

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ НА Th1-ЗАВИСИМЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ (СКРИНИНГОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)³

М. Г. Данилец¹, Ю. П. Бельский¹, А. М. Гурьев², М. В. Белоусов²,
Н. В. Бельская¹, Е. С. Трофимова¹, Е. Г. Учасова¹, Р. Р. Ахмеджанов²,
А. А. Лигачева¹, М. С. Юсубов², В. И. Агафонов¹

В работе изучено действие водорастворимых полисахаридов, полученных из листьев мать-и-мачехи обыкновенной (*Tussilago farfara* L.), листьев березы повислой (*Betula verrucosa* Ehrh.), цветов календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.), корневища айра болотного (*Acorus calamus* L.), корневища девясила высокого (*Inula helenium* L.), из надземной части клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), из надземной части полыни горькой (*Artemisia absinthium* L.), на Th1-зависимый иммунный ответ, вызванный введением эритроцитов барана, а также продукцию окиси азота перитонеальными макрофагами *in vitro*. Показано, что все исследованные вещества усиливают Th1 иммунный ответ, при этом полисахариды березы не влияют на синтез NO, полисахариды мать-и-мачехи и айра *in vitro* стимулируют NO-синтазу сопоставимо с ЛПС, а полисахариды девясила, календулы, клевера и полыни активируют её в меньшей степени, чем ЛПС.

Ключевые слова: макрофаги, водорастворимые полисахариды, окись азота

ВВЕДЕНИЕ

Недостаточная либо избыточная поляризация Т-хелперов (Th) лежит в основе иммунопатогенеза аутоиммунных, аллергических, хронических инфекционных и онкологических заболеваний. Поиск веществ, способных регулировать баланс Th1/Th2, является одной из ключевых задач современной иммунофармакологии. Известно, что поляризация лимфоцитов зависит от функционального состояния антигенпрезентирующей клетки, среди которых макрофаги занимают особое место: обеспечивают защиту организма от микробной инвазии на ее начальной стадии, а также создают условия для развития иммунного ответа, представляя антиген и создавая фон цитокинов, способствующий направлению поляризации в тот или иной тип. Показано, что маркерной чертой классически активированных макрофагов является выработка ими окиси азота и других провоспалительных медиаторов [8, 10, 12], что позволяет им способствовать Th1 иммунному ответу.

Известно, что полисахариды (ПС) способны непосредственно взаимодействовать с макрофагами [11, 15, 16]. ПС могут связываться практически с любыми рецепторами макрофага [14], в результате чего эти клетки могут приобрести как провоспалительные, так и противо-

воспалительные свойства, а, следовательно, стимулировать или подавлять Th1 тип иммунного ответа [5, 13].

Исходя из этих предпосылок, мы провели скрининговое исследование с целью выявить полисахариды, способные воздействовать на функциональное состояние макрофагов и влиять на Th1-зависимый иммунный ответ. Были использованы ПС, которые обладали одним общим свойством — растворимостью в воде, но отличались по другим характеристикам, что достигалось использованием для их получения различного сырья.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 200 мышах линии BALB/c (масса тела 19–20 г, возраст 8 недель, 1 категории согласно сертификату), полученных из питомника ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН. Мышей содержали в неполной барьерной системе на стандартной диете (гранулированный корм). Умерщвление проводили под эфирным наркозом.

Водорастворимые ПС были выделены из фармакопейного сырья: листьев мать-и-мачехи обыкновенной (*Tussilago farfara* L.), листьев березы повислой (*Betula verrucosa* Ehrh.), цветов календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.), корневища айра болотного (*Acorus calamus* L.), корневища девясила высокого (*Inula helenium* L.), из надземной части клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), из надземной части полыни горькой (*Artemisia absinthium* L.) на кафедре химии СибГМУ по стандартной методике [2]. Полученные образцы ПС были стандартизованы по содержанию углеводов [7], белка [6] и нуклеиновых кислот [3]. Компонентный состав и молекулярно-массовое

¹ Отдел биомоделей (зав. — проф. В. И. Агафонов) НИИ фармакологии СО РАМН, Томск, 634028, пр. Ленина, 3.

² Кафедра химии (зав. — проф. М. С. Юсубов) ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, Томск, 634050, Московский тракт, 2.

³ Работа выполнена при поддержке РФФИ и Администрации Томской области (грант РФФИ-офи, конкурс 2006 г., № 06-04-96968).

