

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-59-64>
УДК 615.322



Оригинальная статья / Research article

Влияние способа экстракции водорастворимых полисахаридов растений рода *Saussurea* на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов мышей

А. А. Лигачёва¹✉, Е. И. Гулина², Ю. В. Шабанова^{2,3}, Е. С. Трофимова¹,
С. В. Кривошеков², Н. В. Гуркин², М. Н. Шурупова⁴, Е. Ю. Шерстобоев¹, М. Г. Данилец¹,
М. В. Белоусов^{2,3}

¹ НИИФирм им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ, 634028, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 3

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

³ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 30

⁴ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 36

✉ Контактное лицо: Лигачёва Анастасия Александровна. E-mail: vittelli@mail.ru

ORCID: А. А. Лигачёва – <https://orcid.org/0000-0002-3337-1516>; Е. И. Гулина – <https://orcid.org/0000-0002-3234-6845>; Ю. В. Шабанова – <https://orcid.org/0000-0002-7248-3262>;

Е. С. Трофимова – <https://orcid.org/0000-0002-5367-715X>; С. В. Кривошеков – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>; Н. В. Гуркин – <https://orcid.org/0000-0002-1481-0421>;

М. Н. Шурупова – <https://orcid.org/0000-0002-8955-7280>; Е. Ю. Шерстобоев – <https://orcid.org/0000-0002-6178-5329>; М. Г. Данилец – <https://orcid.org/0000-0001-7862-4778>;

М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Статья поступила: 18.03.2022

Статья принята в печать: 20.04.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Со времен открытия молекулы оксида азота многочисленными исследованиями доказано, что он является одним из самых универсальных, многофункциональных медиаторов биологических реакций организма и участвует в формировании врожденного и специфического иммунитета, воспалительного процесса, защите от инфекционных патогенов. Знание эффектов NO важно не только для понимания формирования иммунного ответа, но и для разработки новых инструментов исследования и лечения различных заболеваний. Известно, что полисахариды высших растений широко применяются для активации про- и противовоспалительных реакций. Ранее проведенные исследования показали перспективность более детального изучения иммуномодулирующих свойств растительных полисахаридов рода *Saussurea* DC, возможных механизмов их иммуностимулирующего и противовоспалительного действия в зависимости от происхождения и экстракции.

Цель. Изучить влияние водорастворимых полисахаридов (ВРПС), выделенных из надземной части соссюреи иволистной (*S. salicifolia* (L.) DC.), соссюреи спорной (*S. controversa* DC.), соссюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.) при различных условиях экстракции, на активность фермента NO-синтазы и пролиферацию перитонеальных макрофагов.

Материалы и методы. Использовались химические методы выделения водорастворимых полисахаридов, культуральные и биохимические методы оценки биологической активности.

Результаты и обсуждение. Водорастворимые полисахариды (ВРПС), выделенные различным способом из надземной части соссюреи иволистной (*S. salicifolia* (L.) DC.), соссюреи спорной (*S. controversa* DC.), соссюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.), обладают способностью усиливать продукцию нитритов антигенпрезентирующими клетками на уровне стандартного активатора макрофагов липополисахарида. NO-стимулирующие свойства ВРПС, полученных из *S. controversa* и *S. frolovii* экстрагентом в кислой среде, свободны от примеси эндотоксина. В результате экстракции образцов ВРПС с использованием нейтрального и щелочного экстрагента из всех изученных растений, а также кислого экстрагента из соссюреи спорной, примесь эндотоксина в образцах обнаруживалась. Все исследуемые образцы, в независимости от условий экстракции не обладали цитотоксическими свойствами.

Заключение. Экспериментально показано, что способ экстракции водорастворимых полисахаридов не влияет на цитотоксические свойства, но влияет на наличие/отсутствие примеси эндотоксина в образцах. Установлено, что образцы ВРПС, выделенные из растений рода Соссюреи при помощи кислого экстрагента, не обладают цитотоксическими свойствами и не содержат примеси эндотоксина, а также способствуют значительному усилению продукции оксида азота макрофагами и могут быть использованы для детального изучения иммуномодулирующих свойств и дальнейшей разработки на их основе новых приемов лечения различных заболеваний, требующих коррекции и регуляции функциональной активности иммунных клеток, включая макрофаги.

