

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ РЯСКИ МАЛОЙ (*LEMNA MINOR* L.), РЯСКИ ТРЁХДОЛЬНОЙ (*LEMNA TRISULCA* L.) И РЯСКИ МНОГОКОРЕННОЙ (*LEMNA POLYRHIZA* L.) И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Л. А. Никифоров¹, С. В. Кривошеков¹, А. А. Лигачёва², К. И. Ровкина¹,
Е. С. Трофимова², В. Э. Мамедова¹, М. Г. Данилец², Е. Ю. Шерстобоев²,
В. В. Жданов², М. В. Белоусов¹

¹ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России

²ФГБНУ «НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга»

Томского национального исследовательского медицинского центра

Российской академии наук

Поступила в редакцию 8.04.2020 г.

Аннотация. Изучено влияние водорастворимых полисахаридов (ПС), выделенных водной экстракцией (рН=4) из ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски трёхдольной (*Lemna trisulca* L.) и ряски многокоренной (*Lemna polyrrhiza* L.) и охарактеризованных физико-химическими методами, на функциональную активность клеток иммунной системы. Выделенные ПС из трех видов ряски, характеризуются низким содержанием примесей – белка и нуклеиновых кислот. Выход полисахаридов при водной экстракции (рН 4.0) составляет от 2.60 до 2.78 %, в пересчете на воздушно-сухое сырье. Показано, что все полученные ПС характеризуются высокой степенью дисперсности и отличаются по мономерному составу. В образцах полисахаридов ряски малой и ряски многокоренной преобладающими моносахаридами являются глюкоза и уроновые кислоты, при этом в образце ряски малой обнаружена ксилоза, а в ряске многокоренной арабиноза. Полисахариды, полученные из ряски трёхдольной, значительно отличаются по мономерному составу. Так, у ряски трёхдольной, в отличие от полисахаридов двух других видов, мажорным мономером является галактоза, а содержание глюкозы и уроновых кислот значительно ниже. Методом ВЭЖХ определены показатели молекулярно-массового распределения ПС, выделенных из трех видов ряски. Выделенные полисахариды не проявляют цитотоксических свойств по отношению к иммунокомпетентным клеткам и обладают способностью усиливать эндотоксин независимую продукцию оксида азота: полисахариды ряски малой – в 12.8 раз, ряски трёхдольной – в 25.4 раз, ряски многокоренной – в 20.1 раз. Полученные результаты позволяют рассматривать ПС, выделенные из ряски малой, ряски трёхдольной и ряски многокоренной, в качестве основы при разработке эффективных и малотоксичных лекарственных средств для активации системы иммунитета при хронических воспалительных процессах.

Ключевые слова: водорастворимые полисахариды, род *Lemna*, иммунокомпетентные клетки, оксид азота, эндотоксин.

Ряска (*Lemna* L.) – род цветковых однодольных растений, ранее выделявшийся в семейство рясковые (*Lemnaceae*), травянистые многолетники, встречающиеся повсеместно в пресных водоемах.

В народной медицине популярны наиболее распространенные в Сибири ряска малая (*L. minor*), ряска тройчатая (*L. trisulca*) и ряска многокоренная (*L. polyrrhiza*, синоним *Spirodella polyrrhiza* (L.) Schleid.), используемые в виде настоев, водных настоев и отваров при кожных заболеваниях, болезнях обмена веществ и иммунной системы [1, 2]. Ранее [3], показано, что пектиновый полисахарид

© Никифоров Л. А., Кривошеков С. В., Лигачёва А. А., Ровкина К.И., Трофимова Е.С., Мамедова В.Э., Данилец М. Г., Шерстобоев Е. Ю., Жданов В. В., Белоусов М. В., 2020

Никифоров Л. А., Кривошеков С. В., Лигачёва А. А., Ровкина К. И., Трофимова Е. С., Мамедова В. Э., Данилец М. Г., Шерстобоев Е. Ю., Жданов В. В., Белоусов М. В.

рид (лемнан), выделенный из *L. tinor*, обладает иммуностимулирующим действием, направленным на усиление активности системы фагоцитоза.

Растительные водорастворимые полисахариды (ПС), обладая низкой токсичностью, проявляют выраженную иммуномодулирующую активность [4, 5], усиливают продукцию макрофагами оксида азота (NO), ряда про- и противовоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-12, ИЛ-10, ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИФН- α/β , стимулируя пино- и фагоцитоз [6-12]. Анализ литературы указывает на увеличение числа исследований водорастворимых ПС, как потенциальных лекарственных кандидатов для активации системы иммунитета при хронических воспалительных процессах [13, 14].

