



УДК 547.458:577.114:615.276

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРОЕНИЯ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ ШРОТА ЯГОД КАЛИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ *Viburnum opulus*

© 2000 г. Р. Г. Оводова<sup>#</sup>, В. В. Головченко, С. В. Попов, А. С. Шашков\*, Ю. С. Оводов

Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, 167610, Сыктывкар, Первомайская, 50;

\* Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

— Поступила в редакцию 15.06.99 г. Принята к печати 23.08.99 г.

Из шрота ягод калины обыкновенной *Viburnum opulus* последовательной экстракцией водой при разных температурах и рН и водным оксалатом аммония выделены водорастворимые полисахаридные фракции VO1–VO4 и очищены ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе. Гомогенность очищенных полисахаридов определена гель-фильтрацией на сефакриле S-500. Найдено, что во всех экстрактах содержатся кислые полисахариды (фракции VO1-1, VO2-1, VO3-2, VO4-2), которые по моносахаридному составу близки пектиновым веществам. В качестве главных компонентов в их состав входят остатки галактуроновой кислоты, галактозы, арабинозы, в меньших количествах содержится рамноза. Во фракции, полученные при экстракции подкисленной водой (рН 4.0) и водным оксалатом аммония, дополнительно входят нейтральные полисахариды, главными составляющими которых являются остатки галактозы и маннозы. Частичный кислотный и ферментативный гидролиз кислых полисахаридов с помощью пектиназы указывает на наличие главной углеводной цепи из  $\alpha$ -1,4-связанных остатков *D*-галактуроновой кислоты. Спектры ЯМР кислых полисахаридов (фракции VO3-2, VO3-3) подтверждают, что их главная углеводная цепь представляет собой галактуронан из  $\alpha$ -1,4-связанных остатков *D*-галактуроновой кислоты, а боковые олигосахаридные цепи состоят из  $\beta$ -1,4-связанных остатков галактопиранозы, концевых, а также 2,5- и 3,5-замещенных остатков  $\alpha$ -арабинофуранозы в соотношении Gal : Ara, равном 3 : 1.

Показано, что некоторые из полисахаридов *V. opulus* обладают иммуностимулирующей активностью. Они усиливают фагоцитоз, в частности увеличивают фагоцитарный показатель, и повышают секрецию лизосомных ферментов перитонеальными макрофагами. Обнаружено, что для проявления стимулирующего эффекта кислых полисахаридов *V. opulus* необходимы ионы кальция.

*Ключевые слова:* полисахариды растений; *Viburnum opulus*; слизи семян; пектины; арабиногалактаны; спектроскопия ЯМР полисахаридов; иммуномодуляторы.

### ВВЕДЕНИЕ

Полисахариды ягод высших растений (слизи) обладают ценными фармакологическими свойствами [1]. Калина обыкновенная *Viburnum opulus* L. из семейства *Caprifoliaceae* используется в народной медицине как источник высокоэффективных средств для лечения многих заболеваний [2]. Данные о строении и биологической активности водорастворимых полисахаридов из ягод калины отсутствуют. Ранее нами описано выделение из шрота ягод калины *V. opulus* (остаток ягод после удаления сока под давлением) четырех водорастворимых полисахаридных фракций [3]. Цель настоящей работы — выделение отдельных водорастворимых полисахаридов, определение их строения и физиологической активности.

Полисахариды выделяли из шрота ягод калины, предварительно обработанного хлороформом и метанолом, как описано ранее [3]. При последовательной экстракции водой и водным оксалатом аммония получены четыре полисахаридные фракции, обозначенные как VO1–VO4. Как видно из табл. 1, суммарный выход полисахаридных фракций составляет около 5% в расчете на вес обезжиренного шрота ягод. Следует отметить, что в полисахаридных фракциях из шрота ягод калины содержится довольно большое количество сопутствующего белка, который не удаляется при использовании стандартного метода Севага. Все полисахаридные фракции отличаются высоким содержанием *D*-галактуроновой кислоты, что указывает на наличие в них пектиновых веществ. Это подтверждается также присутствием в полисахаридных гидролизатах рамнозы и значительных количеств галактозы и арабинозы.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел./факс: (8212) 42-10-01; e-mail: ovoys@iph.komi.ru).

