

УДК 615.275.4

## ПОЛИСАХАРИДЫ ТРЕХ ВИДОВ *SAUSSUREA* DC (*S. CONTROVERSA*, *S. SALICIFOLIA*, *S. FROLOVII*): ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ВЛИЯНИЕ НА NO-ПРОДУЦИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА МАКРОФАГОВ

© Я.Е. Решетов<sup>1,4</sup>, А.А. Лигачёва<sup>2</sup>, Е.Ю. Авдеева<sup>1</sup>, М.Г. Данилец<sup>2</sup>, В.В. Головченко<sup>3</sup>,  
Е.С. Трофимова<sup>2</sup>, Е.И. Гулина<sup>1</sup>, Е.Ю. Шерстобоев<sup>2</sup>, А.М. Гурьев<sup>1,4</sup>, К.И. Ровкина<sup>1,4\*</sup>,  
С.В. Кривошеков<sup>1</sup>, М.В. Белоусов<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет,  
Московский тракт, 2, Томск, 634050 (Россия), e-mail: rki91@bk.ru

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной  
медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский  
медицинский центр РАН, пр. Ленина, 3, Томск, 634028 (Россия)

<sup>3</sup> Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН,  
ул. Первомайская, 50, Сыктывкар, 167982 (Россия)

<sup>4</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический  
университет, пр. Ленина, 30, Томск, 634050 (Россия)

Из наземной части трех видов *Saussurea* DC – соссуреи спорной *S. controversa* DC., соссуреи иволистной *S. salicifolia* L. и соссуреи Фролова *S. frolovii* Ledeb. – последовательной экстракцией водой при 25 и 70 °С получены полисахариды ПС<sub>1</sub> и ПС<sub>2</sub> с выходом 1–2%. ПС<sub>1</sub> свободны от белковых примесей, тогда как с ПС<sub>2</sub> соэкстрагируется белок, не удаляющийся по методу Севага. Все полученные полисахариды содержат остатки уроновых кислот, наибольшим их содержанием отличаются ПС<sub>1</sub> и ПС<sub>2</sub> из *S. controversa*. Средневесовые молекулярные массы (M<sub>w</sub>) ПС<sub>1</sub> из *S. controversa*, *S. salicifolia* и *S. frolovii* составили 448.13, 158.49, 64.03 кДа и ПС<sub>2</sub> – 101.82, 94.60, 225.42 кДа, соответственно. Методом газовой хроматографии установлено, что остатки галактозы (Gal) и арабинозы (Ara) являются мажорными, а остатки рамнозы (Rha), ксилозы (Xyl) и маннозы (Man) – минорными компонентами углеводных цепей выделенных полисахаридов, при этом выявлены межвидовые различия в их моносахаридном составе. ПС<sub>1</sub> *S. salicifolia* и *S. frolovii* и ПС<sub>2</sub> *S. salicifolia* не содержат примеси эндотоксинов и обладают NO-активирующим действием на антигенпрезентирующие клетки (макрофаги), значительно превышающим действие мурамилдипептида.

**Ключевые слова:** Asteraceae, *Saussurea* DC, полисахариды, моносахаридный состав, молекулярная масса, эндотоксины, макрофаги, оксид азота.

### Введение

Интерес к изучению полисахаридов (ПС) высших растений обусловлен сочетанием у данной группы соединений высокой биологической активности при низкой токсичности [1]. В этой связи перспективными объектами для исследования являются представители сем. Астровых (*Asteraceae*), содержащие ПС с гиполипидемической, противовоспалительной, иммуностимулирующей и противоопухолевой видами активности [2–6], в том числе растения рода соссурия (*Saussurea* DC.), популярные у народов Сибири и в традиционной медицине Тибета. Показана значительная антиоксидантная и мембранопротекторная активность ПС из соссуреи

Решетов Ярослав Евгеньевич – аспирант,  
e-mail: fegorplex2013@yandex.ru

Лигачёва Анастасия Александровна – научный  
сотрудник, кандидат биологических наук,  
e-mail: vittelli@mail.ru

Авдеева Елена Юрьевна – доцент кафедры  
фармацевтического анализа, кандидат фармацевтических  
наук, e-mail: elenaavdeev@yandex.ru

обернутой *S. involucrate* (Kar. & Kir.) Sch. Bip. с M<sub>w</sub> 164 и 89 кДа и ПС из снежного лотоса *S. laniceps* Hand.-Mazz. с M<sub>w</sub> 10 и 12 кДа [7–8]. В скрининговых исследованиях растений рода *Saussurea* флоры Сибири выявлено, что виды *S. controversa* DC. (SC), *S. salicifolia* L. (SS) и *S. frolovii* Ledeb. (SF) отличаются высоким содержанием ПС [9].

Окончание на С. 78

\* Автор, с которым следует вести переписку.

Экстракция ПС сопровождается рядом технологических проблем, обусловленных присутствием в растительном материале хлорофилла, эфиров жирных кислот, фенольных соединений и макроэлементов, способных соэкстрагироваться с ПС, что существенно влияет на их физико-химические характеристики и биологические свойства. Большинство современных способов выделения ПС из растений базируются на экстракции водой или, в меньшей степени, некоторыми органическими растворителями (диметилформамид, диметилсульфоксид) при нагревании с последующим осаждением этанолом или ацетоном. Показано, что способы, связанные с обработкой растительного материала при нагревании, приводят к повышению выхода целевого продукта, однако за счет термической деградации, зачастую, не дают возможности получить ПС, наиболее приближенные к нативной структуре [1, 10].

