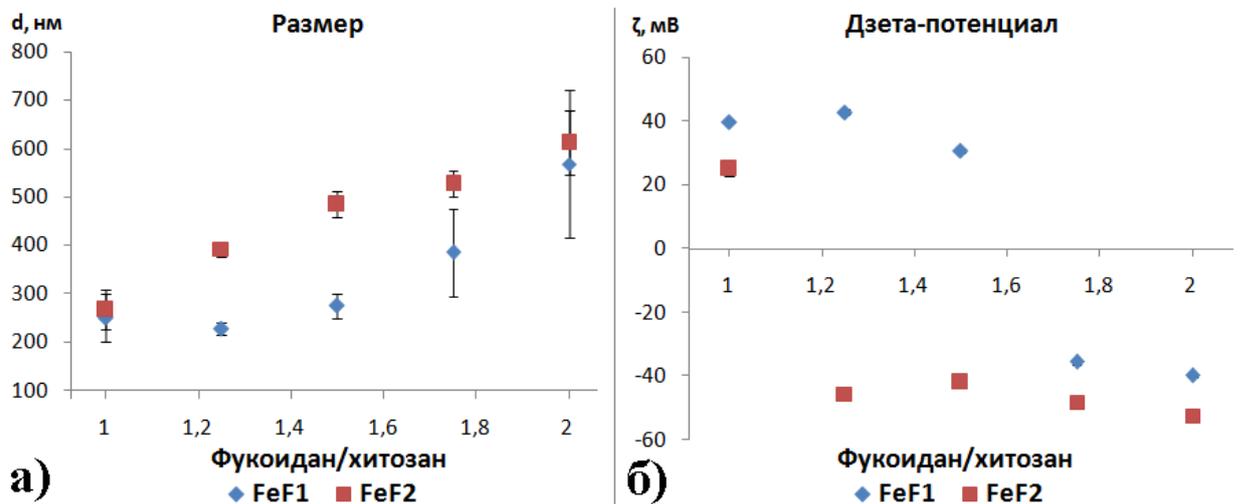


Рисунок 26 – Влияние соотношения масс фукоидана и хитозана на размер (а) и дзета-потенциал (б) полиэлектролитовых наноконплексов, созданных с использованием фукоиданов **FeF2** и **FeF1**, перерастворённых в воде

Были построены трёхмерные модели фукоидана **FeF2** и хитозана. Обе модели представляли отрезки цепей длиной 50 моносахаридных остатков. Модель фукоидана **FeF2** из *F. evanescens*, основная цепь которого состоит из чередующихся 1→3- и 1→4-связанных остатков, продемонстрировала спиралевидную структуру, что соответствует ранее рассчитанным данным [3]. Необходимо отметить, что моделирование осуществлялось для идеализированных структур фукоиданов, так как учесть все особенности структуры нерегулярных полисахаридов в теоретических моделях невозможно.

На основе модели комплекса **FeF2** с хитозаном при молекулярном соотношении 1:1 (Рисунок 27а, б), полученной путём молекулярного докинга, был сконструирован олигомер. Видно, что его внешнюю поверхность могут образовывать молекулы хитозана (Рисунок 27в, г). В кислой среде молекулы фукоидана протонируются и могут взаимодействовать между собой, образуя олигомер. Сконструированная модель согласуется с нашими данными о

положительном заряде **FeF2**-хитозановых комплексов при массовом соотношении 1:1.

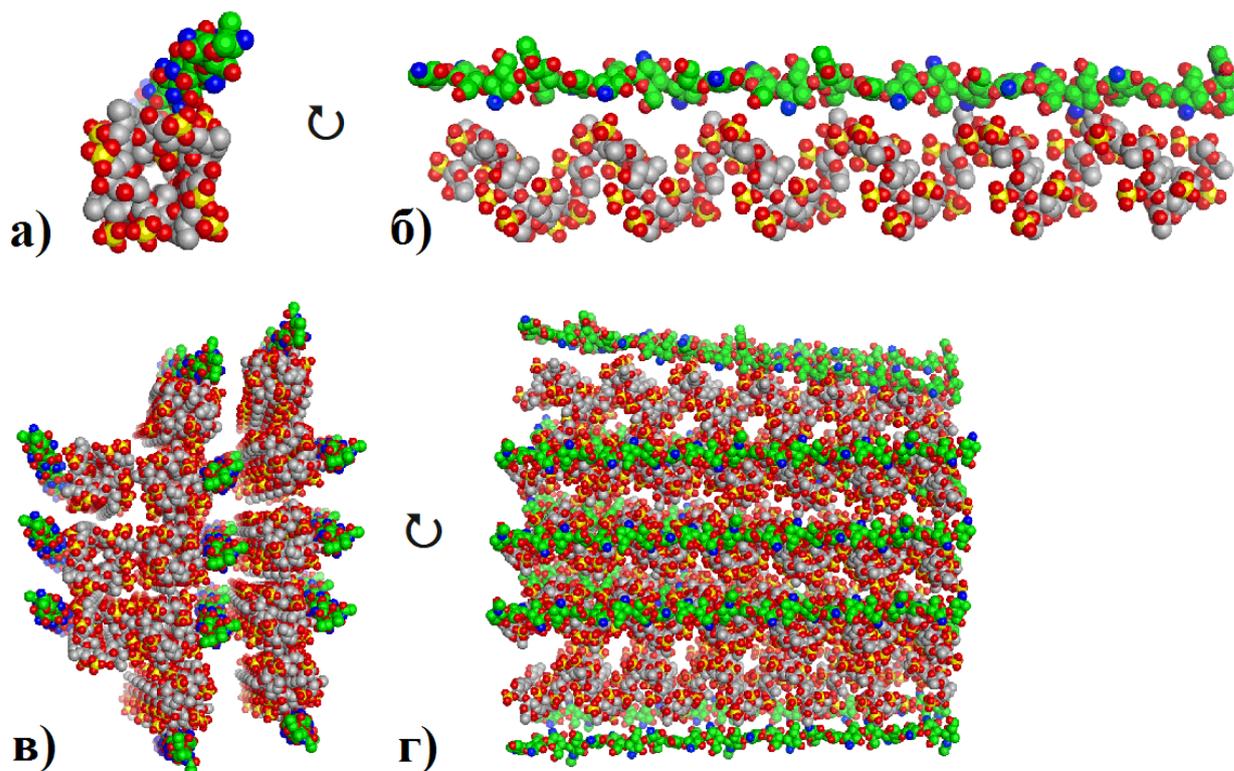


Рисунок 27 – Теоретические модели комплекса **FeF2**-хитозан (1:1) (а, б) и олигомера из этих комплексов (в, г). Молекулярные структуры показаны в виде пространственных моделей, где молекулы хитозана показаны зелёным цветом, атомы азота – синим, молекулы **FeF2** – серым, атомы серы и кислорода – жёлтым и красным

Путём молекулярного докинга из **FeF2**-хитозанового комплекса с молекулярным соотношением 2:1 (Рисунок 28а, б) был сконструирован олигомер. При таком соотношении молекул внешнюю поверхность олигомера образуют молекулы фукоидана (Рисунок 28в, г). Соответственно, поверхностный заряд и свойства полиэлектролитных комплексов фукоидана и хитозана могут отличаться в зависимости от соотношения их молекул.