распределение (ММР) исследуемых образцов определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1100 со спектрофотометрическим детектором (детекция при длине волны 190 нм), разделение проводили на эксклюзионной колонке TSK-gel GMPXL 300 × 7,8 mm (“Supelco”), подвижная фаза — вода, 1 мл/мин. Молекулярную массу ПС, входящих в состав исследуемых образцов, определяли по времени удерживания в соответствии с калибровочными значениями, определенными по стандартным образцам декстранов с молекулярной массой 15 – 20 кДа, 40 кДа, 60 – 90 кДа, 110 кДа, 250 кДа и 500 кДа (“Sigma-Aldrich”).

Об активности NO-синтазы макрофагов судили по концентрации нитритов. Для получения макрофагов брюшную полость интактных мышей промывали холодным изотоническим раствором NaCl, клетки осаждали, ресуспендировали в среде (RPMI 1640 (ГНЦ ВБ “Вектор”), 10 % ЭТС (“HyClone”), 20 мМ HEPES (“Sigma”), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола (“Sigma”), 50 мкг/мл гентамицина (“Sigma”) и 2 мМ L-глутамина (“Sigma”)) и культивировали 2 ч (5 % CO₂) в пластиковых чашках Петри. Собирали только прилипшие к пластику клетки и помещали в плоскодонные 96-луночные планшеты, после культивирования 1 и 2 суток в надосадке измеряли количество нитритов при помощи реактива Грейса. В экспериментах был использован липополисахарид (ЛПС) серотипа O111:B4 (“Sigma”).

Для изучения возможной примеси эндотоксина в исследуемых образцах ПС в 96-луночный планшет помещали образцы и полимиксин В (“InvivoGen”, США), после культивирования 1 ч (37 °C, 5 % CO₂) в лунки добавляли суспензию макрофагов (2,5 – 3 × 10⁶ клеток/мл), культивировали 48 ч и определяли концентрацию нитритов в надосадке. Концентрация полимиксина В была подобрана в предварительных экспериментах — 10 мкг/мл. В качестве контроля использовали ЛПС (серотип O111:B4, “Sigma”).

Th1-зависимый иммунный ответ вызывали парентеральным введением эритроцитов барана [9; 17]. Оптимальная суточная доза ПС (10 мг/кг массы тела) была подобрана в предварительных экспериментах. Полисахариды (для контрольной группы — изотонический раствор NaCl) вводили внутривентриально 1 раз в сутки, начиная за 5 дней до иммунизации эритроцитами барана (ЭБ), всего 10 дней. Спустя 5 дней после иммунизации забирали материал для исследования. Число АОК, титр антител

и величину реакции ГЗТ исследовали традиционно [4]. Для определения числа АОК лимфоциты получали из селезенки, для определения титра антител к антигенам ЭБ сыворотку получали из крови, взятой из сердца, реакцию ГЗТ вызывали через 5 суток после иммунизации.

Статистическую обработку проводили при помощи t-критерия Стьюдента. Различия показателей считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из табл. 1, исследуемые образцы содержали значительное количество полисахаридов от 97,8 % до 99,8 %. Наибольшее число примесей белка было обнаружено в образцах ПС календулы (1,68 %), девясила (1,04 %), берёзы (0,89 %) и полыни (0,61 %). Наибольшая примесь нуклеиновых кислот выявлена в образцах ПС календулы (0,165 %), в остальных образцах их содержание не превышало 0,1 %. На спектре ВЭЖХ образцов, полученных из аира, присутствует 5 пиков, соответствующих молекулярным массам 720, 460, 370, 290 и 40 кДа (а); из мать-и-мачехи — 2 пика, соответствующих Мм 690 и 350 кДа (б); из листьев берёзы — 3 пика, соответствующих Мм 680, 260 и 170 кДа (с), из клевера — 2 пика, соответствующих Мм 700 и 320 кДа (д), из девясила — 2 пика, соответствующих Мм 540 и 390 кДа (е), из календулы — 2 пика, соответствующих Мм 490 и 310 кДа (ф), из полыни — 2 пика, соответствующих Мм 510 и 305 кДа (г).

Курсовое введение исследуемых веществ приводило к достоверному увеличению числа АОК (табл. 2) у мышей, получавших ПС березы (в 2,8 раза), мать-и-мачехи (в 2,1 раза), календулы (2,9 раза), аира (2,7 раза), клевера (2,2 раза), полыни (3,4 раза). Кроме того, наблюдалось усиление синтеза антител, вырабатываемых В-лимфоцитами в ответ на ЭБ, при введении ПС березы и мать-и-мачехи. ПС девясила хотя и не влияли на число АОК, но увеличивали количество синтезируемых антител. ПС клевера и полыни не влияли на данный показатель. Курсовое введение ПС усиливало реакцию ГЗТ (табл. 2) — её индекс почти в 2 раза повышался у мышей, получавших ПС березы, мать-и-мачехи и аира, в 1,6 – 1,7 после введения ПС девясила, полыни и клевера. ПС календулы не влияли на данный показатель.