Известно, что растительные водорастворимые ПС, взаимодействуя с Toll-like рецепторами макрофагов, запускают внутриклеточные сигнальные пути MAP-киназ и NF- $\kappa$ B, приводящие к значительному усилению экспрессии генов как противовоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6), так и индуцибельной NO-синтазы [11]. Доказано, что молекула оксида азота (NO) является универсальным транмиттером различных патологических процессов и играет важную роль в регуляции нервной, эндокринной и репродуктивной систем [12, 13].

Цель настоящего исследования – получение водорастворимых полисахаридов из наземной части сосюреи спорной, сосюреи иволистной и сосюреи Фролова последовательной экстракцией водой при комнатной температуре и при нагревании, их предварительная структурно-химическая характеристика и оценка их способности стимулировать продукцию оксида азота макрофагами мышей.

### Материалы и методы

Надземную часть растений SF, SS и листья с черешками SC заготавливали в фазу их вегетации на территории Республики Хакасия в окрестностях с. Ефремкино (N 54.4669527, E 89.445091). Растительный материал высушивали воздушно-теневым способом до содержания влаги не более 8%. Сухой растительный материал измельчали до размера частиц 1–3 мм и обрабатывали согласно схеме, представленной на рисунке.

В результате получены ПС, экстрагирующиеся при комнатной температуре (ПС<sub>1</sub>) и при нагревании (ПС<sub>2</sub>), выход ПС определяли гравиметрически в пересчете на воздушно-сухой растительный материал.

Депротеинизацию ПС осуществляли по методу Севага [14]. Количественное определение белка проводили методом Лоури с предварительным осаждением (ОФС.1.2.3.0012.15 – метод 2 В), используя градуировочный график, построенный для растворов бычьего сывороточного альбумина [15]. Содержание урсоловых кислот (UA) определяли спектрофотометрически методом, основанным на реакции продуктов окисления углеводов с 3,5-диметилфенолом в присутствии концентрированной серной кислоты, с использованием градуировочного графика, построенного для растворов галактуроновой кислоты. Измерение проводили при двух длинах волн 400 и 450 нм на спектрофотометре UNICO 2800 (США) [16].

Молекулярно-массовые характеристики полученных ПС определяли методом высокоэффективной экс-

---

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

*Головченко Виктория Владимировна* – главный научный сотрудник, доктор химических наук, доцент, e-mail: lemnan@mail.ru

*Трофимова Евгения Сергеевна* – старший научный сотрудник, кандидат медицинских наук, e-mail: eugenie76@mail.ru

*Гулина Екатерина Игоревна* – аспирант, e-mail: e.gulina1@gmail.com

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

*Гурьев Артем Михайлович* – руководитель центра внедрения технологий, доктор фармацевтических наук, e-mail: titan-m@mail.ru

*Ровкина Ксения Игоревна* – старший преподаватель кафедры химии, e-mail: rki91@bk.ru

*Кривошеков Сергей Владимирович* – младший научный сотрудник, кандидат химических наук, e-mail: ksv\_tsu@mail.ru

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

клюдозной хроматографии в сравнении с растворами стандартных образцов декстранов ( $c = 1$  мг/мл) с Mw 15, 40, 60, 90, 110, 250 и 500 кДа («Sigma-Aldrich», Германия) [17]. Коэффициент гетерогенности (Mw/Mn) рассчитывали как отношение средневесовой (Mw) к среднечисленной (Mn) молекулярной массе полисахаридов. Моносахаридный состав определяли методом газовой хроматографии после полного кислотного гидролиза ПС 2 М раствором трифторуксусной кислоты, моносахариды восстанавливали до альдитолов с последующим ацетилированием. Для количественного расчета содержания моносахаридов в качестве внутреннего стандарта использовали *мио*-инозитол. Идентификацию ацетатов альдитолов соответствующих моносахаридов проводили на хроматографе Varian 450-GC (Varian, США), оборудованном пламенно-ионизационным детектором с использованием капиллярной колонки VF-5 MS (Varian, США; 0.25 мм, 30 м), анализ проводили в температурном режиме от 175 °C (1 мин) до 250 °C (2 мин) со скоростью увеличения температуры 3 °C/мин.