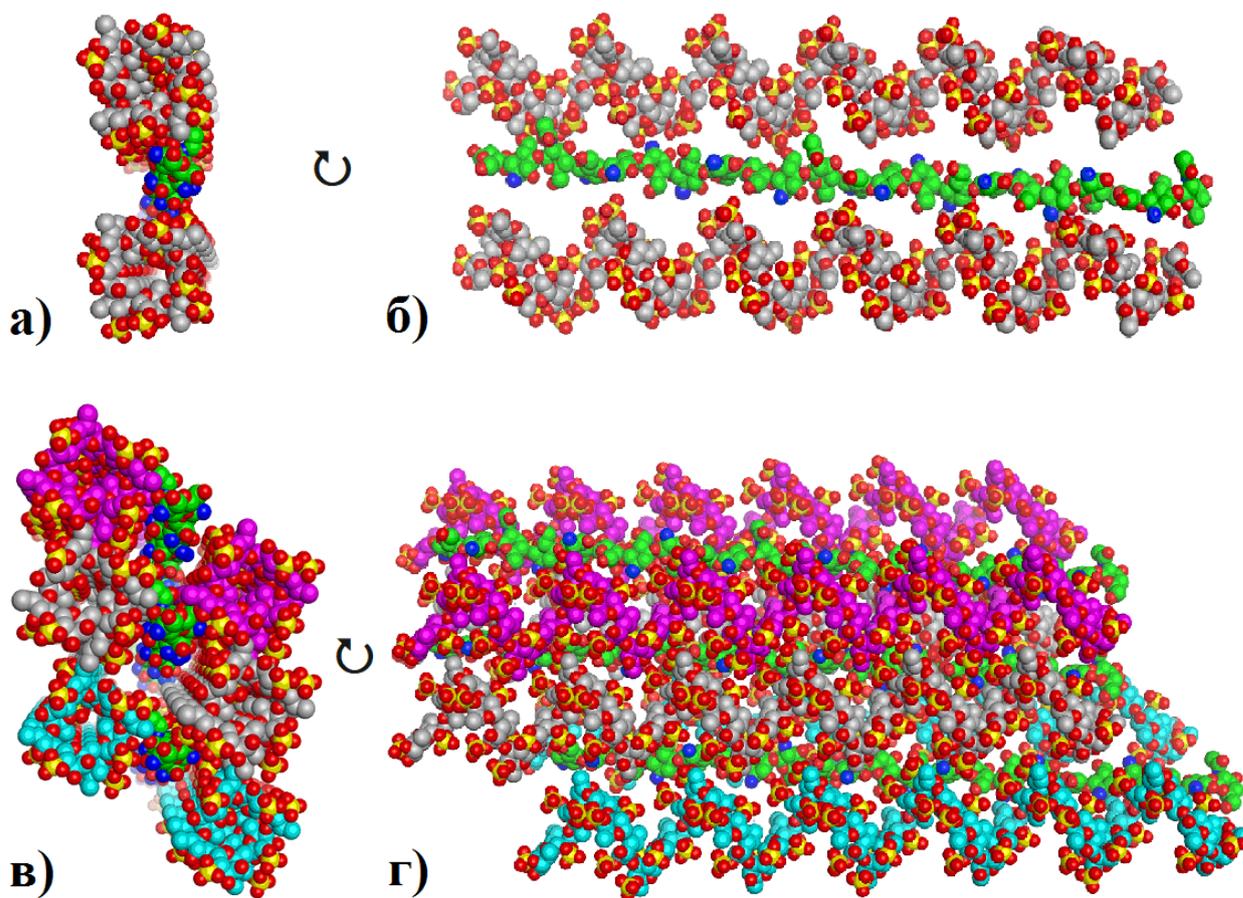


Рисунок 28 – Теоретические модели комплекса **FeF2**-хитозан (2:1) (а, б) и олигомера из трёх таких комплексов (в, г). Молекулярные структуры показаны в виде пространственных моделей, где молекулы хитозана показаны зелёным цветом, молекулы **FeF2** в олигомере – серым, бирюзовым и лиловым, атомы азота, серы и кислорода – синим, жёлтым и красным соответственно

Термодинамические параметры связывания фукоидана и хитозана были исследованы методом изотермической титрационной калориметрии (Рисунок 29). **FeF1**, **FeF2** и хитозан растворяли в 0,1% уксусной кислоте, чтобы предотвратить тепловые эффекты, связанные с взаимодействием растворителей в ходе образования комплексов. 500 мкл 0,1% раствора хитозана титровали 50 мкл 1,0% раствора фукоидана.

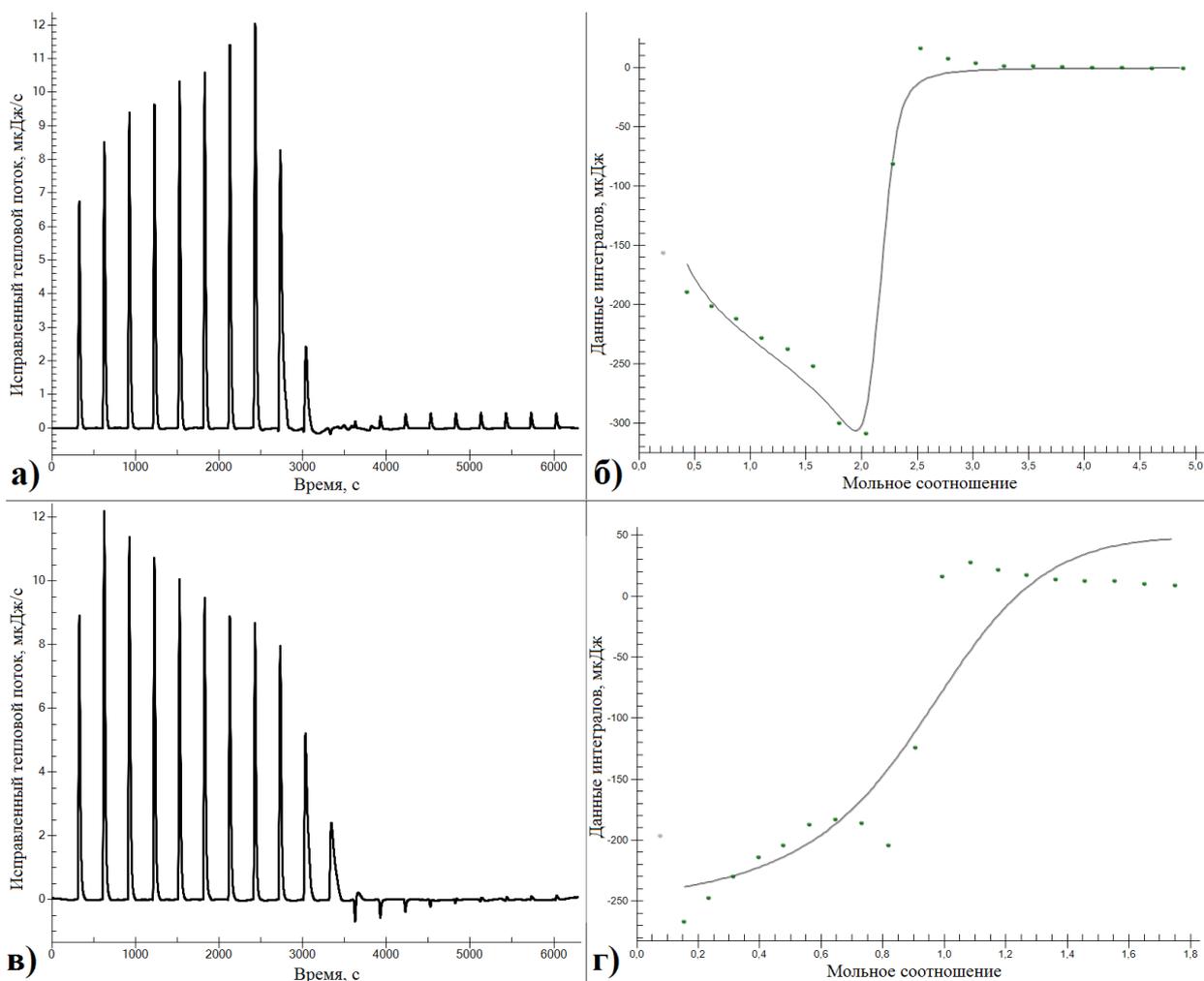


Рисунок 29 – Калориметрические термограммы титрования хитозана фукоиданами **FeF1** (а) и **FeF2** (в); (б) и (г) их соответствующие кривые титрования

Характер кривых титрования (Рисунок 29б, г) указывал на наличие более чем одного центра связывания. Мы подбирали к ним различные модели, наибольшее соответствие из которых в обоих случаях показала модель, соответствующая двум последовательным процессам. При этом термограммы показали весьма существенные отличия при титровании хитозана фукоиданами **FeF1** и **FeF2** (Рисунок 29а, в). Каждый процесс связывания характеризуется отдельной энтальпией ( $\Delta H$ ), способностью связывания ( $K_a$ ) и изменением энтропии ( $\Delta S$ ) (Таблица 15). Несмотря на структурное сходство фукоиданов, значения этих параметров являются противоположными для первого и второго процессов связывания. Так, в ходе первого события связывания ( $K_{a1}$ ) аффинность слабее, чем у второго ( $K_{a2}$ ) в случае **FeF1**, тогда как в случае **FeF2** – наоборот.

Таблица 15 – Термодинамические параметры модели двух последовательных процессов взаимодействия фукоидана и хитозана при 298 К

Процесс	FeF1		FeF2	
	1	2	1	2
Ка [M <sup>-1</sup> ]	8,2·10 <sup>6</sup>	1,0·10 <sup>8</sup>	7,4·10 <sup>6</sup>	1,4·10 <sup>5</sup>
ΔH [кДж·моль <sup>-1</sup> ]	1490	-3860	-3419	4030
ΔS [кДж·моль <sup>-1</sup> ·К <sup>-1</sup> ]	5,145	-12,840	-11,32	13,59
TΔS [кДж·моль <sup>-1</sup> ]	1533	-3826	-3379	4050
ΔG [кДж·моль <sup>-1</sup> ]	-41 ± 2	-40 ± 6	-40 ± 0	-25 ± 5

На термодинамической диаграмме первого события связывания видно, что для **FeF1** изменение и энтальпии (ΔH), и энтропии (ΔS) является положительным (Рисунок 30а), тогда как для **FeF2** – отрицательным (Рисунок 30в). Хотя первое событие связывания хитозана является экзотермическим для обоих фукоиданов, у **FeF1** количество выделяемого тепла продолжает расти, тогда как у **FeF2** оно уменьшается. Это можно объяснить тем, что взаимодействие молекул хитозана и фукоидана приводит к их структурной реорганизации с последующим высвобождением противоионов [132]. Предположительно, из-за меньшей регулярности их структуры молекулы **FeF1** связываются с молекулами хитозана более хаотичным образом, чем молекулы **FeF2**. Кроме того, поскольку их молекулярный вес меньше, чем хитозана, молекула хитозана может связываться с более чем одной молекулой **FeF1**; соответственно, рост концентрации фукоидана **FeF1** приводит к увеличению количества возможных конфигураций полиэлектролитных комплексов, что вызывает рост выделения тепла и структурные трансформации. Молекулы **FeF2** же регулярны и крупнее молекул хитозана, следовательно, молекула хитозана с высокой вероятностью связывается лишь с одной молекулой **FeF2**. По мере возрастания концентрации **FeF2** количество молекул хитозана, с которыми могут взаимодействовать молекулы **FeF2**, снижается.