**Таблица 1.** Характеристика полисахаридов из шрота ягод *V. opulus*

| Полисахаридные фракции | Выход, %* | Содержание, % |     |     |     |      |     |      |       |      |
|------------------------|-----------|---------------|-----|-----|-----|------|-----|------|-------|------|
|                        |           | GalA          | Rha | Ara | Xyl | Man  | Glc | Gal  | белка | OMe  |
| VO1                    | 1.4       | 21.3          | 1.4 | 6.0 | 2.4 | 1.2  | 3.0 | 8.9  | 30.0  | 4.1  |
| VO2                    | 1.4       | 31.0          | 1.4 | 7.2 | 0.7 | 4.8  | 3.5 | 12.7 | 20.0  | 11.3 |
| VO3                    | 0.8       | 30.0          | 1.0 | 7.9 | 1.3 | 35.9 | 2.7 | 18.1 | 10.0  | 2.2  |
| VO4                    | 1.5       | 63.0          | 1.6 | 5.4 | 1.1 | 6.0  | 1.0 | 11.4 | 15.0  | 6.0  |

\* Выход в расчете на вес обезжиренного сырья.

**Таблица 2.** Характеристика полисахаридных фракций из шрота ягод *V. opulus* после разделения на DEAE-целлюлозе

| Полисахаридные фракции | Выход, %* | Содержание, % |     |      |     |      |     |      |       |
|------------------------|-----------|---------------|-----|------|-----|------|-----|------|-------|
|                        |           | GalA          | Rha | Ara  | Xyl | Man  | Glc | Gal  | белка |
| VO1-1                  | 34.5      | 14.0          | 4.8 | 12.0 | 2.3 | 3.0  | 1.9 | 11.4 | 12.0  |
| VO2-1                  | 34.2      | 37.0          | 2.4 | 8.7  | 0.8 | 0.7  | 1.9 | 10.7 | 10.0  |
| VO3-1                  | 8.5       | 0.0           | 1.1 | 0.4  | 0.2 | 38.7 | 2.9 | 6.1  | 6.0   |
| VO3-2                  | 21.5      | 30.0          | 2.2 | 7.8  | 1.0 | 3.4  | 3.1 | 22.6 | 1.8   |
| VO3-3                  | 20.0      | 52.0          | 1.3 | 3.3  | 1.9 | 1.6  | 1.0 | 5.4  | 8.3   |
| VO4-1                  | 2.7       | 0.0           | 0.9 | 0.9  | 0.4 | 48.6 | 1.6 | 5.9  | 6.0   |
| VO4-2                  | 46.0      | 48.8          | 1.3 | 1.8  | 0.4 | 1.6  | 0.9 | 8.4  | 4.2   |

\* Выход от навески, нанесенной на колонку.

Полученные полисахаридные фракции были подвергнуты дальнейшему фракционированию и очистке с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе. В результате получены очищенные водорастворимые полисахаридные фракции (VO1-1, VO2-1, VO3-1, VO3-2, VO3-3, VO4-1, VO4-2), гомогенность которых подтверждается гель-фильтрацией на сефакриле S-500. Из приведенных в табл. 2 данных видно, что в состав шрота ягод калины входят кислые полисахариды, подобные по моносахаридному составу пектинам (см. [1]) (фракции VO1-1, VO2-1, VO3-2, VO3-3, VO4-2), и нейтральные полисахариды VO3-1 и VO4-1, которые экстрагируются из шрота ягод подкисленной водой (рН 4.0) и водным оксалатом аммония в составе соответствующих фракций (VO3, VO4). Нейтральные полисахариды характеризуются очень высоким содержанием маннозы (до 50%) и значительно более низким – галактозы (около 6%). Галактоманнаны такого состава довольно часто встречаются в семенах других видов растений [4].

При частичном кислотном гидролизе кислых полисахаридов наблюдается практически полное отщепление нейтральных моносахаридов и образуется полигалактуронан, который, очевидно, и представляет собой главную углеводную цепь кислых полисахаридов и указывает на их близость пектинам.

Кислые полисахариды близки друг другу по качественному моносахаридному составу, но отличаются содержанием галактуроновой кислоты и нейтральных моносахаридов (табл. 2).