Ранее мы установили, что продукция лимфоцитами интерферона- γ и ИЛ-2 (ключевых цитокинов Th1 типа) при иммунизации ЭБ возрастает [1], что свидетельствует о развитии Th1-зависимого иммунного ответа и согласо-

Таблица 1. Характеристика исследуемых образцов полисахаридов, ПС ($X \pm m$)

Полисахарид (ПС)	Выход ПС (% от массы воздушно-сухого сырья)	Содержание в образцах, %		
		углеводов	белка	нуклеиновых кислот
ПС аира	3,68 ± 1,06	99,8 ± 3,22	0,12 ± 0,02	0,062 ± 0,012
ПС мать-и-мачехи	2,89 ± 0,17	97,9 ± 2,26	0,21 ± 0,06	0,021 ± 0,003
ПС берёзы	2,52 ± 0,66	98,6 ± 4,09	0,89 ± 0,04	0,030 ± 0,006
ПС клевера	2,77 ± 1,39	98,4 ± 1,05	0,15 ± 0,02	0,042 ± 0,010
ПС девясила	2,97 ± 1,14	95,6 ± 4,43	1,04 ± 0,12	0,077 ± 0,009
ПС календулы	1,48 ± 0,19	97,8 ± 1,06	1,68 ± 0,26	0,165 ± 0,024
ПС полыни	1,07 ± 0,19	99,0 ± 1,06	0,61 ± 0,11	0,059 ± 0,002

ется с данными других авторов [9, 17]. В этой связи следует считать, что исследованные нами вещества обладали способностью стимулировать Th1-зависимый иммунный ответ.

В предварительных экспериментах *in vitro* с использованием широкого диапазона доз ПС (2,5 – 1000 мкг/мл) мы установили, что оптимальными концентрациями являются 10 и 20 мкг/мл. Применение выбранных концентраций ПС для оценки их действия на макрофаги в экспериментах *in vitro* показало, что по действию на уровень активности NO-синтазы макрофагов исследуемые вещества можно разделить на три группы (табл. 3): 1 — ПС мать-и-мачехи и аира по своему активирующему действию не уступали ЛПС; 2 – ПС девясила, календулы, кле-

вера и полыни активировали NO-синтазу, но слабее, чем ЛПС; 3 — ПС березы не обладали способностью стимулировать синтез NO.

Поскольку стимуляция продукции окиси азота могла быть следствием присутствия в образцах ПС примеси эндотоксина, были проведены эксперименты с полимиксином В. Как видно из табл. 4, полимиксин В не влиял на спонтанный уровень продукции окиси азота, но значительно снижал его выработку ЛПС-стимулированными макрофагами. В присутствии всех изученных образцов ПС добавление полимиксина В не меняло уровень продукции NO. Полученные результаты показали, что активирующее макрофаги влияние оказывают сами полисахариды, примеси эндотоксина в образцах нет.

Таблица 2. Влияние водорастворимых растительных полисахаридов на иммунологические показатели ($X \pm m$)

Полисахарид (ПС)	Группа	Число АОК (10^3 /селезенку)	Титр гемагглютининов (\log_2)	Индекс реакции ГЗТ, %
ПС аира	Контроль	22,3 ± 8,5	10,3 ± 1,3	9,9 ± 1,7
	Опыт	60,7 ± 5,0*	9,0 ± 0,7	19,4 ± 2,9*
ПС мать-и-мачехи	Контроль	36,7 ± 6,0	5,5 ± 0,5	9,9 ± 1,7
	Опыт	77,1 ± 8,2*	7,5 ± 0,7*	20,4 ± 2,8*
ПС березы	Контроль	36,7 ± 6,0	5,5 ± 0,5	9,9 ± 1,7
	Опыт	82,9 ± 7,6*	7,7 ± 0,4*	17,8 ± 3,8*
ПС календулы	Контроль	22,3 ± 8,5	10,3 ± 1,3	9,9 ± 1,7
	Опыт	64,3 ± 12,3*	8,5 ± 0,5	11,5 ± 2,7
ПС девясила	Контроль	36,7 ± 6,0	5,5 ± 0,5	9,9 ± 1,7
	Опыт	35,7 ± 5,7	6,8 ± 0,3*	17,3 ± 3,0*
ПС клевера	Контроль	57,2 ± 15,3	10,3 ± 1,3	14,7 ± 2,4
	Опыт	125,9 ± 19,3*	7,7 ± 1,4	24,4 ± 2,5*
ПС полыни	Контроль	23,6 ± 7,9	10,3 ± 1,3	14,7 ± 2,4
	Опыт	80,0 ± 11,2*	9,0 ± 0,7	23,7 ± 2,2*

Примечание.* — различия показателей значимы, $p < 0,05$.