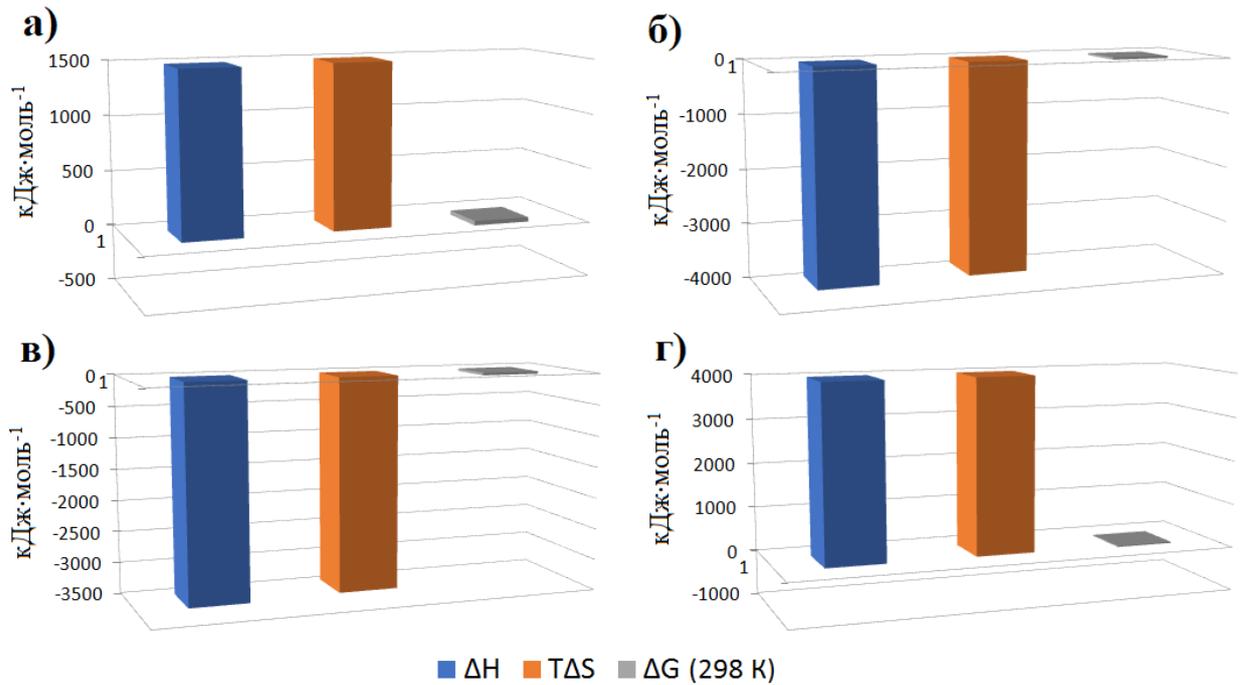


Рисунок 30 – Термодинамические диаграммы первого и второго событий связывания **FeF1** (а, б) и **FeF2** (в, г) с3 хитозаном в 0,1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$

Как мы видим по калориметрическим термограммам и кривым титрования фукоиданов (Рисунок 29), когда их молярное соотношение превышает точку перехода (2:1 для **FeF1**, 0,8:1 для **FeF2**), выделение тепла в обоих случаях падает, а затем слегка возрастает. Предположительно, это вызвано тем, что заканчиваются свободные аминогруппы, с которыми новые молекулы фукоидана могли бы образовывать ионные связи, и перестают высвобождаться противоионы. Однако образовавшиеся полиэлектролитные фукоидан-хитозановые комплексы способны взаимодействовать друг с другом и свободными фукоидановыми молекулами благодаря силам Ван-дер-Ваальса, в результате чего тепловыделение несколько возрастает. Это может объяснить, почему у **FeF2** аффинность второго процесса связывания меньше, чем первого, равно как и положительные значения  $\Delta H$  и  $\Delta S$  (Рисунок 30г). Отрицательные значения  $\Delta H$  и  $\Delta S$  у второго процесса связывания **FeF1** (Рисунок 30б) и его значительно большая аффинность, чем у первого процесса, предположительно, вызваны тем, что по завершении хаотического образования комплексов **FeF1** с хитозаном комплексы достигают энергетически выгодного упорядоченного состояния.

### 3. Материалы и методы

#### 3.1. Источники полисахаридов

Бурая водоросль *Fucus evanescens* была собрана в июле 2008 г. у побережья острова Итуруп и в августе 2008 в Охотском море (остров Кунашир, Курилы). Водоросль *Saccharina cichorioides* была собрана в сентябре 2009 г. в бухте Троицы (Японское море) на Морской экспериментальной станции Тихоокеанского института биоорганической химии (ТИБОХ) ДВО РАН, Хасанский район Приморский край. Водоросль *Sargassum horneri* была собрана в июле 2016 г. в бухте Хуцюань (Жёлтое море), Циндао, Китай.

Хитозан (молекулярная масса 200 кДа) был приобретён в Sigma-Aldrich, Исландия.

#### 3.2. Материалы

CaCl<sub>2</sub>, HCl, NaCl, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, фенол, серная кислота, трифторуксусная кислота, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Вектон, Россия), D<sub>2</sub>O (ООО Кемикал Лайн, Россия).

#### 3.3. Выделение и очистка фукоиданов

Сухие водоросли обезжиривали 70% этанолом при соотношении масс 1:1 в течение 10 суток при комнатной температуре. Обезжиренные водоросли высушивали на воздухе, измельчали и дважды экстрагировали 2% раствором CaCl<sub>2</sub> в течение 3 ч при 60°C. Экстракты объединяли, фильтровали и подвергали ультрафильтрации на мембране 100 кДа. Концентрат наносили на колонку с DEAE-сефарозой (5×25 см), уравновешенной 0,01 М HCl. Колонку промывали двумя объёмами 0,01 М HCl и элюировали в линейном градиенте NaCl от 0,5 до 2 М. Фракции, содержащие полисахариды, объединяли, диализовали и лиофильно высушивали.

### 3.4. Получение и выделение продуктов ферментативного гидролиза

Фукоидан (1 г) растворяли в 98 мл 0,02 М буферного раствора Tris-HCl, pH 7,0, с 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и добавляли 2 мл рекомбинантной фукоиданазы FFA1 (0,1 мг/мл), полученной из морской бактерии *Formosa algae* [125]. Полученную смесь инкубировали при 34 °С 72 часа и затем депротеинизировали нагреванием при 80 °С в течение 10 мин, осадок удаляли с помощью центрифугирования. Высокомолекулярные продукты реакции (HMP) осаждали из надосадочной жидкости этанолом при соотношении 1:3 (о/о), осадок отделяли путём центрифугирования при 10 000 g в течение 40 мин и высушивали путём обработки ацетоном. Надосадочную жидкость, содержащую низкомолекулярные продукты реакции (LMP), концентрировали и наносили на колонку с Q-сефарозой (GE Healthcare Bio-Sciences, Швеция) (1×10 см), уравновешенной водой. Олигосахариды элюировали с носителя в линейном градиенте NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> от 0,5 М до 2,5 М (общий объём 150 мл) со скоростью 1 мл/мин. Фракции, содержащие углеводы, объединяли, концентрировали и обессоливали на колонке Sephadex G-10 (1×25см).

### 3.5. Разделение высокомолекулярных продуктов ферментативного расщепления фукоидана на DEAE-Macro prep

Фракцию, содержащую высокомолекулярные продукты реакции, наносили на колонку DEAE-Macro prep (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) (2,5×10 см). Полисахариды элюировали с носителя в линейном градиенте NaCl от 0 до 2 М, (общий объём 1 л). Фракции, содержащие углеводы, объединяли, диализовали и лиофильно высушивали. Анализ отдельных фракций проводили с помощью гель-фильтрации, электрофореза и спектроскопии ЯМР.

### 3.6. Определение моносахаридного состава

Общее количество углеводов во фракциях определяли фенол-серноокислотным методом [133]. К 200 мкл образца приливали 200 мкл 5% раствора фенола и 1 мл концентрированной серной кислоты. Получившийся раствор интенсивно

перемешивали, после чего нагревали на водяной бане при температуре 95 °С 10 мин. Поглощение измеряли на спектрофотометре при длине волны 490 мкм. Концентрацию общих сахаров рассчитывали по калибровочным графикам. В качестве стандарта использовали фукозу.

Количество сульфатных групп определяли турбидиметрическим методом [134]. Моносахаридный состав после гидролиза полисахаридов 2М трифторуксусной кислотой (6 ч, 100 °С) анализировали на ВЭЖХ с использованием колонки ISA-07/S2504 (0,4 × 25 см). Моносахариды элюировали в линейном градиенте калий-боратного буферного раствора (0-0,3 М), рН 8,3. Детектирование осуществляли бицинхониатным методом [135].

