

УДК 581.192.2

ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИСАХАРИДНОГО КОМПЛЕКСА *SAUSSUREA SALICIFOLIA* L. И ЕГО NO-СТИМУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА

© *Е.И. Гулина*^{1*}, *А.В. Зыкова*¹, *А.А. Лигачева*², *М.Г. Данилец*², *Е.С. Трофимова*^{1,2}, *Н.С. Селиванова*²,
*Е.Ю. Шерстобоев*², *Е.А. Горобец*¹, *С.В. Кривошеков*¹, *М.В. Белоусов*¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет, Московский тракт,
2, Томск, 634050 (Россия), e-mail: e.gulina1@gmail.com

² Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной
медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского
медицинского центра РАН, пр. Ленина, 3, Томск, 634028 (Россия)

Выделен и изучен полисахаридный комплекс (ПСК) из надземной части *Saussurea salicifolia* L. (SS). ПСК SS содержит 54.99±0.53% гексоз, 12.99±0.26% уроновых кислот, 5.24±0.04% белка, нейтральные моносахариды представлены глюкозой, галактозой, ксилозой и рамнозой (мольные соотношения: 1.67:1.00:1.20:1.42). С помощью ионообменной хроматографии выделено пять основных компонентов. Структура полученных полисахаридов (ПС) 1-5 охарактеризована с помощью физико-химических методов, таких как ИК-спектроскопия, высокоэффективная эксклюзионная и газожидкостная хроматография, реакции с конго красным. Установлено, что все ПС характеризуются различным содержанием гексоз (от 32.46±2.63 до 83.64±5.93%), уроновых кислот (от 2.56±0.17 до 21.02±2.48%) и незначительной примесью белка (от 0.75±0.13 до 2.28±0.17%). Полученные полисахариды представляют собой высокоомогенные образцы, различные по номерному составу. Мажорный компонент ПС SS-1 представлен галактозой, ПС SS-2, 3, 4 – рамнозой, а ПС SS-5 – глюкозой и ксилозой. Структура тройной спирали установлена для ПСК SS и ПС SS-5. Все выделенные ПС стимулировали NO-синтазу перитонеальных макрофагов на уровне действия липополисахарида (ЛПС), причем образцы 3, 4 и 5 проявляли эндотоксин-независимую активность.

Ключевые слова: соснурья иволистная (*Saussurea salicifolia* L.), полисахариды, ионообменная хроматография, номерный состав, молекулярно-массовое распределение, конго красный, ИК, NO, эндотоксин.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 056-00116-23-01.

Введение

В настоящее время интерес к изучению группы полисахаридов и проявляемой ими иммуотропной активности только возрастает [1–3]. Это объясняется тем, что подавляющее большинство растительных полисахаридов являются биосовместимыми, биоразлагаемыми и относительно нетоксичными и не вызывают значительных побочных эффектов, в отличие от полисахаридов микробного и синтетического происхождения, применение которых в медицине в качестве иммуномодуляторов ограничено [4–6]. Известно, что растительные водорастворимые полисахариды, взаимодействуя с Toll-like рецепторами макрофагов, запускают внутриклеточные сигнальные пути MAP-киназ и NF-κB, приводящие к значительному усилению экспрессии

Гулина Екатерина Игоревна – ассистент кафедры
фармацевтического анализа, e-mail: e.gulina1@gmail.com

Зыкова Анастасия Васильевна – аспирант кафедры
фармацевтического анализа, кандидат химических наук,
e-mail: anastasya.zykova@mail.ru

Лигачева Анастасия Александровна – научный сотрудник
отдела иммунофармакологии, кандидат биологических
наук, e-mail: ligacheva_aa@pharmso.ru

генов как противовоспалительных цитокинов (ФНО-α, ИЛ-6), так и индуцибельной NO-синтазы (iNOS) [7, 8]. Молекула оксида азота (NO) является универсальным трансмиттером различных патологических процессов, играющим важную роль в регуляции нервной, эндокринной и репродуктивной систем. Антигенпрезентирующие клетки при кон-

Окончание на С. 100.

* Автор, с которым следует вести переписку.

такте с антигеном секретируют NO, который регулирует функциональную активность, деление и гибель многих типов иммунных и воспалительных клеток, включая макрофаги, Т-лимфоциты, нейтрофилы, тучные и естественные киллерные клетки [9, 10].

Род Соссюрея (*Saussurea* DC.) является одним из перспективных представителей семейства Астровые, содержащих в своем составе полисахариды [11], обладающие эндотоксин-независимой иммуностимулирующей активностью, которая была установлена в скрининговых исследованиях для *Saussurea controversa* DC., *Saussurea salicifolia* L. и *Saussurea frolovii* Ledeb. [12]. Установлено, что разные факторы, включая способ получения полисахаридов, моносакхаридный состав, тип гликозидных связей, размер молекул (молекулярная масса) и общую молекулярную конформацию, способны оказывать влияние на активность полисахаридов [13, 14]. Несмотря на рост числа исследований химического состава и биологической активности растений рода *Saussurea*, группа полисахаридов с химической точки зрения все еще остается недостаточно изученной.

Цель исследования – изучение химического состава полисахаридов, выделенных из *Saussurea salicifolia* L., и его NO-стимулирующие свойства.

Экспериментальная часть

Растительный материал. Надземная часть соссюреи иволистной (*Saussurea salicifolia* L.) заготовлена во время цветения на территории Хакасии в окрестностях с. Ефремкино в июле 2020 года и доведена до воздушно-сухого состояния. Заготовка осуществлена профессором А.А. Семеновым, идентификация – профессором М.Н. Шуруповой в гербарии Томского государственного университета.

Общие аналитические методы. Для изучения ПСК и индивидуальных ПС по содержанию гексоз и уроновых кислот использовали спектрофотометрические фенол-серный и 3,5-диметилфенолсерный метод (фенол – стандарт глюкоза («Sigma Aldrich», США); 3,5-диметилфенол – стандарт галактуроновая кислота («Sigma Aldrich», США) [15, 16]. Примесь белка определяли методом Лоури с предварительным осаждением с использованием бычьего сывороточного альбумина («Amresco», США) в качестве стандарта [17]. Спектрофотометрические исследования проводили в кварцевых кюветах 10 мм на спектрофотометре СФ-2000 («ОКБ-Спектр», Россия). ИК-спектры записывали в интервале 400–4000 см⁻¹ в дисках с КВг на приборе ИК-Фурье спектрометр ФСМ-2201 («Инфраспек», Россия).