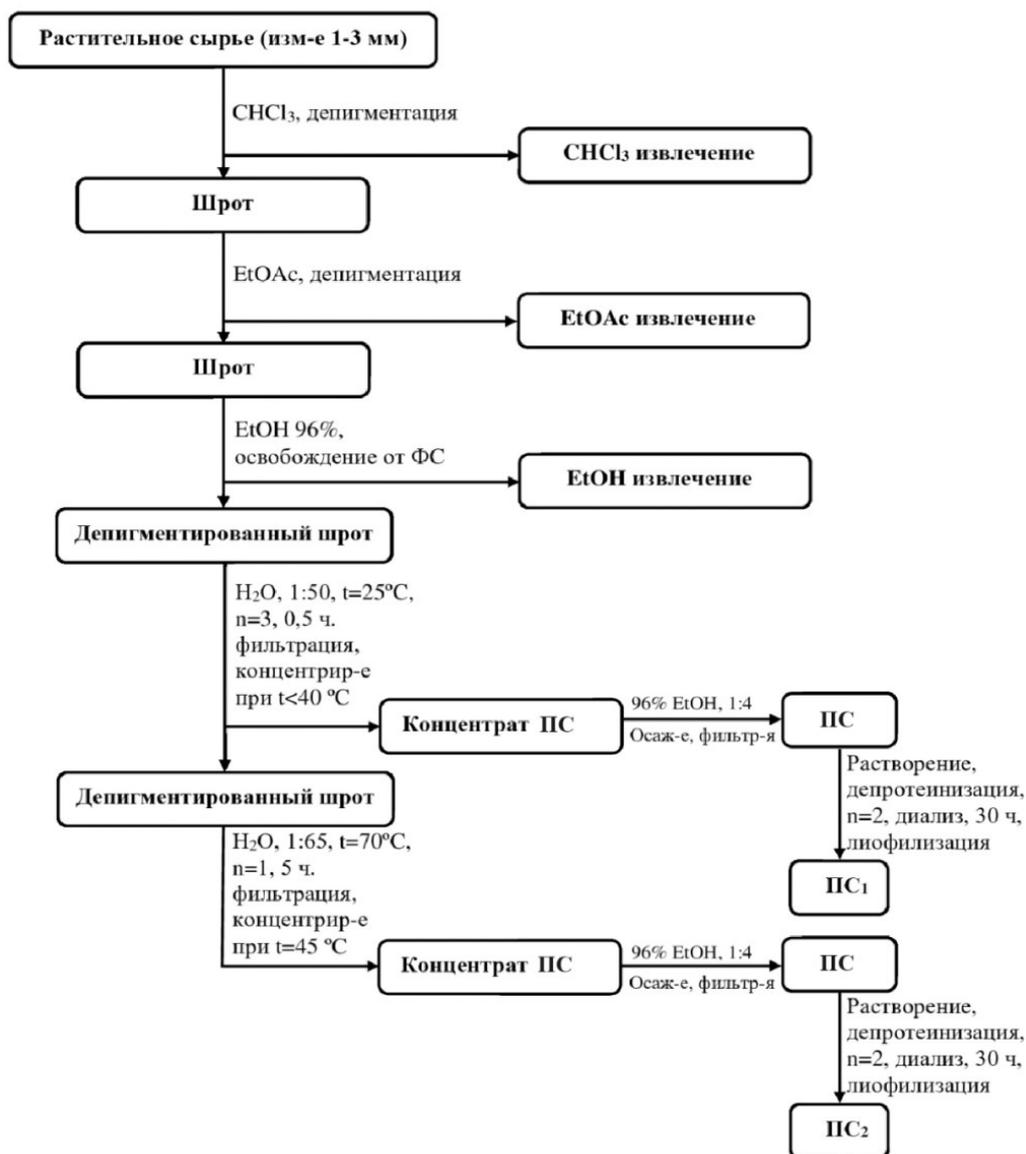


Схема выделения и очистки полисахаридов

*Определение продукции оксида азота.* В экспериментах использовали 45 мышей-самцов линии C57BL/6 конвенциональной категории в возрасте 8–10 недель, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга. Все процедуры с животными проводили в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организация процедур при работе с лабораторными животными» и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях. Этическая экспертиза проведена комиссией по биоэтике НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга ТНИМЦ, протокол экспериментов на животных соответствовал этическим нормам и принципам биомедицинских исследований (протокол № 98122015). Мышей умерщвляли цервикальной дислокацией, в брюшную полость заливали ледяной изотонический раствор хлорида натрия 0.9% (ФР, ООО «Завод Медсинтез»), выделяли суспензию клеток, которую культивировали 2 ч в пластиковых чашках Петри ( $2-2.5 \times 10^6$  клеток/мл) в полной культуральной среде (RPMI 1640 («Sigma», США), 10% ЭТС («HyClone», Великобритания), 20 мМ HEPES («Sigma», США), 0.05 мМ 2-меркаптоэтанол («Sigma», США), 50 мкг/мл гентамицина («Sigma», США), 2 мМ L-глутамина («Sigma», США) в атмосфере 100% влажности и 5% CO<sub>2</sub>. Затем собирали прилипшие к пластику макрофаги, которые культивировали ( $3.0 \times 10^6$  клеток/мл) в плоскодонных 96-луночных планшетах в присутствии ПС, 1 мкг/мл липополисахарида (ЛПС, серотип O111:B4, «Sigma», США) или 30 мкг/мл мурамилдипептида (МДП, N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин,

«Calbiochem», США) в качестве референтного вещества. Через 48 ч отделяли супернатанты клеток, смешивали их с эквивалентным объемом реактива Грейса и измеряли экстинкцию раствора на автоматическом анализаторе ChemWell®Combo при длине волны 545 нм [18]. Концентрацию нитритов определяли по калибровочному графику, построенному с использованием стандартных растворов нитрита натрия и выражали в мкМ. Для оценки пролиферации клеток колориметрическим методом [19] за 4 ч до окончания культивирования в лунки вносили раствор МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид) («Sigma»), в конечной концентрации 200 мкг/мл. Надосадочную жидкость удаляли, осадок растворяли диметилсульфоксидом («Sigma»), абсорбцию полученных растворов замеряли на автоматическом анализаторе при длине волны 545 нм в у.е. оптической плотности. Примеси эндотоксинов определяли по изменению NO-стимулирующих свойств ПС после предварительной инкубации их в течение 1 ч с блокатором – антибиотиком полимиксином В («InvivoGen»), 50 мкг/мл [20].