### **3.7. Анализ методом гель-фильтрации**

Молекулярную массу образцов определяли с помощью ВЭЖХ Agilent 1100 Series (Agilent, Германия), оснащённого рефрактометрическим детектором и последовательно соединёнными колонками TSK gel G4000 SW и TSK gel G2000 SW (Tosoh Co., Япония) или Shodex OHpak SB-805 HQ и OHpak SB-803 HQ, (Showa Denko, Япония). Элюирование проводили 0,05 М раствором Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 50 °С со скоростью 0,5 мл/мин или 0,15 М раствором NaCl при 40 °С со скоростью 0,4 мл/мин. Молекулярную массу фукоидана и продуктов его ферментативного гидролиза оценивали, используя в качестве аналитических стандартов декстраны молекулярной массой в 6, 10, 40, 70, 100, 200 и 500 кДа (Sigma, США) или 5, 10, 25, 50, 80, 250, 410 и 670 кДа (Sigma-Aldrich, Германия).

### **3.8. Электрофорез продуктов ферментативного расщепления фукоиданов**

Продукты гидролиза фукоидана (0,5 мг) смешивали с 25 мкл буфера, содержащего 20% раствор глицерина в воде и 0,02% феноловый красный (4-х буфер). Затем полученную смесь (5 мкл) разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле: 5% концентрирующий гель с 50 мМ Tris-HCl буферным раствором, рН 6,8, и 27% разделяющий гель с 150 мМ Tris-HCl буферным

раствором, pH 8,8. Толщина геля – 1 мм. Гель окрашивали при помощи раствора, содержащего 0,02% раствор О-толуидинового синего и 0,3% альциановый синий в растворе EtOH, AcOH и H<sub>2</sub>O с объёмным соотношением 2:1:1, или 0,05% раствором альцианового синего 8 GX в 2% уксусной кислоте.

### 3.9. Спектроскопия ЯМР

Одномерные (<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C) и двумерные (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC) спектры ЯМР были сняты на спектрометрах Avance III-700 (Bruker Biospin AG, Швейцария) и Avance II-500 HD (Bruker, Германия). Каждый поли- и олигосахарид растворяли в 550 мкл D<sub>2</sub>O. К раствору добавляли 2 мкл ацетона в качестве калибровочного стандарта (2,225 м.д.) и затем вносили его в стеклянную ампулу диаметром 5 мм. Ампулу помещали в магнит, где она достигала термического равновесия, после чего начинался эксперимент, рабочая температура при котором составляла 35 °С. Релаксационная задержка составляла 1,5–2 с (<sup>1</sup>H и 2D-эксперименты) и 1–2 с (<sup>13</sup>C-эксперименты). Каждый двумерный эксперимент включал 16 холостых сканирований для достижения образцом стационарного состояния. Время прецессирования в 2D-экспериментах составляло 3 мкс. Использовалась разновидность COSY-45 (второй импульс поворачивал вектор намагниченности на 45°).

### 3.10. Получение наночастиц

Наночастицы, представляющие собой комплексы фукоидана и хитозана, были получены по методу, описанному Ли и Лимом [136]. Для получения наночастиц к раствору хитозана (1 мг/мл) в 0,2% уксусной кислоте дроп-методом добавляли раствор фукоидана (1 мг/мл) в воде до достижения соотношений по объёму 1:1, 1,25:1, 1,5:1, 1,75:1, 2:1. Растворы интенсивно перемешивали на магнитной мешалке. После добавления фукоидана полученную смесь в течение 2 мин обрабатывали ультразвуком частотой 20 кГц. Наночастицы от агрегатов наночастиц отделяли центрифугированием при 28,6 g в течение 5 мин. Суспензию готовых наночастиц далее подвергали центрифугированию при 7557,7 g в течение

10 минут. Супернатант удаляли, осадок, содержащий наночастицы, растворяли в объёме воды, соответствовавшем 0,5 объёма исходного раствора, и в течение 4 мин обрабатывали ультразвуком частотой 20 кГц.

#### *Характеристика хитозана*

Степень деацетилирования (DDA) хитозана была установлена методом  $^1\text{H}$  спектроскопии ЯМР [137]. Расчет проводили по формуле:

$$DDA(\%) = \left( \frac{H1D}{H1D + HAc/3} \right) \times 100\%$$

где H1-D и H-Ac – интегралы пика аномерного протона деацетилированного мономера (H1-D) и пика трех протонов ацетильной группы соответственно.

### **3.11. Измерение размера и заряда наночастиц**

Размер и заряд наночастиц определяли методом динамического светорассеяния с использованием Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Великобритания). Измерения проводили при комнатной температуре, показатель преломления 1,33. Для каждого образца было проведено 5 измерений размера частиц и 5 измерений их поверхностного  $\zeta$ -потенциала. При помощи программы Zetasizer Software (Malvern Instruments, Великобритания) были рассчитаны средние значения этих величин и их стандартные отклонения.

### **3.12. Компьютерное моделирование наноструктур**

Пространственные структуры фукоидана и хитозана были построены при помощи программы GLYCAM-Web ([http://glycam.org/old/carbohydrates/cb\\_newbuilder.jsp?tool=crystallography&option=ff99:glycam06](http://glycam.org/old/carbohydrates/cb_newbuilder.jsp?tool=crystallography&option=ff99:glycam06)). Структуры фрагментов фукоидана и хитозана были сольватированы, протонированы при pH 4 и минимизированы при помощи силового поля Amber10:ЕНТ программы MOE 2020.09 (Chemical Computing Group ULC, Канада). Для молекулярного докинга фукоидана и хитозана использовали программу GRAMM v1.03 (Global Range Molecular Matching program) [138-140]. Структуры олигомеров комплексов

фукоидана с хитозаном были получены при помощи молекулярного докинга (2:1), либо вручную (1:1). Для их анализа и визуализации была использована программа MOE 2020.09.

### **3.13. Изотермическая титрационная калориметрия**

Изменения энтропии и энтальпии и константы ассоциации были измерены на калориметре Nano ITC (TA Instruments, USA) и проанализированы с использованием программы Nano Analyze (TA Instruments, USA). Использовали метод последовательных инъекций титранта с последующим вычитанием данных, полученных для холостых инъекций. 190 мкл 0,1% раствора хитозана в 0,1% уксусной кислоте титровали 1% раствором в 0,1% уксусной кислоте аликвотами по 2,5 мкл через каждые 5 мин, всего 20 аликвот. Перемешивание раствора в титровальной ячейке проводили при скорости 350 об/мин и температуре +25 °С. Ячейка сравнения была наполнена 500 мкл деионизованной воды.

## Заключение

Проведённое нами исследование показало, что применение ферментативной деполимеризации в сочетании с методами спектроскопии ЯМР является эффективным способом установления структур полисахаридов. Результаты, полученные в ходе исследования фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens*, позволили установить новые подробности в строении его молекул; таким образом, в настоящее время структура этого фукоидана установлена более чем на 95%. С помощью спектроскопии ЯМР была установлена структура низко- и высокомолекулярных фрагментов фукоидана из *S. horneri*. На основе полученной информации было реконструировано 94% структуры этого фукоидана.

Нами впервые были получены хитозан-фукоидановые наночастицы на основе фукоидана из *F. evanescens* с полностью установленной структурой, что создаёт потенциал для установления структурных особенностей самих наночастиц и их использования в качестве лекарственных средств. Было показано, что фукоиданы с чередующимися 1→3; 1→4 гликозидными связями более предпочтительны для получения однородных наночастиц.

## Выводы

1. С использованием подхода, сочетающего ферментативный гидролиз фукоиданов и анализ полученных высоко- и низкомолекулярных фрагментов методом спектроскопии ЯМР, значительно уточнена структура фукоидана из *Fucus evanescens* и установлена структура нового фукоидана из *Sargassum horneri*.
2. Высокомолекулярный фрагмент фукоидана из *F. evanescens* состоит из регулярного фрагмента со структурой  $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(2,4\text{SO}_3^-)\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(2\text{SO}_3^-)\text{-}(1\rightarrow)]_n$ . Он может быть использован для создания лекарственных препаратов на основе фукоидана.
3. С помощью ферментативного гидролиза впервые получены семь низкомолекулярных фрагментов фукоидана из *S. horneri*. Структуры шести из них установлены методами двумерной спектроскопии ЯМР. Основная цепь каждого олигосахарида состоит из повторяющегося дисахаридного  $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(2\text{SO}_3^-)\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(2,3\text{SO}_3^-)\text{-}(1\rightarrow)]$  фрагмента. У одного из олигосахаридов имеется сульфатная группа при C4. Четыре олигосахарида линейные (степень полимеризации 4, 6, 8, 10), два – разветвлённые (гекса- и октасахарид). Боковые цепи состоят из несульфатированного дисахаридного фрагмента с 1→2-связью между остатками фукозы, присоединённого к основной цепи при C4 остатка фукозы.
4. Из фукоидана из *S. horneri* впервые получены три регулярных высокомолекулярных фрагмента, структура одного из которых установлена полностью, двух – частично. Полисахарид, структура которого установлена полностью, состоит из регулярно повторяющегося  $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(2\text{SO}_3^-)\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(2,3\text{SO}_3^-)\text{-}(1\rightarrow)]$  фрагмента основной цепи и разветвлений со структурой  $\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(1\rightarrow)$ , связанных с основной цепью 1→4-связями. Эти элементы структуры основной цепи и боковые цепи входят в состав другого полисахарида. У третьего основная цепь состоит преимущественно из повторяющегося  $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(2\text{SO}_3^-)\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(2,3\text{SO}_3^-)\text{-}(1\rightarrow)]$  фрагмента, а менее часто повторяющиеся боковые цепи – из  $\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(4\text{SO}_3^-)\text{-}(1\rightarrow)$  фрагмента.