Ключевые слова: растения рода *Saussurea*, водорастворимые полисахариды, оксид азота, перитонеальные макрофаги, полимиксин Б

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. М. В. Белоусов и Е. Ю. Шерстобоев обосновали актуальность работы. С. В. Кривошеков, Н. В. Гуркин и М. Н. Шурупова занимались заготовкой и подготовкой сырья. Е. И. Гулина, Ю. В. Шабанова, Н. В. Гуркин и С. В. Кривошеков получали образцы и провели их стандартизацию. А. А. Лигачёва, Е. С. Трофимова, М. Г. Данилец, Ю. В. Шабанова разработали эксперимент, проводили оценку биологической активности изучаемых веществ, культуральные исследования. М. Г. Данилец, А. А. Лигачева, Е. И. Гулина участвовали в обработке данных. Е. С. Трофимова, М. Г. Данилец, Ю. В. Шабанова проводили теоретические расчеты. М. Г. Данилец, Е. С. Трофимова, А. А. Лигачёва, М. В. Белоусов участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-315-90016.

© Лигачёва А. А., Гулина Е. И., Шабанова Ю. В., Трофимова Е. С., Кривошеков С. В., Гуркин Н. В., Шурупова М. Н., Шерстобоев Е. Ю., Данилец М. Г., Белоусов М. В., 2022

© Ligacheva A. A., Gulina E. I., Shabanova I. V., Trofimova E. S., Krivoshechikov S. V., Gurkin N. V., Shurupova M. N., Sherstoboev E. Yu., Danilets M. G., Belousov M. V., 2022

Соответствие принципам этики. Эксперименты с использованием лабораторных животных выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации и были одобрены биоэтическим комитетом НИИФирм им. Е. Д. Гольдберга, протокол № 171052020 от 18.05.2020 г.

Для цитирования: Лигачёва А. А., Гулина Е. И., Шабанова Ю. В., Трофимова Е. С., Кривошеков С. В., Гуркин Н. В., Шурупова М. Н., Шерстобоев Е. Ю., Данилец М. Г., Белоусов М. В. Влияние способа экстракции водорастворимых полисахаридов растений рода *Saussurea* на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов мышей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):59–64. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-59-64>

Effect of Water-soluble Polysaccharides Plant Extraction of the *Saussurea* Genus on the Activity of Mice Peritoneal Macrophage NO-synthase

Anastasia A. Ligacheva¹✉, Ekaterina I. Gulina², Iuliia V. Shabanova^{2,3}, Evgenia S. Trofimova¹, Sergey. V. Krivoshchekov², Nikita. V. Gurkin², Margarita N. Shurupova⁴, Evgenii Yu. Sherstoboev¹, Marina G. Danilets¹, Mikhail V. Belousov^{2,3}

¹ Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk NRCM, 3, Lenin Av., Tomsk, 634028, Russia

² Siberian State Medical University, 2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050, Russia

³ National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russia

⁴ National Research Tomsk State University, 36, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russia

✉ **Corresponding author:** Anastasia A. Ligacheva. E-mail: vittelli@mail.ru

ORCID: Anastasia A. Ligacheva – <https://orcid.org/0000-0002-3337-1516>; Ekaterina I. Gulina – <https://orcid.org/0000-0002-3234-6845>;

Iuliia V. Shabanova – <https://orcid.org/0000-0002-7248-3262>; Evgenia S. Trofimova – <https://orcid.org/0000-0002-5367-715X>;

Sergey. V. Krivoshchekov – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>; Nikita. V. Gurkin – <https://orcid.org/0000-0002-1481-0421>;

Margarita N. Shurupova – <https://orcid.org/0000-0002-8955-7280>; Evgenii Yu. Sherstoboev – <https://orcid.org/0000-0002-6178-5329>;

Marina G. Danilets – <https://orcid.org/0000-0001-7862-4778>; Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Received: 18.03.2022

Revised: 20.04.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. The nitric oxide molecule is one of the most versatile, multifunctional mediators of biological reactions in the body. NO participates in the formation of innate and specific immunity, the inflammatory process and protection against infectious pathogens. It is known that polysaccharides of higher plants are widely used to activate pro- and anti-inflammatory reactions. Previous studies have shown the promise of a more detailed research in the immunomodulatory properties of plant polysaccharides of the genus *Saussurea* DC, the mechanisms of their immunostimulating and anti-inflammatory action depending on the origin and conditions of extraction.