Ферментативный гидролиз кислых полисахаридных фракций с помощью пектиназы свидетельствует об устойчивости тех из них, которые характеризуются сравнительно невысоким содержанием галактуроновой кислоты. В то же время полисахаридная фракция VO3-3 (содержание галактуроновой кислоты более 50%) расщепляется пектиназой с образованием свободной галактуроновой кислоты, которой на этом основании можно приписать *D*-конфигурацию, и олигосахаридов. Отличие в действии пектиназ на полимеры фракции VO3-3 обусловлено, по-видимому, меньшим числом боковых цепей, построенных из нейтральных моносахаридов, и наличием участков незамещенного  $\alpha$ -1,4-*D*-галактуронана.

Дополнительным подтверждением данного предположения служат результаты сравнительного изучения спектров <sup>13</sup>C-ЯМР разных фракций. Как видно из рис. 1, в спектре полисахаридной фракции VO3-2 (содержание галактуроновой кислоты около 30%) отсутствуют почти все сигналы главной цепи галактуронана за исключением сильно уширенного сигнала C6 остатка галактуроновой кислоты при 174.8 м.д. В то же время в спектре <sup>13</sup>C-ЯМР полисахарида VO3-3 с меньшей

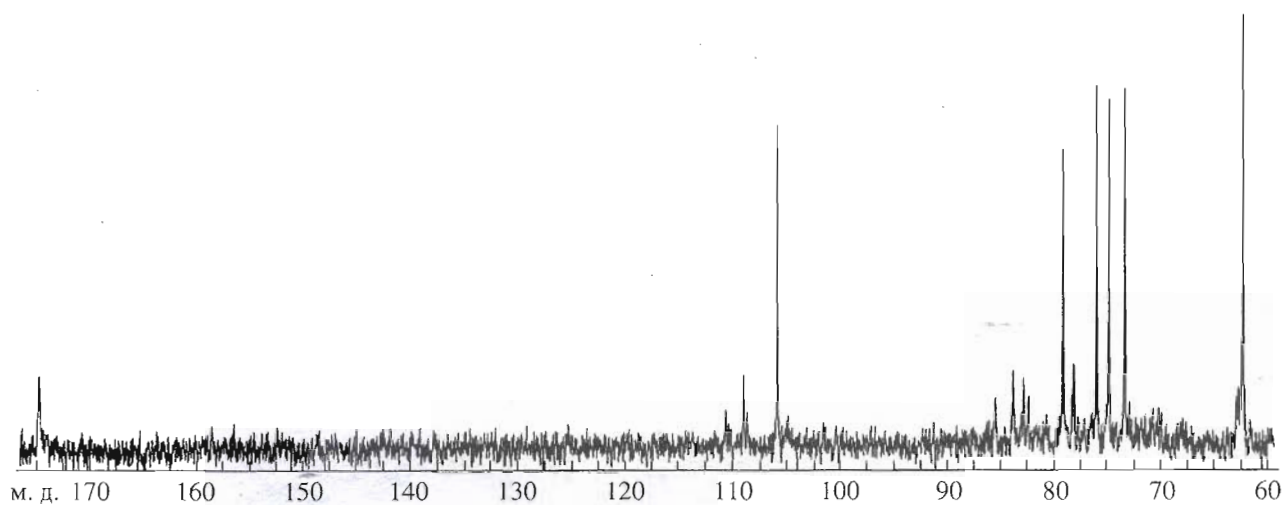


Рис. 1. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахаридной фракции VO3-2.