Методика выделения ПСК из сырья. Полисахаридный комплекс выделяли из надземной части *Saussurea salicifolia* L. [18] двукратной экстракцией в течение 3 ч при температуре 95 °С водой очищенной с рН=2, соотношение сырья экстрагента – 1 : 30. Шрот от экстракта отделяли фильтрованием под вакуумом, полученные экстракты упаривали на ротационном испарителе, ПСК осаждали спиртом этиловым 96% (1:4) и оставляли на 12 ч при температуре 4 °С. Образовавшиеся осадки отделяли от спирта центрифугированием, с дальнейшим растворением осадков в воде очищенной, повторно центрифугировали и надосадочную жидкость диализировали до достижения электропроводности диализата менее 4 мкСм/см с использованием кондуктометра F3 FiveGo™ («Mettler-Toledo», Китай), после чего замораживали и лиофильно высушивали (рис. 1).

Данилец Марина Григорьевна – заведующий отделом экспериментальных биологических моделей, доктор биологических наук, e-mail: m.danilets@mail.ru

Трофимова Евгения Сергеевна – старший научный сотрудник отдела иммунофармакологии, кандидат медицинских наук, e-mail: trofimova_es@pharmso.ru

Селиванова Наталья Сергеевна – младший научный сотрудник отдела иммунофармакологии, e-mail: selivanova_ns@pharmso.ru

Шерстобоев Евгений Юрьевич – заведующий отделом иммунофармакологии, доктор медицинских наук, профессор, e-mail: sherstoboev_eu@pharmso.ru

Горобец Елизавета Александровна – студентка 5 курса фармацевтического факультета, кандидат химических наук, e-mail: elizabetta.gor777@yandex.ru

Кривошецов Сергей Владимирович – доцент кафедры фармацевтического анализа, кандидат химических наук, e-mail: ksv_tsu@mail.ru

Белюсов Михаил Валерьевич – заведующий кафедрой фармацевтического анализа, доктор фармацевтических наук, профессор, e-mail: mvb63@mail.ru

Ионообменная хроматография. Выделение ПС проводили методом ионообменной хроматографии с использованием DEAE-целлюлозы (СI-форма, 20×3,5 см) марки DEAE 52 («Servacel», США) в режиме градиентного элюирования равными объемами (500 мл) воды очищенной и растворами натрия хлорида (0.01; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 М) по увеличению концентрации, скорость потока подвижной фазы 3,0 мл/мин. Фракции (15 мл) элюата собирали и анализировали фенол-серным методом [19]. Фракции, дающие положительную реакцию на углеводы, объединяли, упаривали, диализировали до удаления NaCl с кондуктометрической детекцией как описано выше, замораживали и лиофильно высушивали.



Рис. 1. Схема выделения полисахаридов из травы *Saussurea salicifolia* L.

Молекулярно-массовое распределение определяли с помощью высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии [20] с использованием хроматографа Ultimate 3000 с рефрактометрическим детектором RI-101 («Dionex», «Thermo», Германия), подвижная фаза – 0.01 М раствор натрия нитрата; 0.1% натрия азид в воде, колонка – Ultrahydrogel 250, 7,8 x 300 мм, 250 Å («Waters», США), объем пробы 10 мкл, скорость потока 0.5 мл/мин, температура термостата колонки 30 °С. Для расчета значений среднечисловой (M_w) и среднечисленной (M_n) молекулярных масс использовали стандартные образцы пуллуланов (lot. Pulkitsa-10 Mr 342-708000 Da, PSS GmbH).

Моносахаридный состав устанавливали методом газожидкостной хроматографии [21–26] на хроматографе Agilent 7890 с пламенноионизационным детектором («Agilent Technologies», США), колонка – DB-5 («Agilent Technologies», США, 0.25 мм, 30 м), анализ проводили в температурном режиме от 175 °С (1 мин) до 250 °С (2 мин) со скоростью увеличения температуры 3 °С/мин. Предварительно навески полисахарида (10 мг) гидролизуют 2 М трифторуксусной кислотой, далее проводят дериватизацию силилирующим агентом (смесь триметилхлорсилан:триметилсилил имидазол 3 : 1, 100 мкл) в присутствии безводного пиридина (200 мкл) при температуре 75 °С в течение 25 мин. Полученные ТМС-производные сахаров дважды экстрагировали 500 мкл гексана.

Пространственную структуру определяли спектрофотометрическим методом по реакции с конго красным (КК). 1 мл исследуемого образца (1 мг/мл) смешивали с 1 мл КК (80 мкМ) и прибавляли раствор NaOH (2 М) до достижения концентрации от 0.0 до 0.5 М (шаг 0.05 М). Строили график зависимости максимума поглощения образующегося комплекса от концентрации NaOH.

Влияние ПС на функциональную активность макрофагов (продукция оксида азота). Оценку биологической активности ПС проводили на линейных мышах C57BL/6 (245 голов, возраст 7–8 недель) на базе НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (исследование одобрено биоэтическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (протокол № 171052020 от 18.05.2020 г.)). Зрелые макрофаги (МФ) выделяли из клеток перитонеального экссудата помощью набора EasySep™ Biotin Positive Selection Kit и антител специфических к макрофагальным рецепторам Anti-Mouse F4/80 Antibody (оба «Stem Cell», США) согласно прилагаемой инструкции. МФ культивировали (37 °С, 5% CO₂, 100% влажность) в полной культуральной среде ((RPMI 1640 («Sigma», США) с добавлением 10% ЭТС («Hyclone», Великобритания), 20 мМ HEPES («Sigma», США), 0.05 мМ 2-меркаптоэтанола («Sigma», США), 50 мкг/мл гентамицина (Sigma», США) и 2 мМ L-глутамина («Sigma», США)) 48 ч в 96-луночных плоскодонных планшетах с исследуемыми образцами полисахаридов или ЛПС

(*E.coli* K-235, серотип O111:B4, «Sigma», США) в качестве контроля метода. В супернатантах при помощи реактива Грисса («Sigma», США) оценивали активность NO-синтазы (по содержанию нитритов).

Оценку пролиферации МФ проводили колориметрическим методом с помощью раствора МТТ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide («Sigma», США)) [27].

Примесь эндотоксина в исследуемых образцах определяли в тесте с полимиксином Б («InvivoGen», США) согласно прилагаемой инструкции.