*Статистическая обработка результатов.* Полученные в ходе исследования данные обрабатывали с помощью пакета статистических программ Statistica 8,0. Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое ( $\bar{X}$ ), ошибку среднего арифметического ( $m$ ), среднее арифметическое отклонение ( $\sigma$ ). Нормальность распределения определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Сравнение выборочных средних значений осуществляли по критерию Даннета для сравнения нескольких экспериментальных выборок с одной контрольной в случае нормального распределения или по критерию Крускалла-Уоллиса для  $k$ -несвязанных выборок ( $k > 2$ ) и критерия Данна в случае распределения, отличающегося от нормального. Различия считали достоверными при  $p < 0.001$ .

### **Результаты и обсуждение**

Последовательной экстракцией водой при комнатной температуре и нагревании из надземной части SF, SS и листьев с черешками SC были выделены ПС, выход и характеристика которых представлены в таблице 1.

Доминирующим структурным компонентом ПС, полученных из SC и SF, являются остатки уроновых кислот, наибольшее содержание которых обнаружено в ПС SC. Выделенные из SS ПС<sub>2</sub> содержат вдвое больше остатков уроновых кислот, чем ПС<sub>1</sub>, тогда как последующая экстракция водой при 70 °С из SF, напротив, позволяет выделить ПС с меньшим содержанием остатков уроновых кислот.

Выявлено, что ПС<sub>1</sub> в сравнении с ПС<sub>2</sub>, выделенные из SC и SS, характеризуются не только меньшим содержанием остатков уроновых кислот, но и большей Mw. Для полисахаридов, выделенных из SF, наблюдается схожая тенденция: ПС<sub>1</sub>, характеризующиеся большим содержанием остатков уроновых кислот, имеют меньшую Mw. Все выделенные ПС характеризовались высокой степенью гетерогенности.

Исследование содержания остатков нейтральных моносахаридов показало, что остатки галактозы и арабинозы являются среди них мажорными во всех полученных ПС, при этом их содержание значительно варьирует не только в ПС, выделенных из разных видов сосюрей, но и в ПС одного вида, полученных водой последовательно в разных температурных режимах. Остатки рамнозы, ксилозы, маннозы и глюкозы являются минорными компонентами ПС, за исключением ПС<sub>2</sub> SF и ПС<sub>1</sub> SS, в которых содержание остатков глюкозы составляет 9–10%.

Установлено, что водой при 25 °С из трех исследованных видов сосюрей экстрагируются ПС свободные от белковых компонентов. ПС<sub>2</sub>, полученные на следующей стадии экстракции из растительного материала водой при 70 °С, содержат значительные количества белка (до 26%), не удаляющегося при депротенизации по методу Севага.

Биологические свойства ПС первоначально оценивали в цитотоксическом тесте и далее по их способности стимулировать продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей (табл. 2). Выявлено, что ПС<sub>1</sub> SC снижали пролиферацию клеток в 1.2 раза относительно как контроля 1, так и контроля 2 в концентрации 20 мкг/мл. Остальные ПС независимо от вида растений и способа выделения не проявляли цитотоксических свойств. Культивирование МФ с ПС<sub>1</sub> SC показало, что концентрация нитритов увеличивалась в 8.4 (2 мкг/мл) и 8.7 (20 мкг/мл) раз, с ПС<sub>1</sub> SS в 4.9 (2 мкг/мл) и 6.7 (20 мкг/мл) раз и с ПС<sub>1</sub> SF в 6.8 (2 мкг/мл) и 8.5 (20 мкг/мл) раз. При этом выявленное увеличение в большинстве случаев не отличалось от показателя ЛПС-стимулированного контроля, за исключением активации ПС<sub>1</sub> SS (2 мкг/мл), которая была в 1.3 ниже контроля 2, и ПС<sub>1</sub> SF (20 мкг/мл), превышающей указанный контроль в 1.3 раза.

Таблица 1. Характеристика полисахаридов, выделенных из *S. controversa*, *S. salicifolia* и *S. frolovii* (n=3, p=0.95)

Объект	ПС	Выход, %	Содержание, массовые %								Mw, кДа	Mn, кДа	Mw/Mn
			Нейтральные моносахариды						UA	Белок			
			Rha	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal					
SC	ПС <sub>1</sub>	1.93±0.35	1.65	12.47	2.32	0.67	1.74	21.60	59.54±0.35	–*	448.1	13.2	33.9
	ПС <sub>2</sub>	0.74±0.16	0.28	1.87	0.74	1.67	0.83	4.18	64.20±0.59	26.22±0.68	101.82	10.27	9.9
SS	ПС <sub>1</sub>	1.17±0.31	5.86	21.76	4.79	2.43	9.28	34.62	21.23±0.71	–*	158.49	13.37	11.9
	ПС <sub>2</sub>	0.61±0.18	1.67	10.02	6.85	2.83	6.68	30.56	39.16±0.83	2.22±0.22	94.60	6.51	14.5
SF	ПС <sub>1</sub>	1.44±0.27	2.53	16.95	3.94	0.73	3.49	19.97	52.39±0.61	–*	64.03	9.94	6.4
	ПС <sub>2</sub>	0.66±0.11	2.43	16.95	3.33	1.38	10.03	19.84	27.61±0.47	18.41±0.64	225.42	7.55	29.9

Примечание: \* Не обнаружено при использовании данного метода.