Aim. The aim of present research was to evaluate the dependence of the affection of the extraction parameters of water-soluble polysaccharides (WSPS) from the aerial parts of *S. salicifolia* (L.) DC., *S. controversa* DC., *S. frolovii* Lebeb. on NO synthase activity and peritoneal macrophages proliferation.

Materials and methods. Chemical methods for the isolation of water-soluble polysaccharides, cultural and biochemical methods for assessing biological activity were used.

Results and discussion. Water-soluble polysaccharides (WSPS) from plants *S. salicifolia* (L.) DC., *S. controversa* DC., *S. frolovii* Ledeb. obtained with different extraction parameters have the ability to enhance production of nitrites antigen-presenting cells in the same way as standard macrophage activator liposaccharide. Polysaccharides from *S. controversa* and *S. frolovii* at acidic extractant are free of endotoxin impurities. All water-soluble polysaccharide samples obtained using neutral and alkaline extractants contain endotoxin impurities. Samples from the *S. controversa* contained this impurity after extraction in an acidic extractant. Polysaccharide samples are not cytotoxic.

Conclusion. It was stated that water-soluble polysaccharides from plants of the *Saussurea* genus using an acidic extractant do not possess cytotoxic properties, do not contain endotoxin impurities and significantly enhance the production of nitric oxide by macrophages. These samples used in a detailed study of the immunomodulatory properties and further development on their basis of new treatment methods various diseases that require correction and regulation of the functional activity of immune cells, including macrophages.

Keywords: plants of the Genus *Saussurea*, water-soluble polysaccharides, nitric oxide, peritoneal macrophages, polymyxin B

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Mikhail V. Belousov and Evgenii Yu. Sherstoboev substantiated the relevance of this work. Sergey. V. Krivoshchekov, Nikita. V. Gurkin and Margarita N. Shurupova engaged in the procurement and preparation of raw materials. Ekaterina I. Gulina, Iuliia V. Shabanova, Nikita. V. Gurkin and Sergey V. Krivoshchekov synthesized samples and carried out their standardization. Anastasia A. Ligacheva, Evgenia S. Trofimova, Marina G. Danilets, developed an experiment, assessed the biological activity of the studied substances, cultural studies. Anastasia A. Ligacheva, Marina G. Danilets, Ekaterina I. Gulina, participated in data processing. Evgenia S. Trofimova, Marina G. Danilets and Iuliia V. Shabanova performed theoretical calculations. Authors Marina G. Danilets, Evgenia S. Trofimova, Anastasia A. Ligacheva, Mikhail V. Belousov participated in writing the text of the article. All authors discussed results.

Funding. The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research within the framework of scientific project No. 20-315-90016.

Compliance with the principles of ethics. Experiments with the use of laboratory animals were carried out in compliance with the principles of humanity set forth in the directives of the European Community (86/609/EEC) and the Declaration of Helsinki and were approved by the bioethical committee of the NIIFIRM them. E. D. Goldberg, Protocol No. 171052020 dated May 18, 2020.