Статистическая обработка. Полученные в ходе исследования данные обрабатывали с помощью пакета статистических программ Statistica 13.3, используя критерий Шапиро-Уилка для проверки нормальности распределения, однофакторный дисперсионный анализ и критерий Даннета. Результаты представлены в виде $X \pm m$, где X – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего. Уровень статистической значимости различий – $p < 0.05$, объем выборки – $n=9$.

Обработку спектров проводили в программном пакете «OriginPro 2019b».

Результаты и обсуждение

Выход ПСК SS из травы сосюреи иволистной составил $1.92 \pm 0.38\%$. Содержание гексоз в пересчете на глюкозу – $54.99 \pm 0.53\%$, уроновых кислот в пересчете на галактуроновую кислоту – $12.99 \pm 0.26\%$, примеси белка – $5.24 \pm 0.04\%$. Значение средневесовой молекулярной массы составило 175.90 ± 21.87 кДа, среднечисловой – 27.10 ± 5.35 кДа, коэффициент гетерогенности – 6.5. Мономерный состав представлен 4 моносахаридами глюкоза – галактоза – ксилоза – рамноза в соотношении 1.67 : 1.00 : 1.20 : 1.42 соответственно.

В результате фракционирования установлено, что ПСК SS состоит из пяти фракций ПС (ПС SS 1-5), элюированных подвижной фазой с разной ионной силой (рис. 2).

Согласно данным, приведенным в таблице 1, все выделенные ПС характеризуются различным содержанием компонентов углеводной природы и низким содержанием примеси белка. С ростом концентрации элюента наблюдали увеличение содержания уроновых кислот и молекулярных масс в выделенных фракциях в 8.21 и 3.04 раза соответственно, за исключением ПС SS-5.

Согласно данным таблицы 2, ПС SS-1 содержит в своем составе наибольшее количество нейтральных сахаров, мажорный компонент представлен галактозой (до 52.8%), содержание рамнозы и глюкозы – меньше в 1.95 и 2.62 раза соответственно. Преобладающий моносахарид, обнаруженный в ПС SS-2, ПС SS-3 и ПС SS-4 – рамноза, кроме этого в образцах ПС SS-3, ПС SS-4 и ПС SS-5 идентифицированы остатки ксилозы. Максимальное содержание уроновых кислот установлено для ПС SS-3 и ПС SS-4. В образце ПС SS-5 отсутствуют остатки рамнозы, а мажорными моносахаридами являются глюкоза и ксилоза.

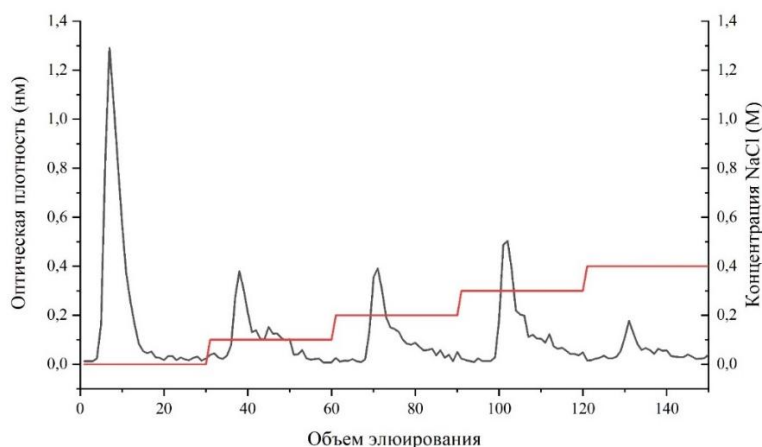


Рис. 2. Кривая элюирования ПСК травы SS на DEAE-целлюлозе

Таблица 1. Химическая характеристика ПС.

Фракция	Выход, %	Гексозы, %	Уроновые кислоты, %	Белок, %	Mw, кДа	Mn, кДа	Mw/Mn
ПС SS-1	19.02±0.47	83.64±5.93	2.56±0.17	2.27±0.27	74.13±10.24	12.42±3.12	5.97
ПС SS-2	13.58±0.44	53.49±2.25	7.22±0.74	1.79±0.43	100.63±9.81	24.02±5.08	4.19
ПС SS-3	17.28±0.49	36.62±2.65	21.03±2.48	0.75±0.13	128.62±17.28	29.62±5.98	4.34
ПС SS-4	28.19±0.51	44.99±4.56	20.07±3.70	1.18±0.25	225.49±26.07	48.56±6.76	4.64
ПС SS-5	6.93±0.46	32.46±2.63	11.91±0.66	2.28±0.17	145.82±18.02	17.93±1.65	8.13

Таблица 2. Мономерный состав ПС SS.

Фракция	Мономерный состав			
	Glc	Gal	Xyl	Rha
ПС SS-1	20.1±0.3	52.8±0.5	-	27.0±0.3
ПС SS-2	34.7±0.4	10.9±0.2	-	54.4±0.5
ПС SS-3	31.9±0.4	8.3±0.2	8.1±0.1	51.5±0.4
ПС SS-4	24.1±0.3	5.9±0.1	30.9±0.4	39.1±0.3
ПС SS-5	43.4±0.5	13.0±0.2	41.6±0.4	-

Для всех образцов (рис. 3) наблюдается увеличение максимума поглощения при прибавлении раствора конго красного, что соответствует образованию комплекса между КК и исследуемым образцом. При прибавлении натрия гидроксида к образцам ПС SS-1, ПС SS-2, ПС SS-3, ПС SS-4 не наблюдали гипсохромного сдвига, что характерно для отсутствия структуры тройной спирали [28, 29]. Для образцов ПСК SS и ПС SS-5 наблюдали снижение максимума поглощения, связанное с наличием структуры тройной спирали.

На ИК-спектрах во всех образцах наблюдали широкую интенсивную полосу поглощения в области 3600–3200 см⁻¹, обусловленную валентными колебаниями О–Н группы, и полосы поглощения около 2932–2924 см⁻¹ характерные для валентных и деформационных колебаний С–Н в углеводных кольцах (рис. 4) [30, 31]. На спектрах присутствуют схожие профили поглощения во всем исследуемом диапазоне волновых чисел, отличающиеся лишь значениями относительных оптических плотностей при волновых числах 1645 и 1740 и 625 см⁻¹, характеристичным для валентных колебаний карбоксильных групп, что объясняется различным относительным содержанием во фракциях остатков уроновых кислот [32–34].