Известно, что в образцах растительных ПС достаточно часто обнаруживаются примеси эндотоксина – бактериального липополисахарида (ЛПС), состоящего из гидрофобного домена липида А (или эндотоксина), базового олигосахарида и дистального полисахарида (О-антигена), который оказывает значительное стимулирующее действие на продукцию оксида азота макрофагами мышей [15] и достаточно стабилен в широком диапазоне температуры и кислотности. На клеточном уровне ЛПС является конкурентом ПС за связывание с мембранными рецепторами (TLR4), запускающими каскадную реакцию врождённого иммунитета [16]. Поскольку эндотоксин при парентеральном введении является агрессивным веществом, вызывающим в инфицированном организме гипертермию, лейкоцитоз, внутрисосудистую коагуляцию, множественную органную недостаточность, септический шок, вплоть до летального исхода даже в минимальных концентрациях 1-10 нг (10–100 EU)/кг, и способен изменять клеточный и гуморальный иммунный ответ [17, 18, 19], отсутствие его примесей в природных субстанциях, при выявлении направленных фармакологических эффектов даёт значительные преимущества для дальнейшей разработки на их основе лекарственных препаратов различного назначения.

Цель работы – сравнительная характеристика состава и влияния на активацию клеток системы

иммунитета водорастворимых полисахаридов из ряски малой (LM), ряски тройчатой (LT) и ряски многокорневой (LP).

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Изученные образцы ПС получены из воздушно-сухого сырья (влажность менее 6 %) цельных растений, собранных в фазе цветения в местах их естественного произрастания (табл.1). Выход водорастворимых ПС из различных видов ряски приблизительно одинаков 2.60-2.78 % от массы воздушно-сухого сырья.

ПС выделяли из воздушно-сухого сырья по следующей методике: 20.0 г сырья экстрагировали 400 мл очищенной воды, подкисленной HCl до pH 4.0, при нагревании на кипящей водяной бане и периодическом перемешивании в течение 3 ч. После отделения частиц сырья фильтрацией через многослойный тканевый фильтр фильтрат упаривали на роторном испарителе при температуре 50 °C до 1/5 от исходного объема. К полученному раствору добавляли трехкратный объем 96 % (об./об.) этанола и отстаивали 24 ч при температуре 2-4 °C, затем осадок отфильтровывали через бумажный фильтр и растворяли в 100 мл очищенной воды при перемешивании на магнитной мешалке в течение 3 ч при комнатной температуре. Не растворившийся остаток, представляющий собой мельчайшие частицы сырья и денатурированный белок, отделяли центрифугированием (4000 об/мин, в течение 30 мин). Супернатант диализировали в полупроницаемой мембране с диаметром пор 15 кДа (Cellu-Sep, США) в течение 48 ч против 50-кратного объема очищенной воды при комнатной температуре и перемешивании на магнитной мешалке, меняя воду через 24 ч. После диализа раствор замораживали и лиофильно высушивали. В полученных образцах ПС определяли содержание углеводов, урановых кислот, белка и нуклеиновых кислот. Содержание углеводов определяли по методу Смита[20], урановых кислот по реакции с карбазолом после полного гидролиза[21], содержание белка – методом Лоури[22] и нуклеиновых кислот по методу Спирина[23].

Таблица 1.

Характеристика сырья

| Вид | Место, год, месяц сбора материала | Выход ПС, % |
|-----|--|-------------|
| LM | Малопроточные и стоячие водоемы Кожевниковского и Томского районов Томской области. Июль-август 2016 года | 2.71±0.17 |
| LT | Малопроточные и стоячие водоемы Кожевниковского района (окрестности села Десятова) Томской области. Июль 2016 года | 2.60±0.30 |
| LP | Малопроточные и стоячие водоемы Томского района (окрестности села Коларова) Томской области. Июль 2016 года | 2.78±0.21 |

Моносахаридный состав ПС определяли методом газовой хроматографии. Полный кислотный гидролиз проводили, помещая точную навеску ПС (20 мг) в ампулу вместимостью 10 мл, добавляя 5 мл 4 М трифторуксусной кислоты (ТФК). Ампулу запаивали и выдерживали 6 часов в сушильном шкафу при температуре 85 °С. После охлаждения содержимое ампулы для удаления избытка ТФК упаривали на роторном испарителе, добавляя трижды 0.5 мл метанола. Остаток растворяли в 96% (об./об.) этаноле, фильтровали, остаток высушивали до постоянной массы при температуре не более 50 °С.

Для получения триметилсилильных производных к остатку, полученному после гидролиза образца, добавляли 100 мкл безводного пиридина и 30 мкл N-триметилсилилимидазола, помещали на 25 минут в плотно закупоренном флаконе в сушильный шкаф (75 °С), охлаждали, добавляли 1 мл гексана, перемешивали, верхний слой отбирали на анализ.

Разделение силилированных производных моносахаридов проводили на газовом хроматографе Agilent 7890A (США) на колонке HP-1MS (30 м×0.25 мм×0.25 мкм), скорость потока газа-носителя (He) 1 мл/мин, в градиенте температур: 70 °С – 2 минуты, далее 10 °С/мин (до 300 °С), температура инжектора 280 °С, детектирование масс-спектрометрическое Agilent 5975S (США) ионизация электронным ударом, сканирование m/z 33-600, температура ионного источника 120 °С. Количественное содержание моносахаридов определяли методом простой нормировки. Идентификацию моносахаридов проводили путем сравнения времен удерживания сигналов на хроматограммах испытуемых растворов с временами удерживания стандартов моносахаридов (Carbohydrates Kit, SA, lot#SLBZ3089).