For citation: Ligacheva A. A., Gulina E. I., Shabanova I. V., Trofimova E. S., Krivoshchekov S. V., Gurkin N. V., Shurupova M. N., Sherstoboev E. Yu., Danilets M. G., Belousov M. V. Effect of water-soluble polysaccharides plant extraction of the *Saussurea* genus on the activity of mice peritoneal macrophage NO-synthase. *Drug development & registration*. 2022;11(2):59–64. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-59-64>

ВВЕДЕНИЕ

Индукцибельная синтаза оксида азота типа 2 (iNOS или NO-синтаза) первоначально описана как фермент, который экспрессируется в активированных макрофагах, генерирует оксид азота (NO) из аминокислоты L-аргинина и тем самым способствует контролю репликации или уничтожению внутриклеточных микробных патогенов [1, 2]. Молекула оксида азота как биологически активное соединение была открыта тридцать лет назад, и с тех пор многочисленными исследованиями доказано, что она является одним из самых универсальных компонентов иммунной системы. Как многофункциональный медиатор, NO участвует в защите организма от инфекционных патогенов, в формировании врожденного и специфического иммунитета, при воспалении [6, 7]. Знание эффектов NO важно не только для понимания формирования иммунного ответа, но и для разработки новых инструментов исследования и приемов лечения различных заболеваний. NO регулирует функциональную активность иммунных клеток, включая антигенпрезентирующие и дендритные клетки, Т-лимфоциты, нейтрофилы и др. [5, 11]. В ответ на стимулирование интерфероном- γ (IFN- γ) и/или лигандами Toll-like-рецепторов (TLR) происходит классическая активация макрофагов (M1), для которых характерен синтез провоспалительных цитокинов, экспрессия iNO-синтазы, продукция реактивных промежуточных соединений азота и кислорода, стимулирование ответа Th1, микробицидная и противоопухолевая активность [6, 10]. TLR млекопитающих служат ключевыми сенсорами распознавания как эндо-, так и экзогенных лигандов, включая патогены, бактерии, вирусы, грибы и паразиты. Известно, растительные полисахариды являются лигандами, которые при взаимодействии с TLR 2-4 способствуют появлению у макрофагов воспалительных свойств M1 и, прежде всего, повышению синтеза оксида азота активированными клетками [3, 8].

В ранее проведенных исследованиях была показана перспективность более детального изучения полисахаридов растений рода *Saussurea* DC. (соссюрея или горькуша) из семейства *Asteraceae* (сложноцветные). Установлено, что наибольшее количество ВРПС содержится в траве соссюреи иволистой (*S. salicifolia* (L.) DC.), соссюреи спорной (*S. controversa* DC.), соссюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.) [12]. Таким образом, представляется актуальным изучение иммуномодулирующих свойств образцов ПС растений этих видов, а именно NO-стимулирующей активности, не зависящей от примеси эндотоксина, и влияние исследуемых образцов на пролиферацию макрофагов.

Целью исследования было изучение влияния способа экстракции ВРПС, выделенных из надземной части соссюреи иволистой (*S. salicifolia* (L.) DC.), соссюреи спорной (*S. controversa* DC.), соссюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.), на активность NO-синтазы и пролиферацию перитонеальных макрофагов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение веществ

Водорастворимые полисахариды выделяли из надземной части соссюреи иволистой (ВРПС SS), соссюреи спорной (ВРПС SC), соссюреи Фролова (ВРПС SF) при использовании экстрагента (вода очищенная, соотношение сырье:экстрагент = 1:50) с различным pH 2, 6 и 10 (3 часа, температура 60 °C). Экстракт фильтровали через бумажный фильтр под вакуумом, упаривали на ротационном испарителе. Полисахариды осаждали 96 % этиловым спиртом (1:4), отстаивали в течение 12 часов при 4 °C, центрифугировали при 2600 об/мин 10 минут. После растворения осадок в воде очищенной с помощью магнитной мешалки, раствор диализовали в течение 48 часов против воды при комнатной температуре. Далее раствор замораживали и подвергали лиофилизации на сушилке SP Scientific Advantage EL-85.

Получение клеток

Макрофаги (МФ) получали из перитонеальной полости мышей линии C57BL/6 (возраст 8–10 недель), выращенных в отделе экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ, используя набор для селекции клеток EasySep™ Biotin Positive Selection Kit (Stem Cell, США) и антитела специфические к макрофагальным рецепторам Anti-Mouse F4/80 Antibody (Stem Cell, США).