Согласно данным, приведенным в таблице 3, все индивидуальные полисахариды стимулировали продукцию оксида азота, начиная с 20 мкг/мл в 11.5–19.4 раза. При культивировании с ПС SS-1, ПС SS-2 и ПС SS-3 наблюдались различия между использованными концентрациями. Разные дозы ПС SS-4 и ПС SS-5 повышали синтез NO в равной степени. При сравнении ПС между собой оказалось, что, в целом, образец ПС SS-1 по силе воздействия несколько слабее, чем остальные. Немного более значительное действие проявил ПС SS-2. А образцы ПС SS-3, ПС SS-4 и ПС SS-5 примерно с одинаковыми по степени усиления продукции оксида азота макрофагами.

Высокие концентрации проявили слабую токсичность: пролиферация при использовании концентрации веществ 200 мкг/мл снижалась в 1.19–1.25 раза по сравнению с контролем, кроме ПС SS-4: этот образец не обладал цитотоксическими свойствами ни в одной из использованных концентраций. ПС SS-2 снижал пролиферацию макрофагов и в концентрации 100 мкг/мл. Среди использованных концентраций для каждого ПС зафиксированы различия между самой низкой (20 мкг/мл) и высокой (200 мкг/мл), кроме ПС SS-4. В культуре клеток с ПС SS-5 пролиферация снижена и в концентрации 100 мкг/мл по сравнению с 20 мкг/мл. А под влиянием ПС SS-3 наблюдалось уменьшение оптической плотности в дозе 200 мкг/мл по сравнению с 50 мкг/мл. Между собой по токсичности изученные образцы не отличались.

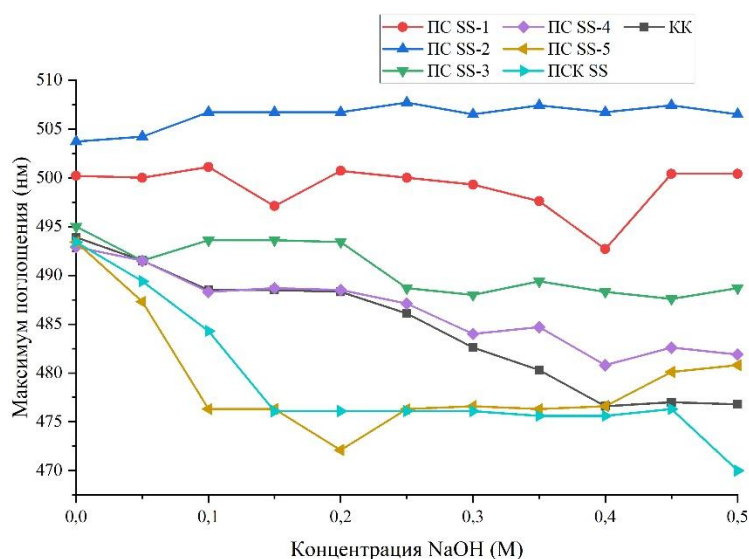


Рис. 3. Зависимость максимума поглощения от концентрации NaOH

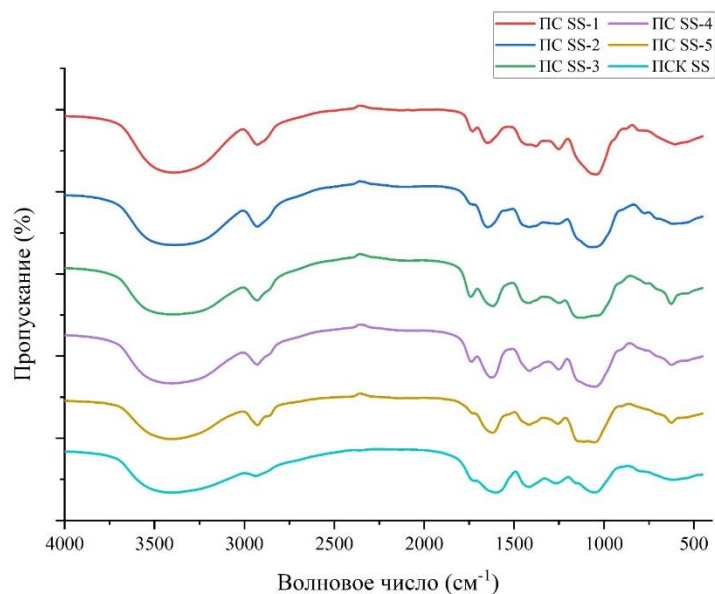


Рис. 4. ИК-спектр фракций PS SS-1-5 и ПСК SS

Таблица 3. Влияние индивидуальных ПС SS на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами интактных мышей линии C57BL/6 и их пролиферацию ($X \pm m$)

Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Концентрация нитритов, мкМ	Пролиферация, ед. опт. плотности
Среда (контроль 1)	–	3.25 ± 0.09	570 ± 3
ЛПС (контроль 2)	0.1	$39.13 \pm 0.67^*$	574 ± 8
ПС SS-1	20	$37.30 \pm 0.22^*$	556 ± 8
	50	$46.61 \pm 0.18^{*•}$	520 ± 6
	100	$46.83 \pm 0.21^{*•}$	512 ± 6
	200	$50.99 \pm 0.30^{*•}$	$459 \pm 5^{*•}$
ПС SS-2	20	$46.42 \pm 0.24^{*•}$	560 ± 4
	50	$49.48 \pm 0.58^{*•}$	528 ± 7
	100	$55.55 \pm 0.22^{*•}$	$488 \pm 4^{*•}$
	200	$62.99 \pm 0.29^{*•}$	$458 \pm 6^{*•}$
ПС SS-3	20	$49.54 \pm 0.17^{*•}$	595 ± 6
	50	$55.02 \pm 0.43^{*•}$	570 ± 7
	100	$58.49 \pm 0.33^{*•}$	518 ± 4
	200	$62.28 \pm 0.60^{*•}$	$480 \pm 8^{*•}$
ПС SS-4	20	$55.73 \pm 0.45^{*•}$	575 ± 4
	50	$59.16 \pm 0.59^{*•}$	558 ± 9
	100	$60.77 \pm 0.41^{*•}$	513 ± 2
	200	$58.51 \pm 0.63^{*•}$	496 ± 5
ПС SS-5	20	$57.50 \pm 0.56^{*•}$	588 ± 7
	50	$57.32 \pm 0.55^{*•}$	524 ± 6
	100	$55.98 \pm 0.50^{*•}$	497 ± 7
	200	$56.00 \pm 0.20^{*•}$	$458 \pm 9^{*•}$

Примечание: * – различия показателя с контролем достоверны, • – различия показателя по сравнению с ЛПС.