5. Для получения наночастиц впервые использованы два фукоидана из *F. evanescens*, фукоидан из *S. cichorioides* и фукоидан из *S. horneri*, отличающиеся структурами и молекулярной массой. Показано, что высокомолекулярные полисахариды из *S. cichorioides* и *S. horneri* (последний также является высокоразветвлённым) образуют агрегаты, но не наночастицы
6. Методом самосборки получены наночастицы из хитозана и двух видов фукоидана из *F. evanescens*: регулярного/высокомолекулярного и менее регулярного/низкомолекулярного. С ростом содержания фукоидана частицы увеличиваются, а их дзета-потенциал смещается в область отрицательных значений. Их термодинамические параметры показывают существенное различие процессов связывания фукоидана и хитозана в зависимости от используемого фукоидана.
7. Структура фукоидана из *F. evanescens* является наиболее подходящей для получения наночастиц методом самосборки.

## Список литературы

1. Sinurat E., Rosmawaty P., Saepudin E. Purification and characterization of fucoidan from the brown seaweed *Sargassum binderi* Sonder // *Squalen Bull. Mar. & Fish. Postharvest & Biotech.* – 2015. – V. 10, No. 2. – P. 79–87.
2. Воловенко Ю.М., Карцев В.Г., Комаров И.В., Туров А.В., Хиля В.П. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса для химиков // М.: МБФНП (ICSPF), 2011. – 704 с.
3. Грачев А.А. Спектральное (ЯМР) и конформационное исследование олигосахаридов, отвечающих фрагментам фукоиданов // М.: РАН, ИОХ, 2006. – 136 с.
4. Сергеев Н.М. Спектроскопия ЯМР // М.: Моск. унив-т, 1981. – 279 с.
5. Шашков А.С., Чижов О.С. Спектроскопия <sup>13</sup>C-ЯМР в химии углеводов и родственных соединений // *Биоорг. химия.* – 1976. – V. 2, No. 4. – P. 437–497.
6. Bilan M.I., Ustyuzhanina N.E., Shashkov A.S., Thanh T.T.T., Bui M.L., Tran T.T., Bui V., Nifantiev N.E., Usov A.I. A sulfated galactofucan from the brown alga *Hormophysa cuneiformis* (Fucales, Sargassaceae) // *Carbohydr. Res.* – 2018. – V. 469. – P. 48–54.
7. Contreras R.R., Kamerling J.P., Breg J., Vliegthart J.F.G. H-1-NMR and C-13-NMR spectroscopy of synthetic monosulfated methyl alpha-D-galactopyranosides // *Carbohydr. Res.* – 1988. – V. 179. – P. 411–418.
8. Jansson P.E., Kenne L., Schweda E. Nuclear Magnetic Resonance and conformational studies on monoacetylated methyl D-gluco-pyranosides and D-galactopyranosides // *J. Chem. Society-Perkin Transact. 1.* – 1987. – No. 2. – P. 377–383.
9. Lipkind G.M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Vinogradov E.V., Kochetkov N.K. A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of C-13-NMR data // *Carbohydr. Res.* – 1988. – V. 175, No. 1. – P. 59–75.
10. Bilan M.I., Vinogradova E.V., Tsvetkova E.A., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. A sulfated glucuronofucan containing both fucofuranose and fucopyranose residues from the brown alga *Chordaria flagelliformis* // *Carbohydr. Res.* – 2008. – V. 343, No. 15. – P. 2605–2612.

11. Bilan M., Klochkova N.G., Ustyuzhanina N.E., Chizhov A.O., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. Polysaccharides of algae 68. Sulfated polysaccharides from the Kamchatka brown alga *Laminaria bongardiana* // *Russ. Chem. Bull.* – 2016. – V. 65, No. 11. – P. 2729–2736.
12. Kylin H. Zur biochemie der meeresalgen // *Z. Physiol. Chem.* . – 1913. – V. 83. – P. 171–197.
13. Senthilkumar K., Manivasagan P., Venkatesan J., Kim S.K. Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer // *Int J Biol Macromol.* – 2013. – V. 60. – P. 366–374.
14. Vasseur E. Chemical studies on the jelly coat of the sea-urchin egg // *Acta Chem. Scand.* – 1948. – No. 2. – P. 900–913.
15. Mulloy B., Ribeiro A.C., Alves A.P., Vieira R.P., Mourao P.A. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the 0-2 and 0-4 positions // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269, No. 35. – P. 22113–22123.
16. Mourao P.A.S., Bastos I.G. Highly acidic glycans from sea cucumbers // *Eur. J. Biochem.* – 1987. – No. 166. – P. 639–645.
17. Kusaykin M., Bakunina I., Sova V., Ermakova S., Kuznetsova T., Besednova N., Zaporozhets T., Zvyagintseva T. Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds // *Biotechnol. J.* – 2008. – V. 3, No. 7. – P. 904–915.
18. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Popivnich I.B., Isakov V.V., Scobun A.S., Sundukova E.V., Elyakova L.A. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds // *Carbohydr. Res.* – 1999. – V. 322, No. 1-2. – P. 32–39.
19. Ponce N.M.A., Pujol C.A., Damonte E.B., Flores M.L., Stortz C.A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies // *Carbohydr. Res.* – 2003. – V. 338, No. 2. – P. 153–165.
20. Kloareg B., Quatrano R.S. Structure of cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides // *Oceanography & Mar. Biol., New York.* – 1988. – V. 26. – P. 259–315.

21. Michel G., Tonon T., Scornet D., Cock J.M., Kloareg B. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes // *New Phytologist*. – 2010. – V. 188, No. 1. – P. 82–97.
22. Li B., Lu F., Wei X., Zhao R. Fucoïdan: structure and bioactivity // *Molecules*. – 2008. – V. 13, No. 8. – P. 1671–1695.
23. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. Structure of a fucoïdan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag // *Carbohydr. Res.* – 2002. – V. 337, No. 8. – P. 719–730.
24. Li Q., Jiang S.X., Shi W.W., Qi X.H., Song W.G., Mou J.J., Yang J. Structure characterization, antioxidant and immunoregulatory properties of a novel fucoïdan from the sea cucumber *Stichopus chloronotus* // *Carbohydr. Polym.* – 2020. – V. 231. – P. 115767.
25. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Borodina E.Y., Nifantiev N.E., Usov A.I. A highly regular fucan sulfate from the sea cucumber *Stichopus horrens* // *Carbohydr. Res.* – 2018. – V. 456. – P. 5–9.
26. Vilela-Silva A.C., Alves A.P., Valente A.P., Vacquier V.D., Mourao P.A. Structure of the sulfated alpha-L-fucan from the egg jelly coat of the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: patterns of preferential 2-O- and 4-O-sulfation determine sperm cell recognition // *Glycobiology*. – 1999. – V. 9, No. 9. – P. 927–933.
27. Alves A.P., Mulloy B., Moy G.W., Vacquier V.D., Mourao P.A. Females of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* differ in the structures of their egg jelly sulfated fucans // *Glycobiology*. – 1998. – V. 8, No. 9. – P. 939–946.
28. Anastyyuk S.D., Shevchenko N.M., Usoltseva (Menshova) R.V., Silchenko A.S., Zadorozhny P.A., Dmitrenok P.S., Ermakova S.P. Structural features and anticancer activity in vitro of fucoïdan derivatives from brown alga *Saccharina cichorioides* // *Carbohydr. Polym.* – 2017. – V. 157. – P. 1503–1510.
29. Usoltseva R.V., Shevchenko N.M., Malyarenko O.S., Anastyyuk S.D., Kasprık A.E., Zvyagintsev N.V., Ermakova S.P. Fucoïdans from brown algae *Laminaria longipes* and *Saccharina cichorioides*: Structural characteristics, anticancer and radiosensitizing activity in vitro // *Carbohydr. Polym.* – 2019. – V. 221. – P. 157–165.