Анализ молекулярно-массового распределения проводили на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Германия, «Dionex»). Условия хроматографирования: колонка TSK GMPW_{XL}, 300×7.8 мм, 13 мкм, подвижная фаза – вода, скорость потока 1 мл/мин. Детектирование рефрактометрическое, температура ячейки детектора 40 °С. Калибровочная прямая построена по растворам декстранов (с = 1 мг/мл) молекулярной массой 1, 17, 40, 250, 500, 1200 кДа при тех же условиях хроматографирования.

Функциональную активность клеток иммунной системы оценивали в экспериментах на линейных мышцах C57BL/6 8-10 недельного возраста.

Животные получены из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томский НИМЦ. Все манипуляции с животными проведены в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организация процедур при работе с лабораторными животными» и ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами». Макрофаги (МФ) выделяли из суспензии клеток перитонеальной полости мышей. Животных забивали дислокацией шейного отдела позвоночника, брюшную полость промывали ледяным изотоническим раствором хлорида натрия (ФР), суспензию клеток центрифугировали, удаляли супернатант, осадок ресуспендировали в культуральной среде. Выделяли селезенку. Затем клетки помещали в пластиковые чашки Петри $1.5-2.0 \times 10^6$ клеток/мл, культивировали 2 ч при 37 °С (в атмосфере 5 % CO₂ и абсолютной влажности) в среде следующего состава: RPMI 1640 («Sigma»), 10 % ЭТС («Hyclone»), 20 mM HEPES («Sigma»), 0.05 mM 2-меркаптоэтанол («Sigma»), 50 мкг/мл гентамицина («Sigma»), 2 mM L-глутамин («Sigma»). Не прилипшую фракцию клеток удаляли, для работы использовали адгезивную фракцию – МФ. Спленциты получали после двукратной отмывки ледяным ФР гомогената селезенок мышей. В тесте с 0.1% трипановым синим оценивали жизнеспособность клеток (не менее 95 %). МФ (3×10^6 клеток/мл) переносили в плоскостонные, спленциты (1.5×10^6 клеток/мл) в круглодонные 96-луночные планшеты и культивировали в указанных выше условиях в присутствии различных концентраций полисахаридов; 1 мкг/мл липополисахарида ЛПС (серотип O111:B4, «Sigma»); 4 мкг/мл конконавалина А («Sigma»). Для определения примеси эндотоксина использовали полимиксин В («InvivoGen») в концентрации 50 мкг/мл. Через 48 ч культивирования колориметрическим методом оценивали продукцию NO по содержанию нитритов в супернатанте клеток, смешивая реактив Грейса с эквивалентным объемом надосадка [24], и пролиферацию, для чего за 4 ч до окончания инкубирования в лунки вносили раствор тетразолиевого красителя (МТТ, «Sigma») в конечной концентрации 200 мкг/мл, затем супернатант удаляли, осадок растворяли диметилсульфоксидом («Sigma»)[25]. Абсорбцию полученных растворов измеряли на многоканальном спектрофотометре Titertek Multiskan® MCC («Labsystems») при длине волны 540 нм. Концентрацию нитритов рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов нитрита натрия. Полученные в ходе ис-

Никифоров Л. А., Кривошеков С. В., Лигачёва А. А., Ровкина К. И., Трофимова Е. С., Мамедова В. Э., Данилец М. Г., Шерстобоев Е. Ю., Жданов В. В., Белоусов М. В.

следования данные обрабатывали с помощью пакета статистических программ Statistica 8.0. Для каждой выборки вычислялось среднее арифметическое (X), ошибка среднего арифметического (m), среднее арифметическое отклонение (σ). Проверка на нормальность распределения проводилась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Сравнение выборочных средних осуществлялось по критерию Даннета для сравнения нескольких экспериментальных выборок с одной контрольной в случае нормального распределения или по критерию Крускалла-Уоллиса для к-несвязанных выборок ($k > 2$) и критерия Данна в случае распределения, отличающегося от нормального.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Выделенные ПС из трех видов ряски, характеризуются низким содержанием примесей – белка и нуклеиновых кислот (табл.2).

Таблица 2.