Известно, что полисахариды проявляют фармакологическую активность за счет структурного сходства с фрагментами мембран бактериальной клетки. Кроме этого, растительные ПС могут содержать бактериальный эндотоксин – ЛПС, обладающий, как значительными NO-продуцирующими свойствами, так и токсическим пирогенным действием. Для определения его примеси в образцах ПС широко применяют антибиотик полимиксин Б [35].

Результаты исследования примеси эндотоксина приведены в таблице 4. Обработка образцов полимиксином Б показала, что два первых образца содержат примесь эндотоксина, причём ПС SS-1 в большем количестве, чем ПС SS-2. При этом обработка антибиотиком ПС не приводила к снижению концентрации нитритов до уровня контроля. ПС SS-3, ПС SS-4 и ПС SS-5 свободны от эндотоксина, и их NO-стимулирующие свойства обусловлены активностью самих ПС.

Таблица 4. Влияние индивидуальных ПС SS на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов интактных мышей линии C57BL/6 в отсутствие и присутствии полимиксина Б (X±m)

Исследуемое вещество	Концентрация, мг/мл	Концентрация нитритов, мкМ	
		инкубация без полимиксина	инкубация с полимиксином Б
– (контроль)	–	3.27±0.04	2.83±0.17
ЛПС	0.1	57.57±0.39*	4.61±0.26 ^{▲■}
ПС SS-1	20	36.40±0.52*•	7.33±0.31 ^{▲■◆}
ПС SS-2	20	47.27±0.25*•	17.83±0.59 ^{▲■◆}
ПС SS-3	20	66.95±0.54*	66.65±0.36 [◆]
ПС SS-4	20	64.31±0.38*	59.43±0.47 [◆]
ПС SS-5	20	64.99±0.49*	62.81±0.42 [◆]

Примечание таблицы: * – различия показателя со средой без полимиксина достоверны, [■] – различия показателя со средой с полимиксином достоверны, [▲] – различия показателя с инкубацией каждого вещества без полимиксина, [•] – различия показателя по сравнению с ЛПС (без полимиксина) достоверны, [◆] – различия показателя с ЛПС (с полимиксином) достоверны; p<0,05, n=3.

Заключение

Изучен ПСК, выделенный из травы *Saussurea salicifolia* L. Установлено, что в его состав входит пять основных компонентов (ПС SS-1-5), характеризующихся различным содержанием гексоз (от 32.46±2.63 до 83.64±5.93%), наличием в составе урновых кислот (от 2.56±0.17 до 21.03±2.48%), что было также подтверждено результатами ИК-спектроскопии, и незначительной примеси белка. В результате изучения молекулярно-массовых характеристик установлена высокая гомогенность всех образцов. Мажорный компонент ПС SS-1 представлен галактозой, ПС SS-2, ПС SS-3, ПС SS-4 – рамнозой, а ПС SS-5 – глюкозой и ксилозой. Структура тройной спирали установлена для ПСК SS и ПС SS-5 ПС. Все фракции оказывали NO-продуцирующее действие на перитонеальные макрофаги, превышающее эффект ЛПС. Фракции ПС SS-3, ПС SS-4 и ПС SS-5 не содержат примеси эндотоксина.

Проведенные исследования позволяют предположить, что исследованные фракции ПС, выделенные из травы *Saussurea salicifolia* L., являются перспективными объектами для дальнейшего изучения взаимосвязи между структурой полисахаридов и проявляемой активностью. Образцы ПС с установленным составом, свободные от примеси эндотоксина, могут быть использованы для детального изучения иммуномодулирующих свойств и дальнейшей разработки на их основе новых безопасных препаратов для лечения заболеваний, требующих коррекции и регуляции функциональной активности иммунных клеток, включая антигенпрезентирующие клетки – макрофаги.

Список литературы

1. Sindhu R.K., Goyal A., Das J., Neha, Choden S., Kumar P. Immunomodulatory potential of polysaccharides derived from plants and microbes: A narrative review // Carbohydr. Polym. Technol. Appl. 2021. Vol. 2. Art. 100044. DOI: 10.1016/J.CARPTA.2021.100044.
2. Yu Y., Shen M., Song Q., Xie J. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review // Carbohydr. Polym. 2018. Vol. 183, no. 235. Pp. 91–101. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.009.
3. Wainwright C.L., Teixeira M.M., Adelson D.L., Buenz E.J., David B., Glaser K.B., Harata-Lee Y., Howes M.R., Izzo A.A., Maffia P., Mayer A.M., Mazars C., Newman D.J., Nic Lughadha E., Pimenta A.M., Parra J.A., Qu Z., Shen H., Spedding M., Wolfender J.L. Future directions for the discovery of natural product-derived immuno-modulating drugs: an IUPHAR positional review // Pharmacological research. 2022. Vol. 177. Art. 106076. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106076.
4. Singh D., Rajput A., Bhatia A., Kumar A., Kaur H., Sharma P., Kaur P., Singh S., Attri S., Buttar H.S., Singh B., Arora S. Plant-based polysaccharides and their health functions // Functional Foods in Health and Disease. 2021. Vol. 11, no. 4. Pp. 179–200. DOI: 10.31989/ffhd.v11i5.773.
5. Yin M., Zhang Y., Li H. Advances in Research on Immunoregulation of Macrophages by Plant Polysaccharides // Frontiers in immunology. 2019. Vol. 10. Art. 145. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00145.
6. Barbosa J.R., de Carvalho Junior R.N. Polysaccharides obtained from natural edible sources and their role in modulating the immune system: Biologically active potential that can be exploited against COVID-19 // Trends in food science & technology. 2021. Vol. 108. Pp. 223–235. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.12.026.
7. Li M., Wen J., Huang X., Nie Q., Wu X., Ma W., Nie S., Xie M. Interaction between polysaccharides and toll-like receptor 4: Primary structural role, immune balance perspective, and 3D interaction model hypothesis // Food Chem. 2022. Vol. 374. Pp. 131586. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131586.