30. Menshova R.V., Anastyuk S.D., Ermakova S.P., Shevchenko N.M., Isakov V.I., Zvyagintseva T.N. Structure and anticancer activity in vitro of sulfated galactofucan from brown alga *Alaria angusta* // *Carbohydr. Polym.* – 2015. – V. 132. – P. 118–125.
31. Yu L., Xue C., Chang Y., Hu Y., Xu X., Ge L., Liu G. Structure and rheological characteristics of fucoidan from sea cucumber *Apostichopus japonicus* // *Food Chem.* – 2015. – V. 180. – P. 71–76.
32. Yu L., Xue C., Chang Y., Xu X., Ge L., Liu G., Wang Y. Structure elucidation of fucoidan composed of a novel tetrafucose repeating unit from sea cucumber *Thelenota ananas* // *Food Chem.* – 2014. – V. 146. – P. 113–119.
33. Li C., Niu Q.F., Li S.J., Zhang X., Liu C.J., Cai C., Li G.Y., Yu G.L. Fucoidan from sea cucumber *Holothuria polii*: structural elucidation and stimulation of hematopoietic activity // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – V. 154. – P. 1123–1131.
34. Cai Y., Yang W.J., Yin R.H., Zhou L.T., Li Z.K., Wu M.Y., Zhao J.H. An anticoagulant fucan sulfate with hexasaccharide repeating units from the sea cucumber *Holothuria albiventer* // *Carbohydr. Res.* – 2018. – V. 464. – P. 12–18.
35. Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Kelly M., Sanderson C.J., Nifantiev N.E., Usov A.I. Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima* // *Carbohydr. Res.* – 2010. – V. 345, No. 14. – P. 2038–2047.
36. Chang Y., Hu Y., Yu L., McClements D.J., Xu X., Liu G., Xue C. Primary structure and chain conformation of fucoidan extracted from sea cucumber *Holothuria tubulosa* // *Carbohydr. Polym.* – 2016. – V. 136. – P. 1091–1097.
37. Hu Y., Li S., Li J., Ye X., Ding T., Liu D., Chen J., Ge Z., Chen S. Identification of a highly sulfated fucoidan from sea cucumber *Pearsonothuria graeffei* with well-repeated tetrasaccharides units // *Carbohydr. Polym.* – 2015. – V. 134. – P. 808–816.
38. Vilela-Silva A.C.E.S., Castro M.O., Valente A.P., Biermann C.H., Mourao P.A.S. Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277, No. 1. – P. 379–387.

39. Yu L., Ge L., Xue C., Chang Y., Zhang C., Xu X., Wang Y. Structural study of fucoidan from sea cucumber *Acaudina molpadioides*: a fucoidan containing novel tetrafucose repeating unit // *Food Chem.* – 2014. – V. 142. – P. 197–200.
40. Chen S., Hu Y., Ye X., Li G., Yu G., Xue C., Chai W. Sequence determination and anticoagulant and antithrombotic activities of a novel sulfated fucan isolated from the sea cucumber *Isostichopus badionotus* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – V. 1820, No. 7. – P. 989–1000.
41. Bilan M., Zakharova A., Grachev A., Shashkov A., Nifantiev N., Usov A. Polysaccharides of algae: 60. Fucoidan from the pacific brown alga *Analipus japonicus* (Harv.) winne (Ectocarpales, Scytosiphonaceae) // *Rus. J. Bioorg. Chem.* – 2007. – V. 33, No. 1. – P. 38–46.
42. Chizhov A.O., Dell A., Morris H.R., Haslam S.M., McDowell R.A., Shashkov A.S., Nifant'ev N.E., Khatuntseva E.A., Usov A.I. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum* // *Carbohydr. Res.* – 1999. – V. 320, No. 1-2. – P. 108–119.
43. Lim S.J., Aida W.M.W., Schiehser S., Rosenau T., Bohmdorfer S. Structural elucidation of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* (Okinawa mozuku) // *Food Chem.* – 2019. – V. 272. – P. 222–226.
44. Nagaoka M., Shibata H., Kimura-Takagi I., Hashimoto S., Kimura K., Makino T., Aiyama R., Ueyama S., Yokokura T. Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA // *Glycoconj. J.* – 1999. – V. 16, No. 1. – P. 19–26.
45. Pomin V.H., Mourao P.A.S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans // *Glycobiology.* – 2008. – V. 18, No. 12. – P. 1016–1027.
46. Shang F.N., Mou R.R., Zhang Z.D., Gao N., Lin L.S., Li Z.K., Wu M.Y., Zhao J.H. Structural analysis and anticoagulant activities of three highly regular fucan sulfates as novel intrinsic factor Xase inhibitors // *Carbohydr. Polym.* – 2018. – V. 195. – P. 257–266.
47. Alves A.P., Mulloy B., Diniz J.A., Mourao P.A. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272, No. 11. – P. 6965–6971.

48. Pereira M.S., Mulloy B., Mourao P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans - comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274, No. 12. – P. 7656–7667.
49. Patankar M.S., Oehninger S., Barnett T., Williams R.L., Clark G.F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268, No. 29. – P. 21770–21776.
50. Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L., Dmitrenok P.S., Zvyagintseva T.N. Structural analysis of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* by MALDI-TOF and tandem ESI mass spectrometry // *Carbohydrate Research.* – 2009. – V. 344, No. 6. – P. 779–787.
51. Menshova R.V., Shevchenko N.M., Imbs T.I., Zvyagintseva T.N., Malyarenko O.S., Zaporoshets T.S., Besednova N.N., Ermakova S.P. Fucoidans from brown alga *Fucus evanescens*: structure and biological activity // *Frontiers Mar. Sci.* – 2016. – V. 3. – P. 129.
52. Silchenko A.S., Kusaykin M.I., Zakharenko A.M., Menshova R.V., Khanh H.H.N., Dmitrenok P.S., Isakov V.V., Zvyagintseva T.N. Endo-1,4-fucoidanase from Vietnamese marine mollusk *Lambis* sp. which producing sulphated fucooligosaccharides // *J. Mol. Catal. B-Enzym.* – 2014. – V. 102. – P. 154–160.
53. Foley S.A., Mulloy B., Tuohy M.G. An unfractionated fucoidan from *Ascophyllum nodosum*: extraction, characterization, and apoptotic effects in vitro // *J. Nat. Prod.* – 2011. – V. 74, No. 9. – P. 1851–1861.
54. Chevlot L., Mulloy B., Ratiskol J., Foucault A., Collic-Jouault S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae // *Carbohydr. Res.* – 2001. – V. 330, No. 4. – P. 529–535.
55. Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. // *Carbohydr. Res.* – 2006. – V. 341, No. 2. – P. 238–245.
56. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L. // *Carbohydr. Res.* – 2004. – V. 339, No. 3. – P. 511–517.

57. Билан М.И., Кусайкин М.И., Грачев А.А., Цветкова Е.А., Звягинцева Т.Н., Нифантьев Н.Э., Усов А.И. Действие ферментного препарата из морского моллюска *Littorina kurila* на фукоидан из бурой водоросли *Fucus distichus* // Биохимия. – 2005. – V. 70, No. 12. – P. 1606–1612.
58. Imbs T.I., Ermakova S.P., Malyarenko (Vishchuk) O.S., Isakov V.V., Zvyagintseva T.N. Structural elucidation of polysaccharide fractions from the brown alga *Coccophora langsdorfii* and in vitro investigation of their anticancer activity // Carbohydr. Polym. – 2016. – V. 135. – P. 162–168.
59. Hu P., Li Z., Chen M., Sun Z., Ling Y., Jiang J., Huang C. Structural elucidation and protective role of a polysaccharide from *Sargassum fusiforme* on ameliorating learning and memory deficiencies in mice // Carbohydr. Polym. – 2016. – V. 139. – P. 150–158.
60. Adhikari U., Mateu C.G., Chattopadhyay K., Pujol C.A., Damonte E.B., Ray B. Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum* // Phytochemistry. – 2006. – V. 67, No. 22. – P. 2474–2482.
61. Luo D.H., Wang Z.J., Nie K.Y. Structural characterization of a novel polysaccharide from *Sargassum thunbergii* and its antioxidant and anti-inflammation effects // Plos One. – 2019. – V. 14, No. 10.
62. Ke S.Z., Wei B., Qiu W.H., Zhou T.S., Wang S.J., Chen J., Chen J.W., Zhang H.W., Jin W.H., Wang H. Structural characterization and alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of fucoidans extracted from *Saccharina japonica* // Chem. & Biodiv. – 2020. – V. 17, No. 7.
63. Wei X.Q., Cai L.Q., Liu H.L., Tu H.L., Xu X.J., Zhou F.L., Zhang L.N. Chain conformation and biological activities of hyperbranched fucoidan derived from brown algae and its desulfated derivative // Carbohydr. Polym. – 2019. – V. 208. – P. 86–96.
64. Usoltseva R.V., Anastyuk S.D., Ishina I.A., Isakov V.V., Zvyagintseva T.N., Thinh P.D., Zadorozhny P.A., Dmitrenok P.S., Ermakova S.P. Structural characteristics and anticancer activity in vitro of fucoidan from brown alga *Padina boryana* // Carbohydr. Polym. – 2018. – V. 184. – P. 260–268.
65. Usoltseva R.V., Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Surits V.V., Silchenko A.S., Isakov V.V., Zvyagintseva T.N., Thinh P.D., Ermakova S.P. Polysaccharides from

brown algae *Sargassum duplicatum*: the structure and anticancer activity in vitro // Carbohydr. Polym. – 2017. – V. 175. – P. 547–556.

66. Usoltseva R.V., Anastyuk S.D., Surits V.V., Shevchenko N.M., Thinh P.D., Zadorozhny P.A., Ermakova S.P. Comparison of structure and in vitro anticancer activity of native and modified fucoidans from *Sargassum feldmannii* and *S. duplicatum* // Int. J. Biol. Macromol. – 2019. – V. 124. – P. 220–228.

67. Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Thuy T.T., Van T.T., Ly B.M., Nifantiev N.E., Usov A.I. Preliminary investigation of a highly sulfated galactofucan fraction isolated from the brown alga *Sargassum polycystum* // Carbohydr. Res. – 2013. – V. 377. – P. 48–57.