Характеристика образцов полисахаридов (n=3)

| ПС | Содержание в образце, % | | |
|----|-------------------------|-----------|---------------------|
| | углеводы | белок | нуклеиновые кислоты |
| LM | 96.9±1.8 | 0.14±0.03 | 0.0010±0.0001 |
| LT | 97.9±0.9 | 0.38±0.07 | 0.0043±0.0002 |
| LP | 98.4±2.0 | 0.27±0.06 | 0.0055±0.0004 |

многокоренной в концентрации 5 и 20 мкг/мл не влияли на пролиферацию лимфоцитов (табл. 5),

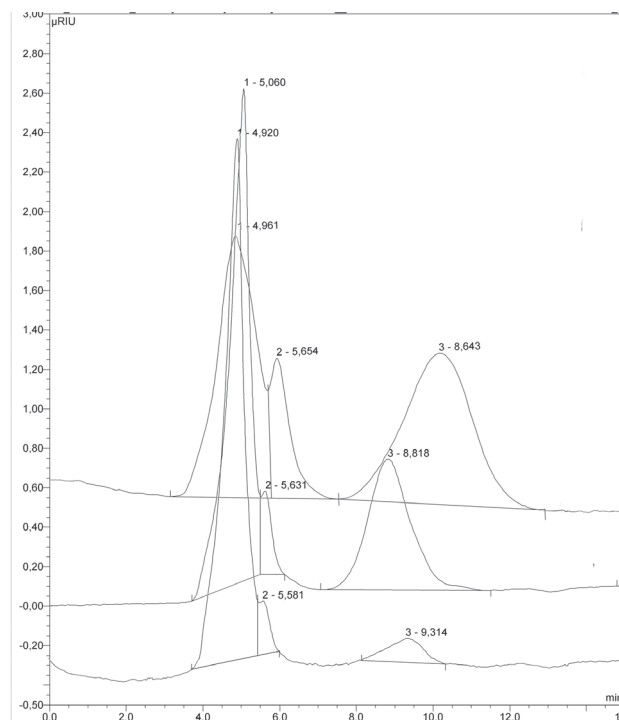


Рис. 1. Хроматограмма полисахаридных комплексов.

Таблица 3.

Моносахаридный состав полисахаридов *L. minor*, *L. trisulca* и *L. polyrhiza*

| Вид | Содержание, % | | | | | | |
|-----|---------------|-----------|---------|-----------|---------|----------|-------------------|
| | Глюкоза | Галактоза | Ксилоза | Арабиноза | Манноза | Фруктоза | Уроновые кислоты* |
| LM | 35.07 | 10.56 | 12.60 | - | - | - | 41.77 |
| LT | 15.51 | 40.37 | - | - | 18.57 | 7.10 | 18.45 |
| LP | 41.33 | 10.43 | - | 12.88 | - | 5.08 | 30.28 |

* Определяли спектрофотометрически карбазол-серным методом [21]

Из данных ГХ-МС анализа следует, что полученные полисахариды отличаются по моносахаридному составу (табл. 3). В образцах LM и LP преобладающими моносахаридами являются глюкоза и уроновые кислоты, при этом в образце LM обнаружена ксилоза, а в LP арабиноза. ПС, полученные из LT, значительно отличаются по мономерному составу. Так, у LT, в отличие от ПС LM и LP, мажорным мономером является галактоза, а содержание глюкозы и уроновых кислот значительно ниже.

Методом ВЭЖХ были определены показатели молекулярно-массового распределения ПС, выделенных из трех видов ряски (рис.1, табл. 4). Все полученные хроматограммы имеют схожий вид: наблюдается три пика с различными молекулярными массами, что свидетельствует о высокой степени полидисперсности.

Биологические свойства. ПС ряски малой ни в одной из используемых концентраций и ряски

Таблица 4. Результаты молекулярно-массового анализа ПС, выделенных из LM, LT, LP.

| Вид | N | t _R | M _w , кДа | % |
|-----|---|----------------|----------------------|-------|
| LM | 1 | 4.961 | 1151.7 | 44.11 |
| | 2 | 5.654 | 615.3 | 11.37 |
| | 3 | 8.643 | 41.6 | 44.52 |
| LT | 1 | 4.92 | 1195.4 | 88.18 |
| | 2 | 5.581 | 657.6 | 4.95 |
| | 3 | 9.314 | 22.4 | 6.87 |
| LP | 1 | 5.06 | 1053.0 | 61.24 |
| | 2 | 5.631 | 628.3 | 5.37 |
| | 3 | 8.818 | 35.2 | 33.39 |

полученные значения не отличались от показателя интактного контроля и были в 1.3-1.8 раз ниже Кон А-активированных клеток. ПС LT во всех применяемых дозировках и LP в концентрации 80 мкг/

мл значительно в 1.5-1.9 раза усиливали интенсивность пролиферации относительно контроля 1, достигая значений контроля 2. ПС, выделенные из всех видов ряски, не проявляли цитотоксических свойств по отношению к антигенпрезентирующим клеткам. При этом все ПС значительно усиливали продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей относительно интактного контроля. Наименьшую стимуляцию проявляли ПС LM – в 1.7-2.5 раза по сравнению с контролем 1 в зависимости от концентрации, максимальное увеличение в 5.0-6.7 раз было выявлено у ПС LT, достоверное усиление эффекта в 3.4-4.8 раза показали также и ПС LP. Однако NO-активирующее действие изучаемых ПС было значительно ниже ЛПС-стимулированного контроля и все ПС проявляли некоторое снижение активности при культивировании клеток с высокой концентрацией веществ.