Изучение баланса аргинина и цитотоксичности

В активированных макрофагах резко повышается метаболизм L-аргинина, который протекает преимущественно по одному из путей – с помощью NO-синтазы или с помощью аргиназы. Активность NO-синтазы зрелых перитонеальных МФ оценивали по концентрации нитритов в супернатанте клеток после 48-часового культивирования в присутствии ВРПС или ЛПС (серотип O111:B4, Sigma, США) добавляя к нему реактив Грисса (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1:1 и измеряя оптическую плотность раствора на многоканальном спектрофотометре Titertek Multiskan® MCC (LabSystems, Финляндия), длина волны 540 нм. Содержание примеси эндотоксина оценивали при добавлении антибиотика полимиксина Б (50 мкг/мл, Sigma, США) к исследуемым веществам с последующей инкубацией клеток, как описано выше. Цитотоксические свойства изучаемых веществ определяли в классическом тесте МТТ в лизате МФ, добавляя за 4 часа до окончания инкубации 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, США) в конечной концентрации 200 мкг/мл, затем осадок растворяли диметилсульфоксидом (Sigma, США) и измеряли оптическую плотность (ед. опт. плотности), как описано выше.

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 $\bar{X} \pm m$, где $\bar{X}$ – среднее значение; m – стандартная ошибка среднего. Уровень статистической значимости различий $p < 0,05$, объем выборки $n = 9$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение влияния различных концентрация ВРПС (2, 20, 60 мкг/мл), выделенных из надземной части сосюреи иволостной, сосюреи спорной и сосюреи Фролова, на пролиферацию перитонеальных макрофагов показало, что кислотность экстрагента, в целом, не влияла на цитотоксические свойства исследуемых образцов (таблица 1).

Выявлено небольшое, в 1,2 раза, ингибирование деления МФ при культивировании с ВРПС SF в максимальной из используемых концентраций. Исходя из полученных результатов, в дальнейшей работе использовали рабочую концентрацию образцов ВРПС – 20 мкг/мл.

Следует отметить, что растительные ВРПС могут содержать бактериальный эндотоксин (липополисахарид, ЛПС), который способен, с одной стороны, оказывать НО-продуцирующее действие, с другой, проявлять нежелательные пирогенные свойства. Для

определения его наличия в образцах ПС широко применяют антибиотик полимиксин Б [10].

Показано, что полисахариды всех исследуемых растений, независимо от используемого экстрагента, усиливали продукцию оксида азота макрофагами (таблица 2) в 19,2–20,1 (ВРПС SS), в 16,4–19,0 (ВРПС SC) и в 14,8–16,8 (ВРПС SF) раз относительно интактного контроля. Стимулирующие свойства ВРПС были сравнимы с влиянием стандартного активатора макрофагов – ЛПС. При этом действие двух образцов ВРПС SC и ВРПС SF, выделенных в кислой среде pH 2, превосходило действие митогена в 1,2 раза.

Концентрация оксида азота в ЛПС-стимулированных супернатантах макрофагов после обработки полимиксином Б снижалась в 9,5–14,3 раз, практически до уровня интактного контроля. При добавлении полимиксина Б к ВРПС SS и ВРПС SF, выделенным в кислой среде (pH 2), концентрация нитритов в культуре МФ не изменялась по сравнению с инкубацией без антибиотика, что свидетельствует об отсутствии в данных образцах примеси эндотоксина. Продукция нитритов при культивировании МФ с ВРПС SS и ВРПС SF, экстрагированными в нейтральной (pH 6) и щелочной (pH 10) среде и обработанными полимиксином Б, достоверно снижалась в 1,3–2,3 раза. Инкубация с блокатором эндотоксина ВРПС SC, экстрагированных всеми тремя способами, приводила к уменьшению ими степени стимуляции продукции оксида азота макрофагами: в 1,4 (pH 2), 2,7 (pH 6) и 2,2 (pH 10) раз. Однако несмотря на значимое снижение, концентрация нитритов в этих условиях не опускалась до значений контроля 1 и была выше его в 14,5–