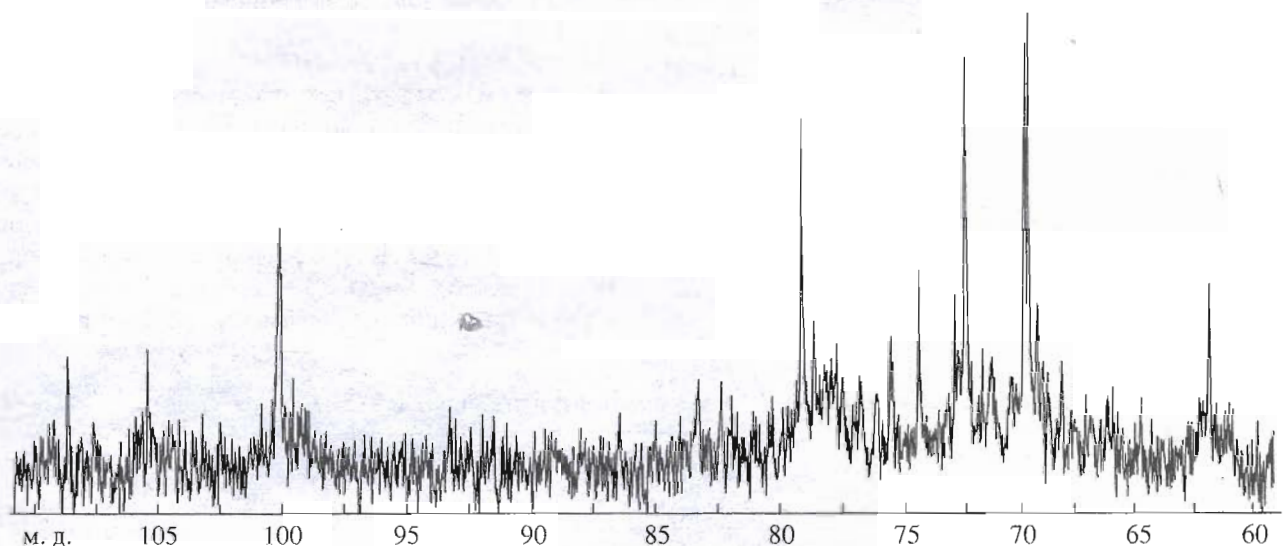


Рис. 2. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахаридной фракции VO3-3.

степенью замещения основной цепи хорошо видны все шесть уширенных сигналов незамещенных боковыми цепями остатков  $\alpha$ -1,4-связанной *D*-галактуроновой кислоты (рис. 2). Пиранидная форма и  $\alpha$ -конфигурация остатков *D*-галактуроновой кислоты следует из сильнополюсного положения сигнала аномерных атомов углерода (100.1 м.д.), а замещение по C4 – из сильнополюсного положения сигнала C4 [5]. Минорные сигналы боковых цепей для VO3-3 практически совпадают с таковыми в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахарида VO3-2. Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР полисахарида VO3-2 содержит сигналы только боковых цепей (рис. 3).

Ввиду плохого разрешения сигналов в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР полисахарида VO3-3 отнесения в подспектрах, относящихся к моносахаридным остаткам боковых цепей, выполнены только для VO3-2.

Подспектры моносахаридных остатков боковых цепей были расшифрованы с применением двумерных гомоядерных спектров COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерного спектра  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HMQC. Совместный анализ спектров (табл. 3 и 4) указывает на наличие боковых олигосахаридных цепей, содержащих  $\beta$ -1,4-связанные остатки галактопиранозы, а также цепей с остатками концевых и замещенных по положениям 2,5- и 3,5-остатков  $\alpha$ -арабинофуранозы. Исходя из спектров  $^1\text{H}$ -ЯМР, соотношение остатков  $\beta$ -галактопиранозы и  $\alpha$ -арабинофуранозы составляет 3 : 1. Положение заместителей в остатках  $\alpha$ -1,4-связанной *D*-галактуроновой кислоты не удалось установить из-за сильного уширения сигналов всех протонов, а в остатках  $\beta$ -1,4-связанной галактозы – из-за уши-

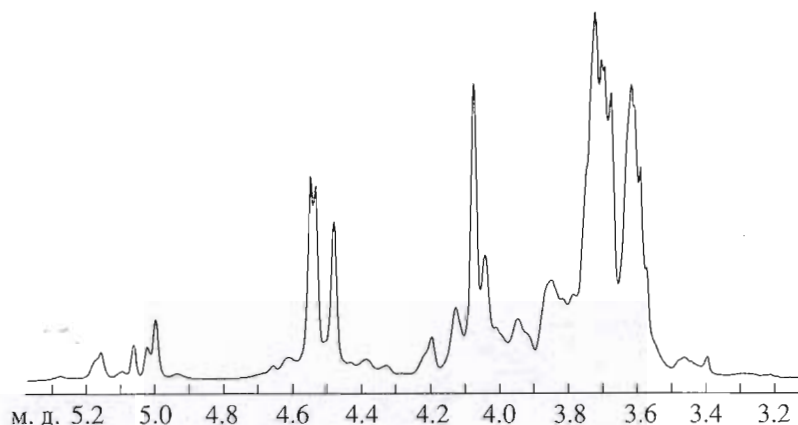


Рис. 3. Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР полисахаридной фракции VO3-2.

рения сигналов протонов при атомах углерода, несущих замещенный гидроксил.