Известно, что экстракты, выделенные из растений, могут содержать примесь эндотоксина (липополисахарида), который обладает NO-стимулирующей активностью [5]. Для того чтобы убедиться в том, что повышение продукции оксида азота перитонеальными макрофагами мышей в присутствии растительных ПС, выделенных из ряски малой, ряски трёхдольной, ряски многокорневой не связано с эндотоксином, были проведены эксперименты с использованием полимиксина В, связывающего ЛПС. В лунки 96-луночного планшета вносили исследуемые образцы ПС (20 мкг/мл) и полимиксин В, после часовой

инкубации добавляли перитонеальные макрофаги и через 48 ч оценивали концентрацию нитритов в супернатантах клеток. Из таблицы 6 видно, что полимиксин В не влиял на спонтанный уровень продукции оксида азота макрофагами (1.53 мкМ и 2.08 мкМ, соответственно). При культивировании клеток с ЛПС концентрация нитритов увеличилась в 34.2 раза с 2.08 ± 0.10 мкМ в контроле до 71.12 ± 1.72 мкМ в опыте. Добавление полимиксина В к ЛПС снижало показатель в 24.2 раза практически до спонтанного уровня (до 2.93 ± 0.20 мкМ).

Все исследуемые полисахариды стимулировали продукцию NO: ПС LM – в 12.8 раз (до 26.65 ± 0.31 мкМ), ПС LT – в 25.4 раз (до 52.76 ± 0.17 мкМ), ПС LP – в 20.1 раз (до 41.74 ± 1.38 мкМ). Предварительная инкубация изученных образцов растительных полисахаридов с полимиксином В не приводила к снижению уровня продукции оксида азота в культуре клеток и даже несколько увеличивала его: в 1.6 раза в культуре с ПС LM (до 43.97 ± 0.23 мкМ), в 1.1 раза в культуре с ПС LT (до 57.73 ± 0.71 мкМ), в 1.2 раза в культуре с ПС LP (до 51.38 ± 0.36 мкМ).

Таким образом, ПС, выделенные из всех изученных видов ряски, обладают в эксперименте способностью усиливать эндотоксин независимую продукцию оксида азота антигенпрезентирующими клетками и, как следствие, потенцировать развитие воспалительных свойств макрофагов. Полученные результаты позволяют рассматривать водорастворимые полисахариды, выделен-

Таблица 5.

Влияние различных концентраций ПС, выделенных из LM, LT и LP, на пролиферацию иммунокомпетентных клеток и продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами интактных мышей линии C57/BL6 ($X \pm m$).

| Исследуемое вещество | Концентрация, мкг/мл | Пролиферация, у.е. оптической плотности | | Концентрация нитритов, мкМ |
|----------------------|----------------------|---|-------------------|----------------------------|
| | | спленоциты | макрофаги | |
| Среда (контроль 1) | - | 0.155 ± 0.014 | 0.305 ± 0.022 | 2.74 ± 0.40 |
| Кона (Контроль 2) | 4 | $0.266 \pm 0.015^*$ | - | - |
| ЛПС (контроль 3) | 1 | - | 0.342 ± 0.010 | $23.49 \pm 0.87^*$ |
| ПС LM | 5 | $0.147 \pm 0.007 \blacktriangle$ | 0.362 ± 0.016 | $6.10 \pm 0.33^* \bullet$ |
| | 20 | $0.185 \pm 0.015 \blacktriangle$ | 0.304 ± 0.017 | $5.00 \pm 0.18^* \bullet$ |
| | 80 | $0.199 \pm 0.019 \blacktriangle$ | 0.319 ± 0.016 | $4.69 \pm 0.47^* \bullet$ |
| ПС LT | 5 | $0.232 \pm 0.008^*$ | 0.309 ± 0.015 | $15.81 \pm 1.07^* \bullet$ |
| | 20 | $0.233 \pm 0.016^*$ | 0.316 ± 0.013 | $17.49 \pm 1.07^* \bullet$ |
| | 80 | $0.289 \pm 0.015^*$ | 0.366 ± 0.005 | $13.93 \pm 0.52^* \bullet$ |
| ПС LP | 5 | $0.186 \pm 0.005 \blacktriangle$ | 0.340 ± 0.031 | $13.13 \pm 1.02^* \bullet$ |
| | 20 | $0.193 \pm 0.003 \blacktriangle$ | 0.334 ± 0.004 | $12.38 \pm 0.62^* \bullet$ |
| | 80 | $0.228 \pm 0.009^*$ | 0.334 ± 0.013 | $9.39 \pm 0.80^* \bullet$ |

Примечание: * – различия показателя с контролем 1 достоверны, $p < 0.05$; \blacktriangle – различия показателя с контролем 2 достоверны, $p < 0.05$; \bullet – различия показателя с контролем 3 достоверны, $p < 0.05$. $n = 6$.