Таблица 1. Влияние водорастворимых полисахаридов, выделенных в различных условиях из надземной части сосюреи иволостной (*S. salicifolia* (L.) DC.), сосюреи спорной (*S. controversa* DC.) и сосюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.), на пролиферацию перитонеальных макрофагов (ед. опт. плотности, $\times 10^{-3}$) интактных мышей линии C57BL/6 ($\bar{X} \pm m$)

Table 1. Influence of water-soluble polysaccharides isolated under various conditions from the aerial part of *Saussurea salicifolia* (L.) DC., *Saussurea controversa* DC. and *Saussurea frolovii* Ledeb. on the proliferation of peritoneal macrophages (units of optical density, $\times 10^{-3}$) intact mice of strain C57BL/6 ($\bar{X} \pm m$)

Вещество Test sample	Контроль 1 (МФ + Среда) Control 1 (macrophages + cell media)	Контроль 2 (МФ + ЛПС) Control 2 (macrophages + LPS)/4	МФ + ВРПС Macrophages + WSPS								
			pH 2			pH 6			pH 10		
			2 мкг/мл 2 µg/ml	20 мкг/мл 20 µg/ml	60 мкг/мл 60 µg/ml	2 мкг/мл 2 µg/ml	20 мкг/мл 20 µg/ml	60 мкг/мл 60 µg/ml	2 мкг/мл 2 µg/ml	20 мкг/мл 20 µg/ml	60 мкг/мл 60 µg/ml
ВРПС SS WSPS SS	394 ± 9	369 ± 7	370 ± 6	360 ± 6	364 ± 1	380 ± 6	381 ± 3	373 ± 7	400 ± 4●	385 ± 1	386 ± 9
ВРПС SC WSPS SC	379 ± 6	332 ± 6	343 ± 6	345 ± 7	358 ± 5	380 ± 6	381 ± 3	373 ± 7	400 ± 4●	385 ± 1	386 ± 9
ВРПС SF WSPS SF	429 ± 5	375 ± 9	411 ± 8	380 ± 3	397 ± 9	470 ± 1●	455 ± 3●	479 ± 7●	401 ± 2	396 ± 6	357 ± 3*

Примечание. * Различия показателя с контролем 1; ● – различия показателя по различия показателя с контролем 2; уровень статистической значимости различий $p < 0,05$, $n = 9$. Концентрация ЛПС – 0,1 мкг/мл.

Note. * Differences with control 1; ● – differences with control 2; level of statistical significance of differences $p < 0.05$. The concentration LPS – 0.1 µg/ml. $n = 9$.

Таблица 2. Влияние водорастворимых полисахаридов, выделенных в различных условиях из надземной части сосюреи иволостной (*S. salicifolia* (L.) DC.), сосюреи спорной (*S. controversa* DC.) и сосюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.), на продукцию оксида азота (мкМ) перитонеальными макрофагами интактных мышей линии C57BL/6 в отсутствие и присутствии полимиксина Б ($X \pm m$)

Table 2. Influence of water-soluble polysaccharides isolated under various conditions from the aerial part of *Saussurea salicifolia* (L.) DC., *Saussurea controversa* DC. and *Saussurea frolovii* Ledeb. on production nitric oxide (μM) by peritoneal macrophages of intact C57BL/6 mice in the absence and presence of polymyxin B ($X \pm m$)