68. Synytsya A., Bleha R., Synytsya A., Pohl R., Hayashi K., Yoshinaga K., Nakano T., Hayashi T. Mekabu fucoidan: structural complexity and defensive effects against avian influenza A viruses // Carbohydr. Polym. – 2014. – V. 111. – P. 633–644.

69. Rocha H.A.O., Moraes F.A., Trindade E.S., Franco C.R.C., Torquato R.J.S., Veiga S.S., Valente A.P., Mourao P.A.S., Leite E.L., Nader H.B., Dietrich C.P. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi* - an ideal antithrombotic agent? // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280, No. 50. – P. 41278–41288.

70. Hay C.H., Luckens P.A. The Asian kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta, Laminariales) found in a New-Zealand Harbor // New Zeal. J. Botany. – 1987. – V. 25, No. 2. – P. 329–332.

71. Sanderson J.C. A preliminary survey of the distribution of the introduced macroalga, *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringer on the East Coast of Tasmania, Australia // Bot. Mar. – 1990. – V. 33, No. 2. – P. 153–157.

72. Koh H.S.A., Lu J., Zhou W.B. Structure characterization and antioxidant activity of fucoidan isolated from *Undaria pinnatifida* grown in New Zealand // Carbohydr. Polym. – 2019. – V. 212. – P. 178–185.

73. Leite E.L., Medeiros M.G.L., Rocha H.A., Farias G.G.M., da Silva L.F., Chavante S.F., de Abreu L.D., Dietrich C.P., Nader H.B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schoederii* // Plant Sci. – 1998. – V. 132. – P. 215–228.

74. Nobre L.T.D.B., Vidal A.A.J., Almeida-Lima J., Oliveira R.M., Paredes-Gamero E.J., Medeiros V.P., Trindade E.S., Franco C.R.C., Nader H.B., Rocha H.A.O. Fucan effect on CHO cell proliferation and migration // *Carbohydr. Polym.* – 2013. – V. 98, No. 1. – P. 224–232.
75. Rocha H.A.D., Bezerra L.C.L.D., de Albuquerque I.R.L., Costa L.S., Guerra C.M.P., de Abreu L.D., Nader H.B., Leite E.L. A xylogalactofucan from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi* stimulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial cells // *Planta Med.* – 2005. – V. 71, No. 4. – P. 379–381.
76. Shiroma R., Konishi T., Uechi S., Tako M. Structural study of fucoidan from the brown seaweed *Hizikia fusiformis* // *Food Sci. Technol. Res.* – 2008. – V. 14, No. 2. – P. 176–182.
77. Shevchenko N.M., Anastyuk S.D., Menshova R.V., Vishchuk O.S., Isakov V.I., Zadorozhny P.A., Sikorskaya T.V., Zvyagintseva T.N. Further studies on structure of fucoidan from brown alga *Saccharina gurjanovae* // *Carbohydr. Polym.* – 2015. – V. 121. – P. 207–216.
78. Vishchuk O.S., Ermakova S.P., Zvyagintseva T.N. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity // *Carbohydr. Res.* – 2011. – V. 346, No. 17. – P. 2769–2776.
79. Ermakova S., Men'shova R., Vishchuk O., Kim S.M., Um B.H., Isakov V., Zvyagintseva T. Water-soluble polysaccharides from the brown alga *Eisenia bicyclis*: structural characteristics and antitumor activity // *Algal Res.-Biomass Biofuels Bioprod.* – 2013. – V. 2, No. 1. – P. 51–58.
80. Men'shova R.V., Ermakova S.P., Um B.H., Zvyagintseva T.N. The composition and structural characteristics of polysaccharides of the brown alga *Eisenia bicyclis* // *Russian J. Mar. Biol.* – 2013. – V. 39, No. 3. – P. 208–213.
81. Anastyuk S.D., Imbs T.I., Shevchenko N.M., Dmitrenok P.S., Zvyagintseva T.N. ESIMS analysis of fucoidan preparations from *Costaria costata*, extracted from alga at different life-stages // *Carbohydr. Polym.* – 2012. – V. 90, No. 2. – P. 993–1002.

82. Rioux L.E., Turgeon S.L., Beaulieu M. Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharina longicruris* // *Phytochemistry*. – 2010. – V. 71, No. 13. – P. 1586–1595.
83. Nishino T., Nagumo T., Kiyohara H., Yamada H. Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* // *Carbohydr. Res.* – 1991. – V. 211, No. 1. – P. 77–90.
84. Tinh P.D., Menshova R.V., Ermakova S.P., Anastyuk S.D., Ly B.M., Zvyagintseva T.N. Structural characteristics and anticancer activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum mcclurei* // *Marine Drugs*. – 2013. – V. 11, No. 5. – P. 1456–1476.
85. Lee J.B., Takeshita A., Hayashi K., Hayashi T. Structures and antiviral activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum* // *Carbohydr. Polym.* – 2011. – V. 86, No. 2. – P. 995–999.
86. Karmakar P., Ghosh T., Sinha S., Saha S., Mandal P., Ghosal P.K., Ray B. Polysaccharides from the brown seaweed *Padina tetrastrum*: characterization of a sulfated fucan // *Carbohydr. Polym.* – 2009. – V. 78, No. 3. – P. 416–421.
87. Bilan M.I., Shashkov A.S., Usov A.I. Structure of a sulfated xylofucan from the brown alga *Punctaria plantaginea* // *Carbohydr. Res.* – 2014. – V. 393. – P. 1–8.
88. Li B., Wei X.J., Sun J.L., Xu S.Y. Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme* // *Carbohydr. Res.* – 2006. – V. 341, No. 9. – P. 1135–1146.
89. Sakai T., Ishizuka K., Shimanaka K., Ikai K., Kato I. Structures of oligosaccharides derived from *Cladosiphon okamuranus* fucoidan by digestion with marine bacterial enzymes // *Mar. Biotechnol. (NY)*. – 2003. – V. 5, No. 6. – P. 536–544.
90. Sakai T., Kimura H., Kojima K., Shimanaka K., Ikai K., Kato I. Marine bacterial sulfated fucoglucuronomannan (SFGM) lyase digests brown algal SFGM into trisaccharides // *Mar. Biotechnol. (NY)*. – 2003. – V. 5, No. 1. – P. 70–78.
91. Duarte M.E., Cardoso M.A., Nosedá M.D., Cerezo A.S. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* // *Carbohydr. Res.* – 2001. – V. 333, No. 4. – P. 281–293.
92. Kokoulin M.S., Filshtein A.P., Romanenko L.A., Chikalovets I.V., Chernikov O.V. Structure, antiproliferative and cancer preventive properties of sulfated

alpha-D-fucan from the marine bacterium *Vadicella arenosi* // *Carbohydr. Polym.* – 2019. – V. 221. – P. 120–126.

93. Bates S. Progress towards personalized medicine // *Drug Discov. Today.* – 2010. – V. 15, No. 3-4. – P. 115–120.

94. Sadee W., Dai Z.Y. Pharmacogenetics/genomics and personalized medicine // *Human Molecul. Gen.* – 2005. – V. 14. – P. R207–R214.

95. De Jong W.H., Borm P.J. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards // *Int J Nanomedicine.* – 2008. – V. 3, No. 2. – P. 133–149.

96. Du J., Sun R., Zhang L.F., Zhang L.F., Xiong C.D., Peng Y.X. Novel polyelectrolyte carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan nanoparticles for drug delivery. I. Physicochemical characterization of the carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan nanoparticles // *Biopolymers.* – 2005. – V. 78, No. 1. – P. 1–8.

97. Cui Z.R., Mumper R.J. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization // *J. Controlled Release.* – 2001. – V. 75, No. 3. – P. 409–419.

98. Chen Y., Mohanraj V.J., Parkin J.E. Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an anti-angiogenesis peptide // *Letters Pept. Sci.* – 2003. – V. 10, No. 5–6. – P. 621–629.

99. Boddohi S., Moore N., Johnson P.A., Kipper M.J. Polysaccharide-based polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan, heparin, and hyaluronan // *Biomacromolecules.* – 2009. – V. 10, No. 6. – P. 1402–1409.

100. Huang Y.C., Lam U.I. Chitosan/fucoidan pH-sensitive nanoparticles for oral delivery system // *J. Chinese Chem. Soc.* – 2011. – V. 58, No. 6. – P. 779–785.

101. Lu K.Y., Li R., Hsu C.H., Lin C.W., Chou S.C., Tsai M.L., Mi F.L. Development of a new type of multifunctional fucoidan-based nanoparticles for anticancer drug delivery // *Carbohydr. Polym.* – 2017. – V. 165. – P. 410–420.

102. Tran P.H.L., Duan W., Tran T.T.D. Fucoidan-based nanostructures: a focus on its combination with chitosan and the surface functionalization of metallic nanoparticles for drug delivery // *Int. J. Pharmaceut.* – 2020. – V. 575.

103. Wang P., Kankala R.K., Chen B.Q., Long R.M., Cai D.H., Liu Y.G., Wang S.B. Poly-allylamine hydrochloride and fucoidan-based self-assembled polyelectrolyte complex nanoparticles for cancer therapeutics // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* – 2019. – V. 107, No. 2. – P. 339–347.