8. Wei W., Xiao H.T., Bao W.R., Ma D.L., Leung C.H., Han X.Q., Ko C.H., Lau C.B., Wong C.K., Fung K.P., Leung P.C., Bian Z.X., Han Q.B. TLR-4 may mediate signaling pathways of Astragalus polysaccharide RAP induced cytokine expression of RAW264.7 cells // *Journal of Ethnopharmacology*. 2016. Vol. 179. Pp. 243–252. DOI: 10.1016/j.jep.2015.12.060.
9. Ibiza S., Serrador J.M. The role of nitric oxide in the regulation of adaptive immune responses // *Inmunología*. 2008. Vol. 27. Pp. 103–117. DOI: 10.1016/S0213-9626(08)70058-1.
10. Guzik T.J., Korbut R., Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation // *Journal of physiology and pharmacology*. 2003. Vol. 54. Pp. 469–487. DOI: 10.1385/1-59259-374-7:291.
11. Решетов Я.Е., Белоусов М.В., Авдеева Е.Ю., Шурупова М.Н. Сравнительное исследование элементного состава и биологически активных веществ растений рода *Saussurea* // *Химия растительного сырья*. 2018. №4. С. 205–214. DOI: 10.14258/jcrpm.2018043710.
12. Решетов Я.Е., Лигачёва А.А., Авдеева Е.Ю., Данилец М.Г., Головченко В.В., Трофимова Е.С., Гулина Е.И., Шерстобоев Е.Ю., Гурьев А.М., Ровкина К.И., Кривошеков С.В., Белоусов М.В. Полисахариды трех видов *Saussurea* DC (*S. controversa*, *S. salicifolia*, *S. frolovii*): выделение, характеристика и влияние на NO-продуцирующие свойства макрофагов // *Химия растительного сырья*. 2019. №4. С. 77–85. DOI: 10.14258/jcrpm.2019045483.
13. Лигачева А.А., Решетов Я.Е., Авдеева Е.Ю., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Шерстобоев Е.Ю., Белоусов М.В. Влияние способа получения на состав полисахаридов *Saussurea controversa* DC. и их NO-стимулирующая активность // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2019. Т. 22, №7. С. 32–37. DOI: 10.29296/25877313-2019-07-05.
14. Sun Y., Hou S., Song S., Zhang B., Ai C., Chen X., Liu N. Impact of acidic, water and alkaline extraction on structural features, antioxidant activities of *Laminaria japonica* polysaccharides // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. Vol. 112. Pp. 985–995. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.066.
15. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F.A. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Analytical Chemistry*. 1956. Vol. 28, no. 3. Pp. 350–356. DOI: 10.1021/ac60111a017.
16. Tomasić J., Keglević D. Direct spectrophotometric assay of glucuronic acid in the presence of labile glucosiduronic acids // *Anal. Biochem*. 1972. Vol. 45, no. 1. Pp. 164–175. DOI: 10.1016/0003-2697(72)90017-6.
17. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J Biol Chem*. 1951. Vol. 193, no. 1. Pp. 265–275.
18. Гулина Е.И., Андреева В.Ю., Зыкова А.В., Исаков Д.А., Зыкова З.В. Стандартизация надземной части *Saussurea salicifolia* L. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2023. Т. 26, №9. С. 39–47. DOI: 10.29296/25877313-2023-09-06.
19. Rovkina K.I., Krivoshechekov S.V., Guryev A.M., Yusubov M.S., Belousov M.V. Water-Soluble Polysaccharides of Alfalfa (*Medicago sativa* (Fabaceae)) of Flora of Krasnoyarsk Krai // *Russ J Bioorg Chem*. 2018. Vol. 44, no. 7. Pp. 854–859. DOI: 10.1134/S1068162018070105.
20. Гулина Е.И., Кривошеков С.В., Исаков Д.А., Белоусов М.В. Выделение, химическая и пространственная характеристика кислых полисахаридов некоторых растений флоры Сибири, обладающих иммуностропной активностью // *Химия растительного сырья*. 2023. №2. С. 97–105. DOI: 10.14258/jcrpm.20230212366.
21. Ларькина М.С., Кривошеков С.В., Гурьев А.М., Кадырова Т.В., Ермилова Е.В., Коцерубская В.В., Юсубов М.С. Характеристика полисахаридных комплексов василька шероховатого (*Centaurea scabiosa* L.) и василька ложнопятнистого (*Centaurea pseudomaculosa* Dobroc.) // *Химия растительного сырья*. 2016. №2. С. 19–24. DOI: 10.14258/jcrpm.201602786.
22. Корж А.П., Гурьев А.М., Белоусов М.В., Юсубов М.С., Белянин М.Л. Моносахаридный состав полисахаридного комплекса листьев мать-и-мачехи // *Бюллетень сибирской медицины*. 2011. №5. С. 62–65.
23. Хасанова С.Р., Кривошеков С.В., Кудашкина Н.В., Гурьев А.М., Ровкина К.И., Белоусов М.В. Компонентный состав полисахаридного комплекса листьев *Crataegus sanguinea* (Rosaceae) из флоры Республики Башкортостан // *Растительные ресурсы*. 2015. Т. 51, №3. С. 397–406.
24. Булгаков Т.В., Кудашкина Н.В., Хасанова С.Р., Белоусов М.В., Кривошеков С.В. Исследование полисахаридов травы болиголова пятнистого *Conium maculatum* L. // *Традиционная медицина*. 2015. Т. 4, №43. С. 56–59.
25. Zhu D., Alcazar-Magana A., Qian Y.P., Tao Y., Qian M.C. Isolation, Characterization, and Compositional Analysis of Polysaccharides from Pinot Noir Wines: An Exploratory Study // *Molecules*. 2022. Vol. 27, no. 23. Pp. 8330. DOI: 10.3390/molecules27238330.
26. Hammi K.M., Hammami M., Rihouey C., Le Cerf D., Ksouri R., Majdoub H. GC-EI-MS identification data of neutral sugars of polysaccharides extracted from *Zizyphus lotus* fruit // *Data in Brief*. 2018. Vol. 18. Pp. 680–683. DOI: 10.1016/j.dib.2018.01.085.
27. Mosmann T.R., Coffman R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties // *Annu. Rev. Immunol*. 1989. Vol. 7. Pp. 145–173.
28. Khatua S., Acharya K. Influence of extraction parameters on physico-chemical characters and antioxidant activity of water soluble polysaccharides from *Macrocybe gigantea* (Masse) Pegler & Lodge // *Journal of food science and technology*. 2016. Vol. 53, no. 4. Pp. 1878–1888. DOI: 10.1007/s13197-015-2145-0.
29. Zhang J., Chen M., Wen C., Zhou J., Gu J., Duan Y., Zhang H., Ren X., Ma H. Structural characterization and immunostimulatory activity of a novel polysaccharide isolated with subcritical water from *Sagittaria sagittifolia* L. // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. Vol. 133. Pp. 11–20. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.077.

