

**Скотарева Анастасия Андреевна**

студент

**Белоусова Татьяна Васильевна**

студент

**Арутюнова Наира Владимировна**

канд. пед. наук, доцент

**Андрусенко Светлана Федоровна**

канд. биол. наук, доцент

**Денисова Евгения Владимировна**

канд. биол. наук, доцент

**Сокульская Наталья Николаевна**

канд. хим. наук, доцент

**Ивченко Глеб Сергеевич**

канд. мед. наук, доцент

ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»

г. Ставрополь, Ставропольский край

DOI 10.21661/r-556844

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДНОГО СОСТАВА ГЛИКОПРОТЕИДОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫХ БИОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕДСТВ**

**Аннотация:** в результате исследования была проведена методика химического анализа углеводных компонентов перспективных для фармацевтической и медицинской отрасли гликопротеидов из слизи рыб.

**Ключевые слова:** гликопротеиды, слизь, углеводы, тонкослойная хроматография, газожидкостная хроматография.

Главными задачами в исследовании механизма биозащиты и повышения ее эффективности является: поиск, выделение, изучение свойств и применение на практике естественных биопротекторов. Таковыми являются гликопротеиды, выделенные из слизи рыб.

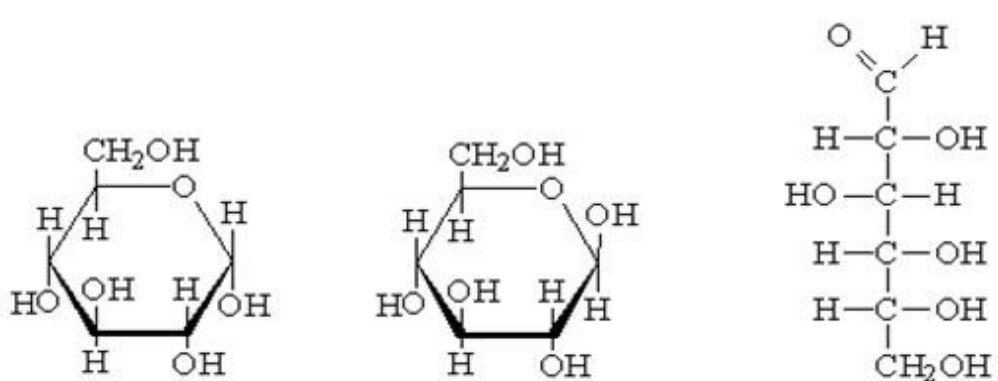
Нарушения реакции гликозилирования двух главных классов гликоконъюгатов (гликопротеидов и ганглиозидов) приводит или к накоплению предшественников этих веществ, или к синтезу «укороченных» сахаридных цепей гликоконъюгатов. Более того, установлено, что во взаимодействии между некоторыми вирусами и клетками-мишенями главную роль играют углеводные компоненты. В частности, гликопротеид gp120 вируса иммунодефицита человека (содержит большой процент углевода) имеет высокое сродство к гликопротеиду CD<sub>4</sub> Т-лимфоцита. В этом взаимодействии узнавания, являющемся высокоспецифичным, гликозилированные фрагменты играют патогенетическую роль. При ревматоидных артритах часто синтезируются аномальные антитела (иммуноглобулины – все гликопротеиды) с необычайно короткими сахарными цепями, что вызывает стимуляцию иммунной системы против самого организма.

Помимо гликопротеидов, различают протеогликаны, состоящие из белка и гликозаминогликанов (прежнее название мукополисахариды); последние состоят из цепей сложных углеводов: аминсахаров, уроновых кислот, серной кислоты и отдельных моносахаридов. Типичным гликозаминогликанами являются гиалуроновая кислота, хондроитинсерная кислота и гепарин.

Химический состав и структура гликопротеидов установлены только у ряда из них. К полипептиду присоединяются гетероолигосахаридные цепи, содержащие от 2 до 10, реже 15 мономерных остатков гексоз (галактоза и манноза, реже глюкоза), пентоз (ксилоза, арабиноза) и конечный углевод, чаще всего представленный N-ацетилгалактозамином, L-фукозой или сиаловой кислотой.