Таблица 2. Влияние различных концентраций ПС, выделенных из *S. controversa*, *S. salicifolia* и *S. frolovii*, на пролиферацию перитонеальных макрофагов интактных мышей линии C57/BL6 и продукцию ими оксида азота, (X±m)

Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Концентрация нитритов, мкМ	Пролиферация, у.е. оптической плотности
Интактный контроль 1 (МФ+среда)	–	2.03±0.08	387±7
Стимулированный контроль 2 (МФ+ЛПС)	1	19.00±0.37*♦	371±4
МДП	30	2.98±0.25*●	394±10
ПС <sub>1</sub> SC	2	17.06±0.35*♦	367±4
	20	17.76±0.27*♦	314±5*●
Интактный контроль 1 (МФ+среда)	–	3.68±0.35	392±12
Стимулированный контроль 2 (МФ+ЛПС)	1	24.17±0.76*♦	366±14
МДП	30	5.30±0.34*	389±14
ПС <sub>2</sub> SC	2	20.17±0.66*●♦	344±12
	20	26.99±0.57*♦	362±12
ПС <sub>1</sub> SS	2	17.87±0.38*●♦	355±14
	20	24.79±0.83*♦	367±7
ПС <sub>2</sub> SS	2	26.28±0.93*♦	355±10
	20	25.89±0.43*♦	370±5
ПС <sub>1</sub> SF	2	24.83±0.41*♦	355±19
	20	31.14±0.56*●♦	368±13
ПС <sub>2</sub> SF	2	30.07±0.45*●♦	361±14
	20	28.15±0.47*●♦	354±9

Примечание: \* различия с контролем 1 достоверны p<0.001; ● различия с контролем 2 достоверны p<0.001; ♦ различия с референтным препаратом (МДП) достоверны p<0.001. n=5.

ПС<sub>2</sub>, полученные экстракцией водой при температуре 70 °С, также вызывали увеличение активности индуцибельной NO-синтазы: ПС<sub>2</sub> SC в 5.5 и 7.3 раза, ПС<sub>2</sub> SS в 7.1 и 7 раз, ПС<sub>2</sub> SF в 8.2 и 7.6 раз в концентрациях 2 мкг/мл и 20 мкг/мл, соответственно. При этом активирующие свойства ПС<sub>2</sub> SS (2 мкг/мл) были в 1.3 раза ниже митогенстимулированного контроля, а ПС<sub>1</sub> SF в обеих концентрациях в 1.2 раза превышали показатели контроля 2. Выявленное стимулирующее действие ЛПС и исследованных ПС рода *Saussurea* в обеих тестируемых концентрациях достоверно в 3.4–5.9 раз превышало показатель референтного вещества – мурамилдипептида.

Таким образом, выделенные ПС, не проявляя, по большей части, цитотоксических эффектов, значительно усиливали NO-стимулирующую активность макрофагов, наиболее выраженную при тестировании в концентрации 20 мкг/мл.

Известно, что в образцах растительного происхождения как высших, так и низших растений достаточно часто обнаруживаются примеси эндотоксинов, которые являются структурными компонентом внешней мембраны грам-отрицательных бактерий и вызывают пирогенную реакцию организма [20]. Эндотоксины стабильны в широком диапазоне pH и при высокой температуре. Отсутствие примеси эндотоксинов в образцах ПС является основной прогностической характеристикой для разработки на их основе лекарственных препаратов [21].

Наличие примеси эндотоксинов в выделенных ПС определяли с помощью полимиксина В. Инкубация МФ с ЛПС и всеми ПС в концентрации 20 мкг/мл приводила к увеличению активности NO-синтазы, причем стимулирующие свойства изучаемых веществ были в 1.2–1.6 раза выше контроля 2 (табл. 3). Антибиотик не влиял на секреторную активность интактных МФ, но в 6 раз снижал стимулирующие свойства ЛПС и в 1.8 раз МДП с  $31.36 \pm 1.1$  мкМ до  $5.21 \pm 0.21$  мкМ с  $3.09 \pm 0.11$  до  $1.74 \pm 0.13$  мкМ, соответственно. Применение ПС<sub>1</sub> и ПС<sub>2</sub>, выделенных из SC и SF, после обработки полимиксином В к приводило к существенному снижению концентрации оксида азота в супернатанте клеток: в 1.7 раза (ПС<sub>1</sub> SC с  $45.22 \pm 0.60$  до  $26.10 \pm 0.81$  мк), в 7.6 (ПС<sub>2</sub> SC с  $39.87 \pm 1.11$  до  $5.25 \pm 0.16$  мкМ) и 1.7 раза (ПС<sub>2</sub> SF с  $51.55 \pm 0.49$  до  $30.51 \pm 0.64$  мкМ). Выявленное снижение продукции нитритов антигенпрезентирующими клетками при культивировании с ПС<sub>1</sub> SC и ПС<sub>2</sub> SF после обработки блокатором, однако превышало показатели аналогичного стимулированного контроля 2 в 5.0 и 5.9 раз, соответственно, что указывает на наличие нежелательных примесей в образцах. Снижение NO-стимулирующих свойств ПС<sub>2</sub> SC после воздействия антибиотика достигало максимально низких значений, не отличающихся от контроля 2, что свидетельствует о значительной примеси ЛПС в полученном образце, которая полностью обуславливает их активирующие свойства. Предварительная инкубация с полимиксином В ПС<sub>1</sub> SS, ПС<sub>2</sub> SS и ПС<sub>1</sub> SF не влияла на продукцию NO макрофагами, концентрация нитритов не зависимо от обработки блокатором не менялась (контроль 3) и значительно превышала показатель подавленного антибиотиком митогенактивированного контроля 2 в 6.3, 9.5 и 9.0 раз, соответственно, что свидетельствует об отсутствии в этих образцах примеси эндотоксинов. Кроме того, NO-стимулирующие свойства всех ПС, обработанных полимиксином В, были многократно в 3 – 28.9 раз выше таковых при активации МДП.