30. Wu M., Feng H., Song J., Chen L., Xu Z., Xia W., Zhang W. Structural elucidation and immunomodulatory activity of a neutral polysaccharide from the Kushui Rose (*Rosa setata* x *Rosa rugosa*) waste // *Carbohydr. Polym.* 2020. Vol. 232. Art. 115804. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115804.
31. Song Y., Zhu M., Hao H., Deng J., Li M., Sun Y., Yang R., Wang H., Huang R. Structure characterization of a novel polysaccharide from Chinese wild fruits (*Passiflora foetida*) and its immune-enhancing activity // *International journal of biological macromolecules.* 2019. Vol. 136. Pp. 324–331. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.090
32. Song Y., Wen P., Hao H., Zhu M., Sun Y., Zou Y., Requena T., Huang R., Wang H. Structural features of three heterogalacturonans from *passiflora foetida* fruits and their in vitro immunomodulatory effects // *Polymers.* 2020. Vol. 12, no. 3. Art. 615. DOI: 10.3390/polym12030615.
33. Li C., Dong Z., Zhang B., Huang Q., Liu G., Fu X. Structural characterization and immune enhancement activity of a novel polysaccharide from *Moringa oleifera* leaves // *Carbohydr. Polym.* 2020. Vol. 234. Art. 115897. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.115897.
34. Lan X., Wang Y., Deng S., Zhao J., Wang L., Yao K., Jia D. Physicochemical and rheological properties of *Tremella fuciformis* polysaccharide fractions by ethanol precipitation // *J. Food.* 2021. Vol. 19, no. 1. Pp. 645–655. DOI: 10.1080/19476337.2021.1950212.
35. Schepetkin I.A., Quinn M.T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential // *International Immunopharmacology.* 2006. Vol. 6, no. 3. Pp. 317–333. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.10.005.

Поступила в редакцию 14 августа 2023 г.

После переработки 1 ноября 2023 г.

Принята к публикации 2 ноября 2023 г.

Для цитирования: Гулина Е.И., Зыкова А.В., Лигачева А.А., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Селиванова Н.С., Шерстобоев Е.Ю., Горобец Е.А., Кривошеков С.В., Белоусов М.В. Химическая характеристика полисахаридного комплекса *Saussurea Salicifolia* L. и его NO-стимулирующие свойства // *Химия растительного сырья.* 2023. №4. С. 99–109. DOI: 10.14258/jcrpm.20230413545.

Gulina Y.I.^{1*}, Zykova A.V.¹, Ligachova A.A.², Danilets M.G.², Trofimova Y.S.^{1,2}, Selivanova N.S.², Sherstoboev E.Y.², Gorobec Y.A.¹, Krivoshchekov S.V.¹, Belousov M.V.¹ CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE SAUSSUREA SALICIFOLIA L. POLYSACCHARIDE COMPLEX AND ITS NO-STIMULATING PROPERTIES

¹ Siberian State Medical University, Moskovskiy trakt, 2, Tomsk, 634050 (Russia), e-mail: e.gulina1@gmail.com

² Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D. Goldberg, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Lenina ave., 3, Tomsk, 634028 (Russia)

A polysaccharide complex (PSC) from the aboveground part of *Saussurea salicifolia* L. (SS) was isolated and studied. SS PSC contains 54.99±0.53% hexose, 12.99±0.26% uronic acids, 5.24±0.04% protein, neutral monosaccharides are represented by glucose, galactose, xylose and rhamnose (molar ratios: 1,67 : 1,00 : 1,20 : 1,42). Five main components were isolated using ion exchange chromatography. The structure of the obtained polysaccharides (PS) 1-5 was characterized using physicochemical methods, such as IR spectroscopy, high-efficiency exclusive and gas-liquid chromatography, reactions with congo red. All PS are characterized by a different content of hexoses (from 32.46±2.63 to 83.64± 5.93%), uronic acids (from 2.56± 0.17 to 20.07± 3.70%) and a slight admixture of protein (from 0.75±0.13 to 2.28± 0.17%). The polysaccharides obtained are highly homogeneous samples, different in monomeric composition. The major component of SS-1 PS is represented by galactose, SS-2, 3, 4 PS – rhamnose, and SS-5 PS – glucose and xylose. The triple helix structure is installed for SS PSC and PS SS-5. All isolated PS stimulated NO synthase of peritoneal macrophages at control level 2 (LPS), and samples 3, 4 and 5 showed endotoxin-independent activity.

Keywords: *Saussurea salicifolia* L., polysaccharides, ion exchange chromatography, monomeric composition, molecular weight distribution, congo red, IR, NO, endotoxin.

* Corresponding author.