Влияние полимиксина В на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами интактных мышей линии C57/BL6, стимулированную ПС, выделенными из LM, LT и LP, ($X \pm m$)

| Исследуемое вещество | Концентрация, мкг/мл | Концентрация нитритов, мкМ | |
|----------------------|----------------------|--------------------------------|------------------|
| | | без полимиксина В (контроль 2) | с полимиксином В |
| Среда (контроль 1) | - | 2.08±0.10 | 1.53±0.11 |
| ЛПС | 1 | 71.12±1,72* | 2.93±0.20• |
| ПС LM | 20 | 26.65±0.31* | 43.97±0.23*• |
| ПС LT | 20 | 52.76±0.17* | 57.73±0.71*• |
| ПС LP | 20 | 41.74±1.38* | 51.38±0.36*• |

Примечание: * – различия показателя с контролем 1 достоверны, $p < 0.05$; • – различия показателя с контролем 2 достоверны, $p < 0.05$. $n = 6$.

ные из LM, LT и LP, в качестве потенциальных лекарственных кандидатов для активации системы иммунитета при хронических воспалительных процессах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Все ПС, выделенные из растений рода *Lemna*, характеризуются низким содержанием примесей (белок и нуклеиновые кислоты) и высокой степенью полидисперсности. В то же время, изучаемые полисахариды значительно различаются по составу. В образцах LM и LP преобладающими моносахаридами являются глюкоза и уроновые кислоты, при этом в образце LM обнаружена ксилоза, а в LP арабиноза. В ПС, полученных из LT, в отличие от ПС LM и LP, мажорным мономером является галактоза, а содержание глюкозы и уроновых кислот значительно ниже.

2. ПС, выделенные из ряски малой, ряски тройчатой и ряски многокорневой, не проявляют цитотоксических свойств по отношению к иммунокомпетентным клеткам и значительно усиливают продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей. Экспериментально доказано, что ПС, полученные описанным способом, не содержат примесей эндотоксина, а их NO-стимулирующие свойства обусловлены исключительно полисахаридными комплексами рясок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Буданцев А.Л., Лесиовская Е.Е. Дикорастущие полезные растения России // СПб.: СПХФА. 2001. 663 с.
- Жмылев П.Ю., Кривохарченко И.С., Щербаков А.В. // Биологическая флора Московской области. 1995. Вып.10. С. 20-51.
- Оводова Р.Г., Головченко В.В., Шашков А.С., Попов С.В., Оводов Ю.С. // Биоорганическая химия. 2000. Том 26. № 10. С. 743-751
- Kraus J., Franz G. // Chem. Pharm. Bull. 1992. Vol.40(2) . P.314-317.
- Schepetkin I.A., Quinn M.T. // Int.

Immunopharmacol. 2006. Vol. 6. P. 317-333.

6. Sun H., Zhang J., Chen F., Chen X., Zhou Z., Wang H. // Carbohydrate Polymers. 2015. Vol.121. P.388-402.

7. Shrestha G., St Clair L.L., O'Neill K.L. // Phytotherapy Research PTR. 2015. Vol.29(3) . P. 317-322.

8. Lei W., Browning J.D. Jr., Eichen P.A., Lu C.H., Mossine V.V., Rottinghaus G.E., Folk W.R., Sun G.Y., Lubahn D.B., Fritsche K.L. // Journal of Ethnopharmacology. 2015. Vol. 172. P.247-253.

9. Zhang W., Song D., Xu D., Wang T., Chen L., Duan J. // Carbohydrate Polymers. 2015. Vol. 133. P.154-162.

10. Lee J.B., Tanikawa T., Hayashi K., Asagi M., Kasahara Y., Hayashi T. // Carbohydrate Polymers. 2015. Vol. 116. P.159-166.

11. Zhu H.Y., Chen G.T., Meng G.L., Xu J.L. // Chinese Journal of Natural Medicines. 2015. Vol.13(3) . P.199-207.

12. Yamasaki F.T., Lenzi R.M., Campestrini L.H., Bovo F., Seyfried M., Soldera-Silva A., Stevan-Hancke F.R., Zawadzki-Baggio S.F., Pettolino F.A., Bacic A., Maurer J.B. // Carbohydrate Polymers. 2015. Vol. 125. P.241-248.

13. Schepetkin I.A., Xie G., Kirpotina L.N., Jutila M.A., Quinn M.T., Klein R.A. // International Immunopharmacology. 2008. Vol.8 (10) . P.1455-1466.

14. Lovegrove A., Edwards C.H., De Noni I., Patel H., El S.N., Grassby T., Zielke C., Ulmius M., Nilsson L., Butterworth P.J., Ellis P.R., Shewry P.R. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2017. Vol. 57(2). P. 237–253.

15. Stuehr D.J., Marletta M.A. // Proc Natl AcadSci USA. 1985. Vol.82 (22). P.7738-7742

16. Raetz C.R., Whitfield C. // Annu. Rev. Biochem. 2002. Vol. 71. P. 635–700.

17. Morrison D.C., Danner R.L., Dinarello C.A., Munford R.S., Natanson C., Pollack M., Spitzer J.J., Ulevitch R.J., Vogel S.N., McSweegan E. // J. Endotoxin Res. 1994. Vol.1. P. 71-83.