Таблица 3. Влияние полимиксина В на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами интактных мышей линии C57/BL6, стимулированную ПС, выделенными из *S. controversa*, *S. salicifolia* и *S. frolovii* ( $X \pm m$ )

Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Концентрация нитритов, мкМ	
		без полимиксина В (контроль 3)	с полимиксином В
Интактный контроль 1 (МФ+среда)	–	$1.65 \pm 0.15$	$1.75 \pm 0.06$
Стимулированный контроль 2 (МФ+ЛПС)	0.1	$31.36 \pm 1.10^*$	$5.21 \pm 0.21^* \blacksquare$
МДП	30	$3.09 \pm 0.11^* \bullet$	$1.74 \pm 0.13 \bullet$
ПС <sub>1</sub> SC	20	$45.22 \pm 0.60^* \blacklozenge$	$26.10 \pm 0.81^* \bullet \blacksquare \blacklozenge$
ПС <sub>2</sub> SC	20	$39.87 \pm 1.11^* \bullet \blacklozenge$	$5.25 \pm 0.16^* \blacksquare \blacklozenge$
ПС <sub>1</sub> SS	20	$37.41 \pm 0.28^* \bullet \blacklozenge$	$33.00 \pm 0.27^* \bullet \blacklozenge$
ПС <sub>2</sub> SS	20	$45.34 \pm 0.29^* \bullet \blacklozenge$	$48.90 \pm 0.74^* \bullet \blacklozenge$
ПС <sub>1</sub> SF	20	$50.12 \pm 0.30^* \bullet \blacklozenge$	$49.73 \pm 1.20^* \bullet \blacklozenge$
ПС <sub>2</sub> SF	20	$51.55 \pm 0.49^* \bullet \blacklozenge$	$30.51 \pm 0.64^* \bullet \blacksquare \blacklozenge$

Примечание: \* различия с контролем 1 достоверны  $p < 0.001$ ;  $\bullet$  различия с контролем 2 достоверны  $p < 0.001$ ;  $\blacksquare$  различия с контролем 3 (инкубация с веществами без полимиксина В) достоверны  $p < 0.001$ ;  $\blacklozenge$  различия с референтным препаратом (МДП) достоверны  $p < 0.001$ .  $n=5$ .

### Заключение

В ходе последовательной экстракции водой из наземной части растений рода *Saussurea* выделены полисахариды, обладающие способностью усиливать продукцию оксида азота антигенпрезентирующими клетками. Образцы полисахаридов отличаются моносахаридным составом, молекулярной массой и количеством белковых компонентов. Экстракция из растительного материала водой при 25 °С позволяет получить свободные от белка ПС из *S. salicifolia* (L.) DC и *S. frolovii* Ldb., обладающие NO-стимулирующими свойствами, не зависящими от примеси эндотоксинов. При этом, ПС, выделенные из *S. salicifolia* на обоих этапах экстракции, обладают схожей биологической активностью, а ПС, выделенные из *S. controversa* DC, как при комнатной температуре, так и, в большей степени, при нагревании содержат значительную примесь эндотоксина.

### Выводы

1. Последовательной экстракцией водой при комнатной температуре и при нагревании из сосюреи спорной, сосюреи иволистной и сосюреи Фролова получены образцы полисахаридов, отличающиеся моносакхаридным составом, молекулярной массой и количеством белковых компонентов.

2. Полученные полисахариды содержат в качестве доминирующих компонентов остатки уроновых кислот (до 64%), галактозы (до 35%) и арабинозы (до 22%). Остатки глюкозы, рамнозы, ксилозы и маннозы являются минорными компонентами большинства полученных полисахаридов.

3. Экстракцией водой при комнатной температуре из исследованных видов сосюреи получены свободные от белка полисахариды. Полисахариды, полученные на этапе экстракции водой при нагревании, содержат до 26% белка.

4. Свободные от белка и примеси эндотоксинов полисахариды, выделенные водой без нагревания из сосюреи иволистной и сосюреи Фролова, обладают прямым NO-активирующим действием на антигенпрезентирующие клетки, значительно превышающим аналогичный эффект мурамилдипептида и, таким образом, являются перспективными объектами для дальнейшего исследования химического состава и биологической активности.