Исследуемое вещество Test sample	Контроль 1 (МФ + среда) Control 1 (macrophages + cell media)		Контроль 2 (МФ + ЛПС) Control 2 (macrophages + LPS)		МФ + ВРПС Macrophages + WSPS	
	полимиксин Б polymyxin B		полимиксин Б polymyxin B		полимиксин Б polymyxin B	
	–	+	–	+	–	+
ВРПС SS pH 2 WSPS SS pH 2	2,98 $\pm$ 0,18	2,91 $\pm$ 0,03	54,29 $\pm$ 0,51*	3,79 $\pm$ 0,15▲■	59,79 $\pm$ 0,7*	62,56 $\pm$ 1,18■◆
ВРПС SS pH 6 WSPS SS pH 6					58,29 $\pm$ 1,56*	45,37 $\pm$ 0,95■▲◆
ВРПС SS pH 10 WSPS SS pH 10					57,15 $\pm$ 0,9*	42,29 $\pm$ 1,64■▲◆
ВРПС SC pH 2 WSPS SC pH 2	3,07 $\pm$ 0,30	2,70 $\pm$ 0,08	49,42 $\pm$ 0,51*	4,27 $\pm$ 0,16▲■	58,44 $\pm$ 1,13*●	42,05 $\pm$ 1,31■▲◆
ВРПС SC pH 6 WSPS SC pH 6					50,35 $\pm$ 0,96*	18,75 $\pm$ 0,76■▲◆
ВРПС SC pH 10 WSPS SC pH 10					56,76 $\pm$ 1,65*	26,37 $\pm$ 1,58■▲◆
ВРПС SF pH 2 WSPS SF pH 2	3,87 $\pm$ 0,15	3,8 $\pm$ 0,08	54,64 $\pm$ 0,85*	5,75 $\pm$ 0,13▲■	65,03 $\pm$ 1,81*●	58,73 $\pm$ 2,09■◆
ВРПС SF pH 6 WSPS SF pH 6					57,23 $\pm$ 1,38*	25,06 $\pm$ 1,33■▲◆
ВРПС SF pH 10 WSPS SF pH 10					58,68 $\pm$ 1,26*	44,49 $\pm$ 1,51■▲◆

Примечание. * Различия показателя с контролем 1 без полимиксина; ▲ – различия показателя с инкубацией каждого вещества без полимиксина; ■ – различия показателя с контролем 2 без полимиксина; ● – различия показателя с контролем 1 с полимиксином; ◆ – различия показателя с контролем 2 с полимиксином; уровень статистической значимости различий $p < 0,05$. Концентрация ПС – 20 мкг/мл, полимиксин Б – 50 мкМ, ЛПС – 0,1 мкг/мл. $n = 9$.

Note. * Differences with control 1 without polymyxin; ▲ – differences with incubation of each substance without polymyxin; ■ – differences with control 2 without polymyxin; ● – differences with control 1 with polymyxin; ◆ – differences with control 2 with polymyxin; level of statistical significance of differences $p < 0.05$. The concentration of WSPS – 20 $\mu\text{g/ml}$, polymyxin B – 50 μM , LPS – 0.1 $\mu\text{g/ml}$. $n = 9$.

15,6 (ВРПС SS), в 6,9–11,6 (ВРПС SC) и в 6,5–15,3 (ВРПС SF) раз. Более того NO-активирующие свойства всех образцов ВРПС, обработанных полимиксином Б, были значительно выше митоген-стимулированного контроля, обработанного антибиотиком, в 11,2–16,5 (ВРПС SS), в 4,4–9,8 (ВРПС SC) и в 4,4–10,2 раз (ВРПС SF) в зависимости от кислотности экстрагента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Водорастворимые полисахариды, выделенные из надземной части сосюреи иволостной (*S. salicifolia* (L.) DC.), сосюреи спорной (*S. controversa* DC.), сосюреи Фролова (*S. frolovii* Ledeb.) значительно увеличивали продукцию оксида азота макрофагами и не обладали цитотоксическими свойствами. Два образца (ВРПС SS pH 2 и ВРПС SF pH 2) свободны от примеси эндотоксина. В остальных веществах (ВРПС SS pH 6 и pH 10; ВРПС SC pH 2, pH 6 и pH 10; ВРПС SF pH 2 и pH 10) примеси выявлены в небольшом количестве. Образцы ВРПС без загрязнения ЛПС могут быть использованы