Таблица 3. Влияние различных концентраций водорастворимых растительных полисахаридов (ПС) и ЛПС на продукцию NO (содержание нитритов, мкМ) перитонеальными макрофагами при их культивировании 24 и 48 ч ($X \pm m$)

Полисахарид	Концентрация ПС, мкг/мл	Контроль 1	Контроль 2	Опыт
ПС аира	10	18,9 ± 0,8	22,8 ± 0,9*	22,6 ± 1,0*
	20			25,1 ± 2,0*
ПС мать-и-мачехи	10	46,5 ± 1,7	53,9 ± 1,8*	53,0 ± 2,2*
	20			52,0 ± 1,6*
ПС березы	10	12,6 ± 0,5	35,5 ± 1,5*	14,1 ± 0,7
	20			11,1 ± 0,6
ПС календулы	10	12,6 ± 0,5	35,5 ± 1,5*	13,6 ± 0,7 [#]
	20			14,6 ± 0,4* [#]
ПС девясила	10	4,2 ± 0,2	10,0 ± 0,5*	5,1 ± 0,1* [#]
	20			4,4 ± 0,1 [#]
ПС клевера	10	5,0 ± 0,4	27,8 ± 0,9	9,5 ± 0,1*
	20			10,9 ± 0,4*
ПС полыни	10	5,0 ± 0,4	27,8 ± 0,9	6,7 ± 0,2*
	20			6,7 ± 0,6*

Примечание: Контроль 1 — клетки, культивированные в отсутствие каких-либо веществ; контроль 2 — клетки, культивированные в присутствии 1 мкг/мл ЛПС. Здесь и в табл. 4 различия показателей значимы, $p < 0,05$: * — с контролем 1, [#] — с контролем 2.

Таблица 4. Действие водорастворимых растительных полисахаридов и ЛПС в присутствии полимиксина В на продукцию окиси азота (концентрация нитритов, мкМ) перитонеальными макрофагами интактных мышей ($X \pm m$)

Исследуемое вещество	Условия культивирования	
	без полимиксина В (контроль 2)	+ полимиксин В (опыт)
- (контроль-1)	6,3 ± 0,8	6,4 ± 0,4
ЛПС (0,5 мкг/мл)	17,1 ± 0,7*	12,1 ± 1,3 ^{#*}
ЛПС (1 мкг/мл)	16,9 ± 0,5*	14,2 ± 0,9 ^{#*}
ПС мать-и-мачехи	13,2 ± 0,3*	13,0 ± 0,3*
ПС аира	14,0 ± 0,7*	13,5 ± 0,5*
ПС календулы	11,1 ± 0,9*	10,3 ± 1,2*
ПС полыни	11,6 ± 0,4*	12,0 ± 1,5*
ПС клевера	13,8 ± 0,7*	14,5 ± 1,8*
ПС девясила	10,9 ± 1,2*	11,6 ± 1,0*

При сопоставлении данных, полученных в экспериментах *in vivo* и *in vitro*, обращает на себя внимание, что ПС, показавшие себя как эффективные стимуляторы синтеза окиси азота, проявляли также и способность стимулировать Th1 тип иммунного ответа. Эти данные полностью согласуются со сложившимся к настоящему времени представлением о взаимосвязи между путем активации макрофагов и типом поддерживаемого ими иммунного ответа [8, 10]. Только в случае с ПС березы выявилось несоответствие между стимулирующим Th1-зависимый иммунный ответ действием ПС березы при отсутствии влияния на продукцию окиси азота макрофагами.

Проведенный скрининг показал, что все семь исследованных образцов водорастворимых полисахаридов способны стимулировать Th1 тип иммунологических реакций, что послужит основанием для дальнейшей идентификации основного действующего начала. Полученные результаты позволяют рассматривать эти вещества в качестве перспективных кандидатов на роль новых иммуномодулирующих средств для терапии хронических, вялотекущих инфекционно-воспалительных и онкологических заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Водорастворимые полисахариды, полученные из листьев мать-и-мачехи, листьев березы, цветов календулы, корневища аира болотного, корневища девясила, надземной части клевера и надземной части полыни, стимулируют Th1-зависимый иммунный ответ.