Таким образом, кислые полисахариды VO3-2 и VO3-3 имеют основную углеводную цепь  $\alpha$ -1,4-D-галактуронана и боковые цепи, характерные для пектиновых веществ.

Иммуностимулирующую активность изучаемых полисахаридов оценивали по их влиянию на поглотительную способность фагоцитов перитонеальных макрофагов крыс и на секрецию ими лизосомных ферментов (табл. 5). Установлено, что водорастворимые полисахаридные фракции из

шрота ягод калины обыкновенной усиливают способность макрофагов поглощать частицы латекса, кроме того, полисахариды VO3-1 и VO4-1 и VO3-2 и VO4-2 увеличивают секрецию перитонеальными макрофагами лизосомных ферментов, определяемую по изменению активности миелопероксидазы (табл. 5). Удаление из культуральной среды ионов кальция отменяет эффект кислых полисахаридов, тогда как нейтральные полисахариды стимулируют макрофаги и в бескальциевой среде (табл. 6). Кислые и нейтральные полисахаридные фракции, по-видимому, реализуют свое

Таблица 3. Положение сигналов в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахаридов VO3-2 и VO3-3

| Остаток  | Химический сдвиг, $\delta$ , м.д. |      |      |      |      |       |
|--|-----------------------------------|------|------|------|------|-------|
|  | C1                                | C2   | C3   | C4   | C5   | C6    |
| * $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -GalAp-(1 $\rightarrow$ | 100.1                             | 69.5 | 70.1 | 79.1 | 72.5 | 175.1 |
| $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$     | 105.8                             | 73.4 | 74.8 | 79.1 | 76.0 | 62.3  |
| $\alpha$ -Araf-(1 $\rightarrow$                      | 110.6                             | 82.9 | 78.2 | 82.9 | 62.7 |       |
| $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Araf-(1 $\rightarrow$    | 108.7                             | 85.7 | 78.2 | 85.5 | 62.8 |       |
| $\rightarrow$ 3,5)- $\alpha$ -Araf-(1 $\rightarrow$  | 109.1                             | 80.9 | 83.0 | 84.0 | 68.0 |       |
| $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -Araf-(1 $\rightarrow$    | 109.1                             | 82.3 | 78.3 | 83.8 | 68.4 |       |

\* Положение сигналов в спектре для полисахарида VO3-3. Остальные сигналы даны для VO3-2.

Таблица 4. Положение сигналов в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР полисахарида VO3-2

| Остаток   | Химический сдвиг, $\delta$ , м.д. |      |      |      |      |      |      |      |
|---|-----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|   | H1                                | H2   | H3   | H4   | H5   | H5'  | H6a  | H6b  |
| $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Galp-(1 $\rightarrow$    | 4.65                              | 3.71 | 3.80 | 4.19 | 3.73 | —    | 3.87 | 3.82 |
| $\alpha$ -Araf-(1 $\rightarrow$                     | 5.28                              | 4.25 | 3.99 | 4.17 | 3.86 | 3.75 | —    | —    |
| $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Araf-(1 $\rightarrow$   | 5.19                              | 4.17 | 4.00 | 4.08 | 3.86 | 3.76 | —    | —    |
| $\rightarrow$ 3,5)- $\alpha$ -Araf-(1 $\rightarrow$ | 5.14                              | 4.31 | 4.32 | 4.13 | 3.95 | 3.85 | —    | —    |
| $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -Araf-(1 $\rightarrow$   | 5.12                              | 4.16 | 4.05 | 4.24 | 3.92 | 3.83 | —    | —    |

**Таблица 5.** Поглощительная способность перитонеальных макрофагов крыс и секрция ими лизосомных ферментов при инкубации с полисахаридными фракциями из шрота ягод калины обыкновенной\*

| Полисахаридные фракции (10 мкг/мл) | Фагоцитарный показатель, % | УФП, % | Активность миелопероксидазы, $A_{492} \times 1000$ | РАМ, % |
|------------------------------------|----------------------------|--------|--|--------|
| Контроль                           | 32 ± 3                     | –      | 689 ± 90   | –      |
| VO1                                | 35 ± 3                     | –      | 665 ± 87   | –      |
| VO2                                | 34 ± 4                     | –      | 661 ± 71   | –      |
| VO3                                | 39 ± 2***                  | 22     | 780 ± 62   | –      |
| VO3-1                              | 39 ± 2***                  | 22     | 887 ± 62***  | 29     |
| VO3-2                              | 42 ± 4***                  | 31     | 791 ± 22**   | 15     |
| VO4                                | 39 ± 3***                  | 22     | 762 ± 129  | –      |
| VO4-1                              | 36 ± 2**                   | 13     | 1065 ± 162***                                      | 55     |
| VO4-2                              | 42 ± 4***                  | 31     | 1158 ± 225***                                      | 68     |