Слизи – сложные смеси гликопротеидов (до 40% сухой массы). В состав слизи, секретируемой слизистым эпителием желудка и кишечника, входят кислые мукополисахариды, близкие или идентичные мукополисахаридам соединительной ткани, нейтральные гликопротеиды, содержащие значительного количества фукозы, и кислые гликопротеиды, содержащие сиаловые кислоты и гликаны. В составе слизи синовиальной жидкости преобладает гиалуроновая кислота.

Боковые углеводные цепи гликопротеидов построены из моносахаридов и их производных: D – галактозы, D – маннозы, D – глюкозы, L – фукозы.



$\alpha$ -D – галактоза  $\beta$ -D – галактоза D – галактоза

В молекуле протеогликанов полисахаридная часть преобладает над белковой. К этой группе относят мукополисахариды и гликозаминогликаны. Простетическая часть их молекулы построена в основном из тех же моносахаров, что и гликопротеидов. Все протеогликаны обладают кислотными свойствами, так как содержат на свободных концах углеводородных боковых цепей в эфирной связи остатки уроновых кислот или сульфатные группы. Аналогично строение углеводной части протеогликанов: повторяющиеся дисахаридные единицы, состоящие из гексурановой кислоты (глюкуроновой или идуроновой) и гексозамина (глюкозамина и галактозамина).

Фукомуцины – сложные белки, относящиеся к типу нейтральных гликопротеидов. Их простетическая группа полисахарид фукомукан, содержащий фукозу на конце молекулы, соединенный с белковой частью ковалентной связью.

Сиаломуцины относятся к кислым гликопротеидам, простетическая часть которых представлена ацетилгексозамином и сиаловой кислотой. Благодаря наличию прочной ковалентной связи белковой части молекулы с полисахаридом сиалопротеиды в нативном состоянии не диссоциируют.

Благодаря присутствию фукозы слизь в кислой среде образует вязкие пленки на поверхности слизистой оболочки желудка, а N-ацетилнейраминовая кислота частично инактивирует пепсин.

Адсорбционная способность слизи и антипептическая активность, обусловленная наличием сиаловых кислот, обеспечивает защиту желудка от самопереваривания. Гликопротеиды, входящие в состав видимого муцина, совершенно резистентны к протеолизу. Вязкость муцинов, благодаря которой они способны образовывать защитные покровы, в частности защитный слизистый барьер желудка, является функцией многочисленных близко расположенных остатков сиаловой кислоты вследствие взаимного электростатического отталкивания отрицательно заряженных остатков сиаловой кислоты молекулы гликопротеидов стремятся занять возможно большее пространство. Нейтрализация заряда сиаловой кислоты титрованием нейраминидазой вызывает заметное уменьшение вязкости гликопротеидов.

Биологическое действие фукомуцинов (нейтральных мукопротеинов), составляющих основную массу нерастворимой и растворенной фракций желудочной слизи, связано с наличием в их составе групповых антигенов крови, фактора роста и антианемического фактора Кастла.

Для выделения углеводов применяли гидролиз 6 н. соляной кислотой при 100–110 °С, в течении 2 часов.

Проведение анализа на содержание углеводов проводили следующим образом.

На хроматографическую пластинку наносили стандарты углеводов и исследуемого образца, предварительно подвергнутого гидролизу в виде сплошной полосы длиной 2–5 мм, отступая от бокового и нижнего краев пластины на расстоянии 10 мм. Пластинку вертикально помещали в камеру, запоенную разделяющей смесью. Пластинку выдерживали в камере до тех пор, пока высота подъема фронта восходящего растворителя не достигла отмеченной длины разделительного пути, составляющая 90 мм. По окончании хроматографического разделения пластинку вынимали из камеры и сушили при комнатной температуре в вытяжном шкафу до полного испарения остатков растворителя. Высушенную пластинку проявляли в термостате при температуре 120°С в течение 5 мин.

Хроматограмма углеводов представлена на рисунке 1.