104. Huang Y.C., Chen J.K., Lam U.I., Chen S.Y. Preparing, characterizing, and evaluating chitosan/fucoidan nanoparticles as oral delivery carriers // *J. Polym. Res.* – 2014. – V. 21, No. 5.
105. Sezer A.D., Akbuga J. Comparison on in vitro characterization of fucospheres and chitosan microspheres encapsulated plasmid DNA (pGM-CSF): formulation design and release characteristics // *Aaps Pharmscitech.* – 2009. – V. 10, No. 4. – P. 1193–1199.
106. Barbosa A.I., Lima S.A.C., Reis S. Application of pH-responsive fucoidan/chitosan nanoparticles to improve oral quercetin delivery // *Molecules.* – 2019. – V. 24, No. 2.
107. Lee E.J., Lim K.H. Formation of chitosan-fucoidan nanoparticles and their electrostatic interactions: quantitative analysis // *J. Biosci. & Bioeng.* – 2016. – V. 121, No. 1. – P. 73–83.
108. Sun T., Zhang Y.S., Pang B., Hyun D.C., Yang M., Xia Y. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2014. – V. 53, No. 46. – P. 12320–12364.
109. Couvreur P., Barratt G., Fattal E., Legrand P., Vauthier C. Nanocapsule technology: a review // *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* – 2002. – V. 19, No. 2. – P. 99–134.
110. Blanco E., Shen H., Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery // *Nat. Biotechnol.* – 2015. – V. 33, No. 9. – P. 941–951.
111. Martins A.F., Piai J.F., Schuquel I.T.A., Rubira A.F., Muniz E.C. Polyelectrolyte complexes of chitosan/heparin and N,N,N-trimethyl chitosan/heparin obtained at different pH: I. Preparation, characterization, and controlled release of heparin // *Colloid Polym. Sci.* – 2011. – V. 289, No. 10. – P. 1133–1144.
112. Han Y., Gao Z.G., Chen L.Q., Kang L., Huang W., Jin M.J., Wang Q.M., Bae Y.H. Multifunctional oral delivery systems for enhanced bioavailability of therapeutic peptides/proteins // *Acta Pharmaceutica Sinica B.* – 2019. – V. 9, No. 5. – P. 902–922.
113. Huang Y.C., Kuo T.H. O-carboxymethyl chitosan/fucoidan nanoparticles increase cellular curcumin uptake // *Food Hydrocolloids.* – 2016. – V. 53. – P. 261–269.

114. Ali A., Zafar H., Zia M., Ul Haq I., Phull A.R., Ali J.S., Hussain A. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles // *Nanotechnol. Sci. Appl.* – 2016. – V. 9. – P. 49–67.
115. Wu W., He Q., Jiang C. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies // *Nanoscale Res. Lett.* – 2008. – V. 3, No. 11. – P. 397–415.
116. Soisuwan S., Warisnoicharoen W., Lirdprapamongkol K., Svasti J. Eco-friendly synthesis of fucoidan-stabilized gold nanoparticles // *Am. J. Appl. Sci.* – 2010. – V. 7, No. 8. – P. 1038–1042.
117. De Matteis V., Cascione M., Toma C.C., Leporatti S. Silver nanoparticles: synthetic routes, in vitro toxicity and theranostic applications for cancer disease // *Nanomaterials (Basel)*. – 2018. – V. 8, No. 5.
118. Ziegler C., Eychmuller A. Seeded growth synthesis of uniform gold nanoparticles with diameters of 15–300 nm // *J. Phys. Chem. C.* – 2011. – V. 115, No. 11. – P. 4502–4506.
119. Manivasagan P., Bharathiraja S., Santha Moorthy M., Oh Y.O., Song K., Seo H., Oh J. Anti-EGFR antibody conjugation of fucoidan-coated gold nanorods as novel photothermal ablation agents for cancer therapy // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2017. – V. 9, No. 17. – P. 14633–14646.
120. Jang H., Kang K., El-Sayed M.A. Facile size-controlled synthesis of fucoidan-coated gold nanoparticles and cooperative anticancer effect with doxorubicin // *J. Materials Chem. B.* – 2017. – V. 5, No. 30. – P. 6147–6153.
121. Manivasagan P., Bharathiraja S., Bui N.Q., Jang B., Oh Y.O., Lim I.G., Oh J. Doxorubicin-loaded fucoidan capped gold nanoparticles for drug delivery and photoacoustic imaging // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2016. – V. 91. – P. 578–588.
122. Silchenko A.S., Ustyuzhanina N.E., Kusaykin M.I., Krylov V.B., Shashkov A.S., Dmitrenok A.S., Usoltseva R.V., Zueva A.O., Nifantiev N.E., Zvyagintseva T.N. Expression and biochemical characterization and substrate specificity of the fucoidanase from Formosa algae // *Glycobiology.* – 2017. – V. 27, No. 3. – P. 254–263.
123. Silchenko A.S., Rasin A.B., Zueva A.O., Kusaykin M.I., Zvyagintseva T.N., Kalinovskiy A.I., Kurilenko V.V., Ermakova S.P. Fucoidan sulfatases from marine bacterium *Wenyngzhungia fucanilytica* CZ1127(T) // *Biomol.* – 2018. – V. 8, No. 4.

124. Zueva A.O., Silchenko A.S., Rasin A.B., Kusaykin M.I., Usoltseva R.V., Kalinovskiy A.I., Kurilenko V.V., Zvyagintseva T.N., Thinh P.D., Ermakova S.P. Expression and biochemical characterization of two recombinant fucoidanases from the marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127(T) // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – V. 164. – P. 3025–3037.
125. Silchenko A.S., Rasin A.B., Kusaykin M.I., Kalinovskiy A.I., Miansong Z., Changheng L., Malyarenko O., Zueva A.O., Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P. Structure, enzymatic transformation, anticancer activity of fucoidan and sulphated fucooligosaccharides from *Sargassum horneri* // *Carbohydr. Polym.* – 2017. – V. 175. – P. 654–660.
126. Barbosa A.I., Coutinho A.J., Lima S.A.C., Reis S. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: fucoidan and chitosan as key players in the drug delivery match field // *Mar Drugs.* – 2019. – V. 17, No. 12.
127. Skriptsova A.V., Shevchenko N.M., Tarbeeva D.V., Zvyagintseva T.N. Comparative study of polysaccharides from reproductive and sterile tissues of five brown seaweeds // *Mar. Biotechnol. (NY)*. – 2012. – V. 14, No. 3. – P. 304–311.
128. Imbs T.I., Shevchenko N.M., Sukhoverkhov S.V., Semenova T.L., Skriptsova A.V., Zvyagintseva T.N. Seasonal variations of the composition and structural characteristics of holysaccharides from the brown alga *Costaria Costata* // *Chem. Nat. Comp.* – 2009. – V. 45, No. 6. – P. 786–791.
129. Silchenko A.S., Rasin A.B., Kusaykin M.I., Malyarenko O.S., Shevchenko N.M., Zueva A.O., Kalinovskiy A.I., Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P. Modification of native fucoidan from *Fucus evanescens* by recombinant fucoidanase from marine bacteria *Formosa algae* // *Carbohydr. Polym.* – 2018. – V. 193. – P. 189–195.
130. Grachev A.A. Spectroscopic (NMR) and conformational study of oligosaccharides corresponding to fucoidan fragments [in Russian] // Moscow: RAS, Organ. Chem. Inst., 2006. – 136 p.
131. Domard A., Gey C., Rinaudo M., Terrassin C. C-13 and H-1-NMR spectroscopy of chitosan and N-trimethyl chloride derivatives // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1987. – V. 9, No. 4. – P. 233–237.

132. Fotticchia I., Fotticchia T., Mattia C.A., Giancola C. Chitosan-based nanoparticles studied by isothermal titration calorimetry // *J. Therm. Anal. Calorim.* – 2016. – V. 125, No. 2. – P. 585–593.
133. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Analyt. Chem.* . – 1956. – V. 28. – P. 350–356.
134. Dodgson K.S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters // *Biochem J.* – 1961. – V. 78. – P. 312–319.
135. Waffenschmidt S., Jaenicke L. Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bichinoninate // *Anal. Biochem.* – 1987. – V. 165, No. 2. – P. 337–340.
136. Lee E.J., Lim K.H. Polyelectrolyte complexes of chitosan self-assembled with fucoidan: an optimum condition to prepare their nanoparticles and their characteristics // *Korean J. Chem. Eng.* – 2014. – V. 31, No. 4. – P. 664–675.
137. Lavertu M., Xia Z., Serreqi A.N., Berrada M., Rodrigues A., Wang D., Buschmann M.D., Gupta A. A validated H-1 NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2003. – V. 32, No. 6. – P. 1149–1158.
138. Katchalski-Katzir E., Shariv I., Eisenstein M., Friesem A.A., Aflalo C., Vakser I.A. Molecular surface recognition: determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – V. 89, No. 6. – P. 2195–2199.
139. Vakser I.A. Protein docking for low-resolution structures // *Protein Eng.* – 1995. – V. 8, No. 4. – P. 371–377.
140. Vakser I.A., Aflalo C. Hydrophobic docking: a proposed enhancement to molecular recognition techniques // *Proteins.* – 1994. – V. 20, No. 4. – P. 320–329.