\* Время инкубации 1 ч. Данные представлены в виде среднего арифметического значения ± стандартное отклонение.  $n = 10$ ;  $A_{492}$  – оптическое поглощение.

\*\* Различия достоверны при  $p < 0.01$ .

\*\*\* Различия достоверны в сравнении с контролем при  $p < 0.001$ .

УФП – увеличение фагоцитарного показателя по сравнению с контролем.

РАМ – рост активности миелопероксидазы по сравнению с контролем.

действие на макрофаги по разному механизму, и поэтому исследование особенностей структуры данных полисахаридов представляет интерес для понимания взаимосвязи строения полисахаридов и их физиологической активности.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Шрот ягод калины обыкновенной любезно предоставлен сотрудниками Института органической химии УНЦ РАН, г. Уфа.

#### Общие аналитические методы

Содержание гликуроновых кислот определяли по реакции с конц. серной кислотой и 2,3-диметилфенолом [6], белка – по методу Лоури [7], метоксильных групп – по методу, описанному ранее [8]. Спектрометрические измерения осуществляли на приборе СФ-26.

Бумажную хроматографию (БХ) проводили на бумаге Filtrak FN-13 нисходящим методом в системе *n*-бутанол–пиридин–вода (6 : 4 : 3); пятна моносахаридов обнаруживали с помощью кислотоанилифталата при 105°C.

Газо-жидкостную хроматографию (ГЖХ) выполняли на хроматографе Hewlett-Packard 4890А с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой RTX-1 (0.25 мм × 30 м), с использованием аргона в качестве газа-носителя. Нейтральные моносахариды определяли в виде соответствующих ацетатов полиолов [9], гликуроновые кислоты – в виде ацетатов метилгликозидов [10]. Температурный режим: для ацетатов полиолов –

175 → 250°C, скорость 3°/мин; для метилгликозидов – 150 → 290°C, скорость 5°/мин.

Спектры ЯМР снимали на спектрометре DRX-500 фирмы Bruker для 3–5 % растворов в D<sub>2</sub>O при температуре 60°C. При съемке двумерных спектров ЯМР использовали стандартные методики из мат. обеспечения фирмы. Время спин-локка для спектра TOCSY составляло 0.2 с, время смешивания в спектре ROESY – 0.1 с.

Все растворы упаривали в вакууме при 40°C.

**Выделение полисахаридов** осуществляли из шрота ягод как описано ранее [3]. Получили фракцию VO1 (экстракция водой при комнатной температуре 3 ч), VO2 (экстракция водой при 70°C, 3 ч), VO3 (водой, подкисленной соляной

**Таблица 6.** Активность миелопероксидазы перитонеальных макрофагов крыс при их инкубации (1 ч) с полисахаридами из шрота ягод калины обыкновенной в растворе Хэнкса и PBS\*

| Полисахаридные фракции (10 мкг/мл) | $A_{492} \times 1000$    |            |
|------------------------------------|--------------------------|------------|
|                                    | 1.3 mM CaCl <sub>2</sub> | PBS        |
| Контроль                           | 680 ± 71                 | 487 ± 54   |
| VO3-1                              | 885 ± 71**               | 709 ± 58** |
| VO3-2                              | 824 ± 85**               | 502 ± 61   |
| VO4-1                              | 959 ± 102**              | 940 ± 81** |
| VO4-2                              | 1180 ± 120**             | 513 ± 49   |

\* Данные представлены в виде среднего арифметического значения ± стандартное отклонение  $n = 6$ .

\*\* Различия достоверны в сравнении с контролем при  $p < 0.001$ .

кислотой до pH 4, 70°C, 3 ч) и VO4 (0.7 % водным раствором оксалата аммония, 68°C, 3 ч).