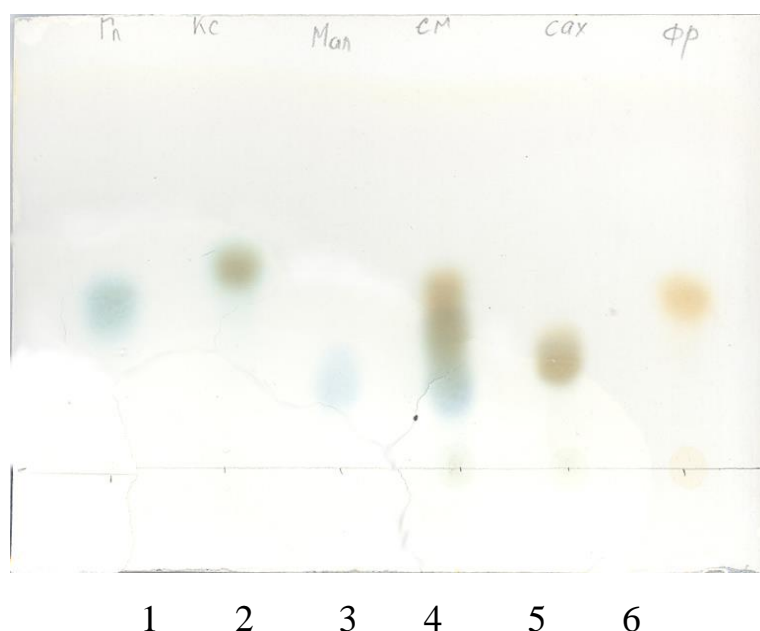


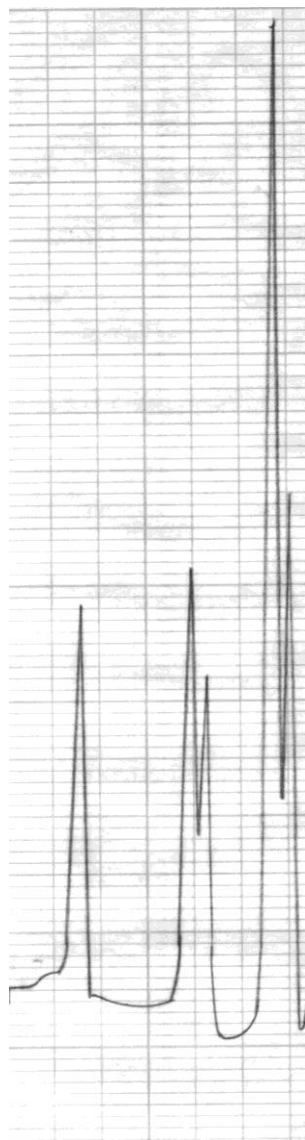
Рис. 1. Тонкослойная хроматограмма углеводов

где: 1 – стандарт глюкозы; 2 – стандарт ксилозы; 3 – стандарт мальтозы; 4 – исследуемый образец, 5 – стандарт сахарозы, 6 – стандарт фруктозы.

В результате хроматографического анализа установили, что в состав гликопротеинов входят такие гексозы как глюкоза и галактоза. Для количественного определения углеводов образцы подвергали анализу на газовой-жидкостной хроматографе.

Образец массой 10 г растворяли в 40 мл воды при 37 °C 30 минут и затем добавляли 170 мл 95% этанола. После фильтрации оставшийся осадок экстрагировали еще дважды аналогичным образом. Экстракты объединяли и концентрировали под вакуумом. Навеску пробы в количестве 50–100 мг помещали в центрифужную пробирку. Туда же вносили с точностью до 0,001 г навеску 2–5 мг инозита. Проводили экстракцию с 2 см<sup>3</sup> гексана с последующим центрифугированием. Экстракцию проводили трижды, декантируя гексановый слой. Остатки гексана высушивались в токе азота, после чего проводили силилирование углеводов. 1 мкл гексанового раствора ТМС-производных углеводов вводили в испаритель хроматографа (температура испарителя 280 °C) [4]. Температуру колонки программировали в режиме 150°±5 °C/мин до 280 °C и далее в изотермическом режиме. ТМС-производные углеводов элюировали из колонки газом (азот) и детектировали пламенно-ионизационным детектором, подогретым до температуры

200–250 °С. Идентификацию отдельных ТМС-производных углеводов проводили путем введения ТМС-производных известных веществ (метчиков) в анализируемую смесь, а также по времени удерживания. Результаты анализа представлены на рисунке 2.



1 2 3 4 5

Рис. 2. Хроматограмма углеводов в исследуемом образце

где: 1 – глюкоза, 2 – фукоза, 3 – галактоза, 4 – гексозамин, 5 – сиаловая кислота.

Таким образом, нами было установлено, что в гликопротеидах, выделенных из слизистой оболочки кишечника рыб, содержится большее количество углеводов.