18. Anderson W., Slawson R., Mayfield C. // *Can. J. Microbiol.* 2002. Vol.48. P. 567–587.
19. Sulc R., Szekely G., Shinde S., Wierzbicka C., Vilela F. // *Scientific Reports.* 7:44299. 2017. DOI: 10.1038/srep44299.
20. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. // *Analyt. Chem.* 1956. Vol. 28. P. 350–356.
21. Корж А.П., Гурьев А.М., Белоусов М.В., Юсубов М.С. // *Химия растительного сырья.* 2011. №4. С. 259-264.
22. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. P. 265–275.
23. Спирин А.С. // *Биохимия.* 1958. Т. 23. № 5. С. 656-662.
24. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. // *Anal. Biochem.* 1982. Vol. 126(1). P. 131-143.
25. Mosmann T.R. // *J. Immunol. Methods.* 1983. Vol. 5. P. 55-63.

Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России

Никифоров Л. А., ассистент каф. Фармацевтического анализа

E-mail: chrom.ssmu@mail.ru

**Кривошеков С. В., ст.преп. кафедры фармацевтического анализа*

E-mail: ksv_tsu@mail.ru

Ровкина К. И., старший преподаватель кафедры химии

E-mail: rki91@bk.ru

Мамедова Валерия Элхан кызы, студент

E-mail: elena.mamedova.67@mail.ru

*НИИФУРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН
Лигачева А. А., научный сотрудник отдела иммунофармакологии*

Трофимова Е. С., канд. мед. наук, ст. научный сотрудник отдела иммунофармакологии

Данилец М. Г., д-р биол. наук, гл. научный сотрудник отдела экспериментальных биологических моделей

E-mail: m.danilets@mail.ru

Шерстобоев Е. Ю., д-р мед.наук, заведующий отделом иммунофармакологии

E-mail: sher1964@rambler.ru

Жданов В. В., д-р мед. наук, директор

Белоусов М. В., д-р фарм. наук, заведующий кафедрой фармацевтического анализа

E-mail: mvb63@mail.ru

Siberian State Medical University

*Nikiforov L. A., Assistant Professor, department
Pharmaceutical analysis*

E-mail: chrom.ssmu@mail.ru

Krivoshchekov S. V., assistant professor, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

E-mail: ksv_tsu@mail.ru

Rovkina K. I., assistant professor

E-mail: rki91@bk.ru

Mamedova V. E., student

E-mail: elena.mamedova.67@mail.ru

*Omsk National Research Medical Center
Ligachjova A. A., PhD, Researcher, Department of Immunopharmacology*

Trofimova E. S., PhD, Senior Researcher, Department of Immunopharmacology

Danilec M. G., PhD., DSci., Senior Researcher, Department of Experimental Biological Models of Immunopharmacology

E-mail: m.danilets@mail.ru

Sherstoboev E Yu., DM, head of immunopharmacology department of

E-mail: sher1964@rambler.ru

Zhdanov V. V., DM, Director of the Research Institute of Scientific and Technical Information.

Belousov M. V., PhD., DSci., Head of Department of Pharmaceutical Analysis

E-mail: mvb63@mail.ru

CHEMICAL CHARACTERISTICS OF WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDES OF *LEMNA MINOR* L., *LEMNA TRISULCA* L. AND *LEMNA POLYRHIZA* L. AND THEIR INFLUENCE ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF CELLS OF THE IMMUNE SYSTEM

L. A. Nikiforov¹, S. V. Krivoshchekov¹, A. A. Ligacheva², K. I. Rovkina¹, E. S. Trofimova²,
V. E. Mamedova¹, M. G. Danilets², E. Yu. Sherstoboev², V. V. Zhdanov², M. V. Belousov¹

¹ Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia

² Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named
after E.D. Goldberg, Tomsk National Research Medical Center RAS

Abstract. The effect of water-soluble polysaccharides (PS), isolated by aqueous extraction (pH = 4) from small duckweed (*Lemna minor* L.), three-chambered duckweed (*Lemna trisulca* L.) and multi-root duckweed (*Lemna polyrrhiza* L.) and characterized by physicochemical methods, was studied. on the functional activity of cells of the immune system. Isolated PS from three species of duckweed are characterized by a low content of impurities – protein and nucleic acids. The output of polysaccharides during aqueous extraction (pH 4.0) is from 2.60 to 2.78%, in terms of air-dry raw materials. It was shown that all obtained PSs are characterized by a high degree of dispersion and differ in the monomer composition. In polysaccharide polysaccharide samples of small duckweed and duckweed multi-rooted, the predominant monosaccharides are glucose and uronic acids, while xylose was founded in the small duckweed polysacchar, and arabinose was found in duckweed. The polysaccharides obtained from the three-lobed duckweed significantly differ in the monomer composition. So, in duckweed three-fold, unlike the polysaccharides of the other two species, the major monomer is galactose, and the content of glucose and uronic acids is much lower. The HPLC method was used to determine the molecular weight distribution of PS isolated from three species of duckweed. Isolated polysaccharides do not exhibit cytotoxic properties with respect to immunocompetent cells and have the ability to enhance endotoxin independent production of nitric oxide: small duckweed polysaccharides - 12.8 times, three-lobed duckweed - 25.4 times, multi-rooted duckweed - 20.1 times. The results obtained allow us to consider PS isolated from duckweed, duckweed trifoliolate and duckweed multi-rooted, as the basis for the development of effective and low-toxic drugs to activate the immune system in chronic inflammatory processes.