Растворы фракций VO1–VO4 (150–200 мг) наносили на колонку (3 × 35 см) с DEAE-целлюлозой (ОН<sup>-</sup>-форма) и элюировали ступенчатым градиентом по 400 мл каждой молярности (0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5) и 1 М NaCl до полного элюирования (скорость 46 мл/ч). Собирали фракции (по 14 мл), которые регистрировали на хроматографической системе Uvicord SII при 206 нм. Объединенные фракции, соответствующие отдельным пикам, концентрировали, диализовали и лиофилизовали. Получили полисахаридные фракции VO1-1, VO2-1, VO3-1, VO3-2, VO3-3, VO4-1, VO4-2 (табл. 2).

Полученные полисахариды (50–60 мг) наносили на колонку (1.5 × 40 см) с сефакрилом S-500 и элюировали 0.1 М NaCl, осуществляя контроль по реакции с фенолом в конц. серной кислоте [11]. На выходных кривых во всех случаях наблюдали по одному пику, который выходил с объемом 40–45 мл (свободный объем колонки 25 мл).

**Полный кислотный гидролиз.** Полисахариды (5 мг) нагревали с 2 М трифторуксусной кислотой (1 мл), содержащей мио-инозит (1 мг), 8 ч при 100°C, кислоту удаляли многократным упариванием в вакууме досуха с метанолом. Моносахариды идентифицировали с помощью БХ и ГЖХ.

**Частичный кислотный гидролиз.** Полисахарид VO3-3 (20 мг) нагревали с 0.1 М трифторуксусной кислотой (4 мл) 3 ч при 100°C. Остаток отделяли центрифугированием. В супернатанте БХ идентифицировали нейтральные моносахариды. Осадок заливали новой порцией 0.1 М трифторуксусной кислоты и нагревали при тех же условиях. Процедуру повторяли до отсутствия в супернатанте моносахаридных остатков. Остаток подвергали полному кислотному гидролизу как описано выше и идентифицировали в гидролизате с помощью БХ галактуроновою кислоту и рамнозу, наличие которой подтверждено с помощью ГЖХ.

**Ферментативный гидролиз.** Ферментативный гидролиз проводили очищенной пектиназой фирмы Fergak (Германия). Раствор полисахарида VO3-3 в воде (20 мг/20 мл) обрабатывали пектиназой (1 мг) при 37°C в течение 1 ч. Пектиназу дезактивировали кипячением при 100°C. Полисахарид и олигосахариды осаждали из раствора этиловым спиртом, наличие галактуроновою кислоты в спиртовом фильтрате определяли с помощью БХ. Оставшийся после ферментализации полисахарид вновь растворяли в воде и добавляли следующую порцию пектиназы. Пектинолиз проводили до отсутствия в спиртовом фильтрате галактуроновою кислоты. Остаток гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой. В гидролизате идентифицировали галактуроновою кислоту и нейтральные моносахариды.

**Определение иммуностимулирующей активности.** Перитонеальные клетки получали от крыс Wistar массой 200–250 г промыванием брюшной полости охлажденным фосфатно-солевым буфером (PBS), содержащим 10 ед/мл гепарина [12]. Клеточную суспензию инкубировали в лунках плоскодонного 96-луночного планшета и в пластиковых чашках Петри (Ø35 мм) в течение 120 мин при 37°C. После инкубации надосадочную жидкость удаляли, а прилипшие клетки осторожно отмывали раствором Хэнкса.

К монослою макрофагов в лунках добавляли исследуемые полисахариды в конечной концентрации 10 мкг/мл, раствор Хэнкса (содержит 1.3 мМ CaCl<sub>2</sub>) или PBS и инкубировали при 37°C в течение 60 мин, после чего определяли активность миелопероксидазы в макрофагах. В отдельных экспериментах в чашки Петри добавляли исследуемые полисахариды в различных концентрациях и частицы латекса. После инкубации при 37°C в течение 60 мин с помощью световой микроскопии определяли фагоцитарный показатель макрофагов [1].

Активность миелопероксидазы определяли спектрофотометрическим методом [13], используя *орто*-фенилендиамин (0.4 мг/мл) в качестве субстрата. Оптическое поглощение (A) раствора в лунках измеряли при 492 нм с помощью спектрофотометра планшеточного формата АКИ-Ц1 (Россия) и выражали в условных единицах (A<sub>492</sub> × 1000).

При обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение, среднее квадратичное отклонение. Достоверность различий оценивалась по *t*-критерию Стьюдента.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность за поддержку данного исследования РФФИ (грант № 96-04-49641), Научному совету: "Химия и технология переработки растительного сырья" (грант № 96-22) и Федеральной целевой программе "Интеграция" (К 0929), а также М.С. Юнусову (Институт органической химии УНЦ РАН).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оводов Ю.С. // Биоорг. химия. 1998. Т. 24. С. 483–501.
2. Степанова Т.А., Каминская А.В., Деркач А.И., Комиссаренко Н.Ф. // Раст. ресурсы. 1998. Т. 34. С. 21–34.
3. Оводова Р.Г., Головченко В.В., Попов С.В. // Химия раст. сырья. 1999. № 1. С. 53–57.
4. Stephen A.M. // The Polysaccharides. V. 2 / Ed. G.O. Aspinall. N. Y.: Acad. Press, 1983. P. 98–195.
5. Jansson P.-E., Kenne L., Widmalm G. // Carbohydr. Res. 1989. V. 188. P. 169–191.

6. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Marina. 1995. V. 38. P. 43–51.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
8. Wood P.J., Siddiqui I.R. // Analyt. Biochem. 1971. V. 39. P. 418–423.
9. York W.S., Darvill A.G., McNeil M., Stevenson T.T., Albersheim P. // Methods Enzymol. 1985. V. 118. P. 3–40.
10. Perepelov A.V., Babicka D., Shashkov A.S., Arbatsky N.P., Senchenkova S.N., Rozalski A., Knirel Y.A. // Carbohydr. Res. 1999. V. 318. P. 186–192.
11. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Analyt. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.
12. Хант С. Лимфоциты. Методы: Пер. с англ. М.: Мир, 1990.
13. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М.: ВНИРО, 1995.

## The Isolation, Preliminary Structural Studies, and Physiological Activity of Water-soluble Polysaccharides from the Squeezed Berries of Snowball Tree *Viburnum opulus*

R. G. Ovodova\*#, V. V. Golovchenko\*, S. V. Popov\*, A. S. Shashkov\*\*, and Yu. S. Ovodov\*

\*Institute of Physiology, Komi Research Center, Urals Branch, Russian Academy of Sciences, Pervomayskaya ul. 50, Syktyvkar, 167610 Russia

\*\*Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 117913 Russia

Water-soluble polysaccharide fractions VO1–VO4 were isolated from the squeezed berries of snowball tree (*Viburnum opulus*) by successive extraction with water at various temperatures and pH and with aqueous solutions of ammonium oxalate. These fractions were purified by ion-exchange chromatography on DEAE cellulose, and the homogeneity of the purified polysaccharides was determined by gel filtration on Sephacryl S-500. Acidic polysaccharides close to pectins in their sugar composition were found in all the extracts (fractions VO1-1, VO2-1, VO3-2, and VO4-2). Residues of galacturonic acid, galactose, arabinose, and (to a lesser extent) rhamnose are their main constituents. Neutral polysaccharides composed mainly of galactose and mannose residues were additionally found in fractions extracted with acidified water (pH 4.0) and with aqueous ammonium oxalate solutions. Partial acidic hydrolysis and digestion with pectinase of acidic polysaccharides indicated that their carbohydrate backbone consists of  $\alpha$ -1,4-linked residues of *D*-galacturonic acid. NMR spectra of acidic polysaccharides (fractions VO3-2 and VO3-3) confirmed this and demonstrated that their side oligosaccharide chains are composed of  $\beta$ -1,4-linked galactopyranose residues and of terminal and 2,5- and 3,5-substituted residues of  $\alpha$ -arabinofuranose at a Gal : Ara ratio of 3 : 1.

Some polysaccharides from *V. opulus* were found to possess an immunostimulating activity: they enhance phagocytosis, in particular, the phagocytic index and the secretion of lysosomal enzymes with peritoneal macrophages. Calcium ions were found to be necessary for the appearance of the stimulating effect of acidic polysaccharides from *V. opulus*.

*Key words:* plant polysaccharides, *Viburnum opulus*, mucilages of seeds, pectins, arabinogalactans, NMR spectroscopy of polysaccharides, immunomodulators

# To whom correspondence should be addressed; phone/fax: +7 (8212) 42-1001; e-mail: ovoys@iph.komi.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.