для дальнейшего, более детального изучения иммуномодулирующих свойств и последующей разработки на их основе новых фармакологических субстанций, влияющих на функциональную активность иммунных клеток, включая макрофаги.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akinrinmade O. A., Chetty S., Daramola A. K., Islam M.-u., Thepen T., Barth S. CD64: An attractive immunotherapeutic target for M1-type macrophage mediated chronic inflammatory diseases. *Biomedicine*. 2017;5(3):56. DOI: 10.3390/biomedicine5030056.
2. Bogdan C., Rölinghoff M., Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological Reviews*. 2000;173:17–26. DOI: 10.1034/j.1600-065x.2000.917307.
3. Funes S. C., Rios M., Escobar-Vera J., Kalergis A. M. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*. 2018;154(2):186–195. DOI: 10.1111/imm.12910.
4. García-Ortiz A., Serrador J. M. Nitric Oxide Signaling in T Cell-Mediated Immunity. *Trends in Molecular Medicine*. 2018;24(4):412–427. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.02.002.
5. Kumar S., Singh R. K., Bhardwaj T. R. Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;85:182–201. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.11.125.

6. Lind M., Hayes A., Caprnda M., Petrovic D., Rodrigo L., Kruzliak P., Zulli A. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Bio-medicine & Pharmacotherapy*. 2017;93:370–375. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.036.
7. Moncada S., Higgs E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*. 2006;147(1):193–201. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706458 -2.
8. Moreira Lopes T. C., Mosser D. M., Gonçalves R. Macrophage polarization in intestinal inflammation and gut homeostasis. *Inflammation Research*. 2020;69:1163–1172. DOI: 10.1007/s00011-020-01398-y.
9. Schepetkin I. A., Quinn M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*. 2006;6:317–333. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.10.005.
10. Thiriot J. D., Martinez-Martinez Y. B., Endsley J. J., Torres A. G. Hacking the host: exploitation of macrophage polarization by intracellular bacterial pathogens. *Pathogens and Disease*. 2020;78(1). DOI: 10.1093/femspd/ftaa009.
11. Thwe P. M., Amiel E. The role of nitric oxide in metabolic regulation of Dendritic cell immune function. *Cancer Letters*. 2018;412:236–242. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.10.032.
12. Решетов Я. Е., Белоусов М. В., Авдеева Е. Ю., Шурупова М. Н. Сравнительное исследование элементного состава и биологически активных веществ растений рода *Saussurea* DC. флоры Восточной Сибири. *Химия растительного сырья*. 2018;4:205–214. DOI: 10.14258/jcprm.2018043710.
3. Funes S. C., Rios M., Escobar-Vera J., Kalergis A. M. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*. 2018;154(2):186–195. DOI: 10.1111/imm.12910.
4. García-Ortiz A., Serrador J. M. Nitric Oxide Signaling in T Cell-Mediated Immunity. *Trends in Molecular Medicine*. 2018;24(4):412–427. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.02.002.
5. Kumar S., Singh R. K., Bhardwaj T. R. Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;85:182–201. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.11.125.
6. Lind M., Hayes A., Caprnda M., Petrovic D., Rodrigo L., Kruzliak P., Zulli A. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Bio-medicine & Pharmacotherapy*. 2017;93:370–375. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.036.
7. Moncada S., Higgs E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*. 2006;147(1):193–201. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706458 -2.
8. Moreira Lopes T. C., Mosser D. M., Gonçalves R. Macrophage polarization in intestinal inflammation and gut homeostasis. *Inflammation Research*. 2020;69:1163–1172. DOI: 10.1007/s00011-020-01398-y.
9. Schepetkin I. A., Quinn M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*. 2006;6:317–333. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.10.005.
10. Thiriot J. D., Martinez-Martinez Y. B., Endsley J. J., Torres A. G. Hacking the host: exploitation of macrophage polarization by intracellular bacterial pathogens. *Pathogens and Disease*. 2020;78(1). DOI: 10.1093/femspd/ftaa009.
11. Thwe P. M., Amiel E. The role of nitric oxide in metabolic regulation of Dendritic cell immune function. *Cancer Letters*. 2018;412:236–242. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.10.032.
12. Reshetov Y. E., Belousov M. V., Avdeeva E. Yu., Shurupova M. N. Comparative study of the elemental composition and biologically active substances of plants of the genus *Saussurea* DC. flora of Eastern Siberia. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2018;4:205–214. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2018043710.

REFERENCES