Keywords: water-soluble polysaccharides, genus *Lemna*, immunocompetent cells, nitric oxide, endotoxin.

REFERENCES

1. Budancev A.L., Lesiovskaya E.E. Dikorastushchie poleznye rasteniya Rossii, SPb.: SPHFA, 2001, 663 p.
2. ZHmylev P.YU., Krivoharchenko I.S., SHCHerbakov A.V. Biologicheskaya flora Moskovskoj oblasti, 1995, Vyp.10, P. 20-51.
3. Ovodova R.G., Golovchenko V.V., SHashkov A.S., Popov S.V., Ovodov YU.S. Bioorganicheskaya himiya, 2000, Tom 26, № 10, P. 743-751
4. Kraus J., Franz G. Chem. Pharm. Bull., 1992, Vol. 40(2), P. 314-317.
5. Schepetkin I.A., Quinn M.T. Int. Immunopharmacol., 2006, Vol. 6, P. 317-333.
6. Sun H., Zhang J., Chen F., Chen X., Zhou Z., Wang H. Carbohydrate Polymers, 2015, Vol. 121, P. 388-402.
7. Shrestha G., St Clair L.L., O'Neill K.L. Phytotherapy Research PTR, 2015, Vol. 29 (3), P. 317-322.
8. Lei W., Browning J.D. Jr., Eichen P.A., Lu C.H., Mossine V.V., Rottinghaus G.E., Folk W.R., Sun G.Y., Lubahn D.B., Fritsche K.L. Journal of Ethnopharmacology, 2015, Vol. 172, P. 247-253.
9. Zhang W., Song D., Xu D., Wang T., Chen L., Duan J. Carbohydrate Polymers, 2015, Vol. 133, P.154-162.
10. Lee J.B., Tanikawa T., Hayashi K., Asagi M., Kasahara Y., Hayashi T. Carbohydrate Polymers, 2015, Vol. 116, P. 159-166.
11. Zhu H.Y., Chen G.T., Meng G.L., Xu J.L., Chinese Journal of Natural Medicines, 2015, Vol. 13(3), P. 199-207.
12. Yamasaki F.T., Lenzi R.M., Campestrini L.H., Bovo F., Seyfried M., Soldera-Silva A., Stevan-Hancke F.R., Zawadzki-Baggio S.F., Pettolino F.A., Bacic A., Maurer J.B. Carbohydrate Polymers, 2015, Vol. 125, P. 241-248.
13. Schepetkin I.A., Xie G., Kirpotina L.N., Jutila M.A., Quinn M.T., Klein R.A. International

Immunopharmacology, 2008, Vol. 8 (10), P. 1455-1466.

14. Lovegrove A., Edwards C.H., De Noni I., Patel H., El S.N., Grassby T., Zielke C., Ulmius M., Nilsson L., Butterworth P.J., Ellis P.R., Shewry P.R. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2017, Vol. 57 (2), P. 237–253.

15. Stuehr D.J., Marletta M.A. Proc Natl AcadSci USA, 1985, Vol. 82 (22), P. 7738-7742.

16. Raetz C.R., Whitfield C. Annu. Rev. Biochem., 2002, Vol. 71, P. 635–700.

17. Morrison D.C., Danner R.L., Dinarello C.A., Munford R.S., Natanson C., Pollack M., Spitzer J.J., Ulevitch R.J., Vogel S.N., McSweeney E. J. Endotoxin Res., 1994, Vol. 1, P. 71-83.

18. Anderson W., Slawson R., Mayfield C. Can. J. Microbiol., 2002, Vol. 48, P. 567–587.

19. Sulc R., Szekely G., Shinde S., Wierzbicka C., Vilela F. Scientific Reports, 2017, 7: 44299. DOI: 10.1038/srep44299.

20. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. Analyt. Chem., 1956, Vol. 28, P. 350–356.

21. Korzh A.P., Gur'ev A.M., Belousov M.V., YUsubov M.S. Himiya rastitel'nogo syr'ya, 2011, №4, P. 259-264.

22. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. J. Biol. Chem., 1951, Vol. 193, P. 265–275.

23. Spirin A.S. Biohimiya, 1958, T. 23, № 5, P. 656-662.

24. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Anal. Biochem., 1982, Vol. 126 (1), P. 131-143.

25. Mosmann T.R. J. Immunol. Methods, 1983, Vol. 5, P. 55-63.