### Список литературы

1. Shi L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review // International Journal of Biological Macromolecules. 2016. Vol. 92. Pp. 37–48. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.100.
2. Полле А.Я., Оводова Р.Г., Попов С.В. Выделение и общая характеристика полисахаридов из пижмы обыкновенной, мать-и-мачехи и лопуха войлочного // Химия растительного сырья. 1999. №1. С. 33–38.
3. Sánchez-Ramos M., Bahena S., Romero-Estrada A., Bernabé-Antonio A., Cruz-Sosa F., González-Christen J., Acevedo-Fernández J., Perea-Arango I., Alvarez L. Establishment and phytochemical analysis of a Callus Culture from *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) and its anti-inflammatory activity // Molecules. 2018. Vol. 23. Pp. 1–14. DOI: 10.3390/molecules23061258.
4. Nie C., Zhu P., Ma S., Wang M., Hu Y. Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce // Carbohydrate Polymers. 2018. Vol. 188. Pp. 236–242. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.02.009.
5. Qu H., Yang W., Li J. Structural characterization of a polysaccharide from the flower buds of *Tussilago farfara*, and its effect on proliferation and apoptosis of A549 human non-small lung cancer cell line // International Journal of Biological Macromolecules. 2018. Vol. 113. Pp. 849–858. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.005.
6. Guang Y., Keke L., Cui L., Peipei P., Mei B., Jiaqi S., Qingling L., Zhuohong Y., Yuesheng Y., Hong W.A. Comparison of the immunostimulatory effects of polysaccharides from tetraploid and diploid *Echinacea purpurea* // BioMed Research International. 2018. Vol. 2018. Pp. 1–12. DOI: 10.1155/2018/8628531.
7. Lingyun Y., Qingsheng Z., Jie X., Jian S., Xiaofan Y., Bing Z., Huiming S., Shengming N. Composition and antioxidant activity of the polysaccharides from cultivated *Saussurea involucreata* // International Journal of Biological Macromolecules. 2012. Vol. 50. Pp. 849–853. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.11.012.
8. Wenbo C., Juanjuan M., Fan G., Hongru X., Qiping Z., Xiaofeng L., Fashan W., Hui W., Furao L. Two novel polysaccharides from the torus of *Saussurea laniceps* protect against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes // Carbohydrate Polymers. 2018. Vol. 200. Pp. 446–455. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.08.007.
9. 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. С. 205–214. DOI: 10.14258/jcprm.2018043710.
10. Ji X., Han L., Liu F., Yin S., Peng Q., Wang M. A mini-review of isolation, chemical properties and bioactivities of polysaccharides from buckwheat (*Fagopyrum Mill*) // Int. J. Biol. Macromol. 2019. Vol. 127. Pp. 204–209. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.043.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Li X., Zhao R., Zhou H.L., Wu D.H. Deproteinization of polysaccharide from the *Stigma Maydis* by Sevag Method // Advanced Materials Research. 2012. Vol. 340. Pp. 416–420. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.340.416.
15. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. М., 2015. 1003 с.
16. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. Vol. 28. Pp. 350–356. DOI: 10.1021/ac60111a017.

17. Rovkina K.I., Krivoshchekov S.V., Guryev A.M., Yusubov M.S., Belousov M.V. Water-Soluble Polysaccharides of Alfalfa (*Medicago sativa* (Fabaceae)) of Flora of Krasnoyarsk Krai // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2018. Vol. 44. N7. Pp. 854–859. DOI: 10.1134/S1068162018070105.
18. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper, P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids // Analytical Biochemistry. 1982. Vol. 126. Pp. 131–138. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-X.
19. 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.
20. Fung F.M., Su M., Feng H.T., Li S.F.Y. Extraction, separation and characterization of endotoxins in water samples using solid phase extraction and capillary electrophoresis-laserinduced fluorescence // Scientific reports. 2017. Vol. 7. Pp. 1–10. DOI: 10.1038/s41598-017-11232-x.
21. Morrison D.C., Ryan J.L. Endotoxins and disease mechanisms // Annual Review of Medicine. 1987. Vol. 38. Pp. 417–432. DOI: 10.1146/annurev.me.38.020187.002221.

Поступила в редакцию 22 апреля 2019 г.

После переработки 13 июня 2019 г.

Принята к публикации 17 сентября 2019 г.

**Для цитирования:** 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.

*Reshetov Ya.Ye.*<sup>1,4</sup>, *Ligachova A.A.*<sup>2</sup>, *Avdeyeva Ye.Yu.*<sup>1</sup>, *Danilets M.G.*<sup>2</sup>, *Golovchenko V.V.*<sup>3</sup>, *Trofimova Ye.S.*<sup>2</sup>, *Gulina Ye.I.*<sup>1</sup>, *Sherstoboyev Ye.Yu.*<sup>2</sup>, *Gur'yev A.M.*<sup>1,4</sup>, *Rovkina K.I.*<sup>1,4\*</sup>, *Krivoshchekov S.V.*<sup>1</sup>, *Belousov M.V.*<sup>1,4</sup> POLYSACCHARIDES OF THREE SAUSSUREA DC SPECIES (*S. CONTROVERSA*, *S. SALICIFOLIA*, *S. FROLOVIA*): ISOLATION, CHARACTERIZATION AND INFLUENCE ON NO-PRODUCING PROPERTIES OF MACROPHAGES