2. Водорастворимые полисахариды, полученные из листьев мать-и-мачехи, корневища аира болотного, корневища девясила, цветов календулы, надземной части клевера и надземной части полыни, активируют NO-синтазу макрофагов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. В. Бельская, Ю. П. Бельский, М. Г. Данилец и др., *Бюл. экспер. биол.*, Прил. 1, 61 – 64 (2005).
2. *Методы исследования углеводов*, Р. Харлин (ред.), Мир, Москва (1975).
3. А. С. Спиринов, *Биохимия*, **23**(вып. 5), 656 – 661 (1958).
4. Р. М. Хаитов, И. С. Гущин, Б. В. Пинегин, А. И. Зебрев, *Вестник Фармакологического комитета*, № 1, 31 – 36 (1999).
5. G. M. Almeida, R. M. Andrade, and C. M. Bento, *J. Immunol.*, **167**, 5845 – 5851 (2001).
6. M. M. Bradford, *Analyt. Biochem.*, **72**, 248 – 254 (1976).
7. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, et al., *Anal. Chem.*, **28**(3), 350 – 356 (1956).
8. S. Goerdts and C. E. Orfanos, *Immunity*, **10**, 137 – 141 (1999).
9. L. Li, J. F. Elliott, and T. R. Mosmann, *J. Immunol.*, **153**, 3967 – 3978 (1994).
10. C. D. Mills, K. Kincaid, J. M. Alt, et al., *J. Immunol.*, **164**(12), 6166 – 6173 (2000).
11. C. Monari, C. Retini, A. Casadevall, et al., *Eur. J. Immunol.*, **33**, 1041 – 1047 (2003).
12. D. M. Mosser, *J. Leukocyte Biol.*, **73**, 209 – 212 (2003).
13. K. Saito, T. Yajima, H. Nishimura, et al., *J. Biol. Chem.*, **278**, 38571 – 38578 (2003).
14. I. A. Schepetkin and M. T. Quinn, *Int. Immunopharmacol.*, **6**(3), 317 – 333 (2006).
15. F. Stingeles, B. Corthesy, N. Kusy, et al., *J. Immunol.*, **172**, 1483 – 1490 (2004).
16. A. Vecchiarelli, D. Pietrella, P. Lupo, et al., *J. Leukocyte Biol.*, **74**, 370 – 374 (2003).
17. H. Yokozeki, M. Ghoreishi, S. Takagawa, et al., *J. Exp. Med.*, **191** (№ 6), 995 – 1004 (2000).

Поступила 06.08.09

EFFECT OF PLANT POLYSACCHARIDES ON TH1-DEPENDENT IMMUNE RESPONSE: SCREENING INVESTIGATION

M. G. Danilets¹, Yu. P. Bel'skii¹, A. M. Gur'ev², M. V. Belousov², N. V. Bel'skaya¹, E. S. Trofimova¹, E. G. Uchasova¹, R. R. Akhmedzhanov², A. A. Ligacheva¹, M. S. Yusubov², and V. I. Agafonov¹

¹ Institute of Pharmacology, Tomsk Scientific Center, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, pr. Lenina 3, Tomsk, 634028, Russia

² Department of Pharmacology, Siberian State Medical University, Moskovskii trakt 2, Tomsk, 634050, Russia

We have studied the influence of water-soluble polysaccharides isolated from *Tussilago farfara* L. leaves, *Betula verrucosa* Ehrh. leaves, *Calendula officinalis* L. flowers, *Acorus calamus* rhizomes, *Inula helenium* L. rhizomes, overground part of *Trifolium pretense* L., and overground part of *Artemisia absinthium* L., on Th1 immune response induced by sheep red blood cells and on NO production by murine peritoneal macrophages *in vitro*. All the investigated polysaccharides have stimulated a Th1 response. Polysaccharides isolated from *Betula verrucosa* leaves did not influence NO synthesis, while polysaccharides of *Tussilago farfara* leaves and *Acorus calamus* rhizomes stimulated NO synthase of murine macrophages on a level comparable with that of lipopolysaccharides (LPS). Polysaccharides from *Inula helenium* rhizomes, *Calendula officinalis* flowers, and overground parts of *Trifolium pretense* and *Artemisia absinthium* also stimulated NO production, but to a lower extent in comparison to LPS.

Key words: Macrophages, water-soluble polysaccharides, Th1 response, nitric oxide