References

1. Sindhu R.K., Goyal A., Das J., Neha, Choden S., Kumar P. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.*, 2021, vol. 2. Art. 100044. DOI: 10.1016/J.CARPTA.2021.100044.
2. Yu Y., Shen M., Song Q., Xie J. *Carbohydr. Polym.*, 2018, vol. 183, no. 235, pp. 91–101. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.009.
3. Wainwright C.L., Teixeira M.M., Adelson D.L., Buenz E.J., David B., Glaser K.B., Harata-Lee Y., Howes M.R., Izzo A.A., Maffia P., Mayer A.M., Mazars C., Newman D.J., Nic Lughadha E., Pimenta A.M., Parra J.A., Qu Z., Shen H., Spedding M., Wolfender J.L. *Pharmacological research*, 2022, vol. 177. Art. 106076. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106076.
4. Singh D., Rajput A., Bhatia A., Kumar A., Kaur H., Sharma P., Kaur P., Singh S., Attri S., Buttar H.S., Singh B., Arora S. *Functional Foods in Health and Disease*, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 179–200. DOI: 10.31989/ffhd.v11i5.773.
5. Yin M., Zhang Y., Li H. *Frontiers in immunology*, 2019, vol. 10. Art. 145. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00145.
6. Barbosa J.R., de Carvalho Junior R.N. *Trends in food science & technology*, 2021, vol. 108, pp. 223–235. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.12.026.
7. Li M., Wen J., Huang X., Nie Q., Wu X., Ma W., Nie S., Xie M. *Food Chem.*, 2022, vol. 374, pp. 131586. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131586.
8. Wei W., Xiao H.T., Bao W.R., Ma D.L., Leung C.H., Han X.Q., Ko C.H., Lau C.B., Wong C.K., Fung K.P., Leung P.C., Bian Z.X., Han Q.B. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, vol. 179, pp. 243–252. DOI: 10.1016/j.jep.2015.12.060.
9. Ibiza S., Serrador J.M. *Inmunología*, 2008, vol. 27, pp. 103–117. DOI: 10.1016/S0213-9626(08)70058-1.
10. Guzik T.J., Korbut R., Adamek-Guzik T. *Journal of physiology and pharmacology*, 2003, vol. 54, pp. 469–487. DOI: 10.1385/1-59259-374-7:291.
11. Reshetov YA.Ye., Belousov M.V., Avdeyeva Ye.YU., Shurupova M.N. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 4, pp. 205–214. DOI: 10.14258/jcprm.2018043710. (in Russ.).
12. Reshetov YA.Ye., Ligachova A.A., Avdeyeva Ye.YU., Danilets M.G., Golovchenko V.V., Trofimova Ye.S., Gulina Ye.I., Sherstoboyev Ye.YU., Gur'yev A.M., Rovkina K.I., Krivoshechekov S.V., Belousov M.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2019, no. 4, pp. 77–85. DOI: 10.14258/jcprm.2019045483. (in Russ.).
13. Ligacheva A.A., Reshetov YA.Ye., Avdeyeva Ye.YU., Danilets M.G., Trofimova Ye.S., Sherstoboyev Ye.YU., Belousov M.V. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*, 2019, vol. 22, no. 7, pp. 32–37. DOI: 10.29296/25877313-2019-07-05. (in Russ.).
14. Sun Y., Hou S., Song S., Zhang B., Ai C., Chen X., Liu N. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, vol. 112, pp. 985–995. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.066.
15. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F.A. *Analytical Chemistry*, 1956, vol. 28, no. 3, pp. 350–356. DOI: 10.1021/ac60111a017.
16. Tomasić J., Keglević D. *Anal. Biochem.*, 1972, vol. 45, no. 1, pp. 164–175. DOI:10.1016/0003-2697(72)90017-6.
17. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.
18. Gulina Ye.I., Andreyeva V.YU., Zykova A.V., Isakov D.A., Zykova Z.V. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*, 2023, vol. 26, no. 9, pp. 39–47. DOI:10.29296/25877313-2023-09-06. (in Russ.).
19. Rovkina K.I., Krivoshechekov S.V., Guryev A.M., Yusubov M.S., Belousov M.V. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2018, vol. 44, no. 7, pp. 854–859. DOI: 10.1134/S1068162018070105.
20. Gulina Ye.I., Krivoshechekov S.V., Isakov D.A., Belousov M.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2023, no. 2, pp. 97–105. DOI: 10.14258/jcprm.20230212366. (in Russ.).
21. Lar'kina M.S., Krivoshechekov S.V., Gur'yev A.M., Kadyrova T.V., Yermilova Ye.V., Kotserubskaya V.V., Yusubov M.S. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2016, no. 2, pp. 19–24. DOI:10.14258/jcprm.201602786. (in Russ.).
22. Korzh A.P., Gur'yev A.M., Belousov M.V., Yusubov M.S., Belyanin M.L. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*, 2011, no. 5, pp. 62–65. (in Russ.).
23. Khasanova S.R., Krivoshechekov S.V., Kudashkina N.V., Gur'yev A.M., Rovkina K.I., Belousov M.V. *Rastitel'nyye resursy*, 2015, vol. 51, no. 3, pp. 397–406. (in Russ.).
24. Bulgakov T.V., Kudashkina N.V., Khasanova S.R., Belousov M.V., Krivoshechekov S.V. *Traditsionnaya meditsina*, 2015, vol. 4, no. 43, pp. 56–59. (in Russ.).
25. Zhu D., Alcazar-Magana A., Qian Y.P., Tao Y., Qian M.C. *Molecules*, 2022, vol. 27, no. 23, pp. 8330. DOI: 10.3390/molecules27238330.
26. Hammi K.M., Hammami M., Rihouey C., Le Cerf D., Ksouri R., Majdoub H. *Data in Brief*, 2018, vol. 18, pp. 680–683. DOI: 10.1016/j.dib.2018.01.085.
27. Mosmann T.R., Coffman R.L. *Annu. Rev. Immunol.*, 1989, vol. 7, pp. 145–173.
28. Khatua S., Acharya K. *Journal of food science and technology*, 2016, vol. 53, no. 4, pp. 1878–1888. DOI: 10.1007/s13197-015-2145-0.
29. Zhang J., Chen M., Wen C., Zhou J., Gu J., Duan Y., Zhang H., Ren X., Ma H. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, vol. 133, pp. 11–20. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.077.
30. Wu M., Feng H., Song J., Chen L., Xu Z., Xia W., Zhang W. *Carbohydr. Polym.*, 2020, vol. 232. Art. 115804. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115804.
31. Song Y., Zhu M., Hao H., Deng J., Li M., Sun Y., Yang R., Wang H., Huang R. *International journal of biological macromolecules*, 2019, vol. 136, pp. 324–331. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.090
32. Song Y., Wen P., Hao H., Zhu M., Sun Y., Zou Y., Requena T., Huang R., Wang H. *Polymers*, 2020, vol. 12, no. 3. Art. 615. DOI: 10.3390/polym12030615.

33. Li C., Dong Z., Zhang B., Huang Q., Liu G., Fu X. *Carbohydr. Polym.*, 2020, vol. 234. Art. 115897. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.115897.
34. Lan X., Wang Y., Deng S., Zhao J., Wang L., Yao K., Jia D. *J. Food.*, 2021, vol. 19, no. 1, pp. 645–655. DOI: 10.1080/19476337.2021.1950212.
35. Schepetkin I.A., Quinn M.T. *International Immunopharmacology*, 2006, vol. 6, no. 3, pp. 317–333. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.10.005.

Received August 14, 2023

Revised November 1, 2023

Accepted November 2, 2023

For citing: Gulina Y.I., Zykova A.V., Ligachova A.A., Danilets M.G., Trofimova Y.S., Selivanova N.S., Sherstoboev E.Y., Gorobec Y.A., Krivoshchekov S.V., Belousov M.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2023, no. 4, pp. 99–109. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20230413545.