<sup>1</sup> Siberian State Medical University, Moskovskiy trakt, 2, Tomsk, 634050 (Russia), e-mail: rki91@bk.ru

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

<sup>3</sup> Institute of Physiology, Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Pervomayskaya, 50, Syktyvkar, 167982 (Russia)

<sup>4</sup> National Research Tomsk Polytechnic University, pr. Lenina, 30, Tomsk, 634050 (Russia)

Polysaccharides PS<sub>1</sub> and PS<sub>2</sub> with a yield 1–2% were obtained from the above-ground part of three species of *Saussurea*: *S. controversa* DC., *S. salicifolia* L. and *S. frolovii* Ledeb. sequential extraction with water at 25 and 70 °C. PS<sub>1</sub> free from protein impurities. A protein that is not removed by the Sevag method is co-extracted with PS<sub>2</sub>. All polysaccharides contain residues of uronic acids, the highest content found in PS<sub>1</sub> and PS<sub>2</sub> from *S. controversa*. The molecular weights (Mw) of PS<sub>1</sub> from *S. controversa*, *S. salicifolia* and *S. frolovii* were 448.13, 158.49, 64.03 kDa and PS<sub>2</sub> – 101.82, 94.60, 225.42 kDa, respectively. Interspecific differences in the monosaccharide composition of polysaccharides were revealed. Galactose (Gal) and Arabinose (Ara) residues are major, and Rhamnose (Rha), Xylose (Xyl) and Mannose (Man) residues are minor components of the carbohydrate chains isolated by PS. PS<sub>1</sub> *S. salicifolia* and *S. frolovii* and PS<sub>2</sub> *S. salicifolia* do not contain endotoxins impurities and have a NO-activating effect on antigen-presenting cells (macrophages), significantly exceeding the effect of muramyl dipeptide.

**Keywords:** Asteraceae, *Saussurea* DC, polysaccharides, monosaccharide composition, molecular weight, endotoxin, macrophages, nitric oxide.

\* Corresponding author.

**References**

1. Shi L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, vol. 92, pp. 37–48, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.100.
2. Polle A.Ya., Ovodova R.G., Popov S.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 1999, no. 1, pp. 33–38. (in Russ.).
3. Sánchez-Ramos M., Bahena S., Romero-Estrada A., Bernabé-Antonio A., Cruz-Sosa F., González-Christen J., Acevedo-Fernández J., Perea-Arango I., Alvarez L. *Molecules*, 2018, vol. 23, pp. 1–14, DOI: 10.3390/molecules23061258.
4. Nie C., Zhu P., Ma S., Wang M., Hu Y. *Carbohydrate Polymers*, 2018, vol. 188, pp. 236–242, DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.02.009.
5. Qu H., Yang W., Li J. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, vol. 113, pp. 849–858, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.005.
6. Guang Y., Keke L., Cui L., Peipei P., Mei B., Jiaqi S., Qingling L., Zhuohong Y., Yuesheng Y., Hong W.A. *BioMed Research International*, 2018, vol. 2018, pp. 1–12. DOI: 10.1155/2018/8628531.
7. Lingyun Y., Qingsheng Z., Jie X., Jian S., Xiaofan Y., Bing Z., Huiming S., Shengming N. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, vol. 50, pp. 849–853, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.11.012.
8. Wenbo C., Juanjuan M., Fan G., Hongru X., Qiping Z., Xiaofeng L., Fashan W., Hui W., Furoo L. *Carbohydrate Polymers*, 2018, vol. 200, pp. 446–455, DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.08.007.
9. 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.).
10. Ji X., Han L., Liu F., Yin S., Peng Q., Wang M. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, vol. 127, pp. 204–209, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.043.
11. 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.
12. Ibiza S., Serrador J.M. *Inmunologia*, 2008, vol. 27, pp. 103–117. DOI: 10.1016/S0213-9626(08)70058-1.
13. 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.
14. Li X., Zhao R., Zhou H.L., Wu D.H. *Advanced Materials Research*, 2012, vol. 340, pp. 416–420, DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.340.416.
15. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XIII izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII ed.]. Moscow, 2015, 1003 p. (in Russ.).
16. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P. A., Smith F. *Anal. Chem*, 1956, vol. 28, pp. 350–356. DOI: 10.1021/ac60111a017.
17. Rovkina K.I., Krivoshechekov S.V., Guryev A.M., Yusubov M.S., Belousov M.V. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2018, vol. 44, no. 7, pp. 854–859, DOI: 10.1134/S1068162018070105.
18. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper, P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. *Analytical Biochemistry*, 1982, vol. 126, pp. 131–138, DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-X.
19. Mosmann T.R., Coffman R.L. *Annu. Rev. Immunol.*, 1989, vol. 7, pp. 145–173.
20. Fung F.M., Su M., Feng H.T., Li S.F.Y. *Scientific reports*, 2017, vol. 7, pp. 1–10, DOI: 10.1038/s41598-017-11232-x.
21. Morrison D.C., Ryan J.L. *Annual Review of Medicine*, 1987, vol. 38, pp. 417–432, DOI: 10.1146/annurev.me.38.020187.002221.

Received April 22, 2019

Revised June 13, 2019

Accepted September 17, 2019

**For citing:** 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. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2019045483.

