

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
М.В.ЛОМОНОСОВА»
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Генералов Евгений Александрович

**БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИМЕДИЦИНСКОГО
ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ КЛУБНЕНОСНЫХ
РАСТЕНИЙ**

1.5.4. БИОХИМИЯ

**ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора химических наук**

Научный консультант:
доктор химических наук, профессор
Синицын Аркадий Пантелеймонович

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1	15
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. СТРУКТУРЫ УГЛЕВОДОВ	17
1.2. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ УГЛЕВОДОВ	22
1.3. РЕЦЕПТОР-ОПОСРЕДОВАННАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ УГЛЕВОДОВ..	39
1.3.1. Лектины R-типа (RTL)	42
1.3.2. Лектин-подобные рецепторы C-типа (CTLR).....	42
1.3.2.1. Dectin-1	43
1.3.2. Dectin-2	46
1.3.5. Dectin-3	47
1.3.6. Mincle.....	48
1.3.7. Антиген 2 дендритных клеток крови (BDCA2).....	49
1.3.8. DC-SIGN	50
1.3.9. CLEC9A	51
1.3.10. Маннозные рецепторы (MR)	52
1.3.11. Endo180.....	53
1.3.12. Галактозоподобный лектин макрофагов человека (MGL)	54
1.3.13. Лангерин.....	55
1.3.14. Толл-подобные рецепторы (TLR)	56
1.3.15. Nod-подобные рецепторы (NLR)	59
1.3.16. Рецепторы-мусорщики (SR)	61
1.3.17. Рецептор лактозилцерамида (LacCer).....	63
1.3.18. Рецепторы системы комплемента (CR).....	64
ГЛАВА 2	69
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	69
2.1. МАТЕРИАЛЫ	69
2.2. МЕТОДЫ.....	70
2.2.1. Химические методы анализа.....	70
2.2.2. Экстракция и ультрафильтрация активной фракции.....	70
2.2.3. Хроматографическое фракционирование.....	71
2.2.4. Физико-химические характеристики.....	72

2.2.4.1. Оптическая спектроскопия	72
2.2.4.2. Инфракрасная спектроскопия	72
2.2.4.3. Рамановская спектроскопия	73
2.2.4.4. Круговой дихроизм	74
2.2.4.5. Анализ моносахаридного состава	75
2.2.4.6. Гель-электрофорез	76
2.2.4.6. Анализ аминокислотного состава	76
2.2.4.7. Атомно-силовая микроскопия	76
2.2.4.8. Обработка ферментами	76
2.2.5. Метод Эрне и Нордин	77
2.2.6. Биобезопасность	77
2.2.6.1. RAW 264.7 виталити-тест	77
2.2.6.2. МТТ-тест	78
2.2.6.3. Анафилактогенная активность	79
2.2.6.4. Аллергизирующая активность	79
2.2.6.5. Острая и субхроническая токсичность	80
2.2.6.6. Мутагенность	82
2.2.6.7. Эмбриотоксичность и тератогенность	82
2.2.7. Статистическая обработка результатов	83
ГЛАВА 3	84
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	84
3.1. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛИСАХАРИДОВ	84
3.1.1. Выделение и очистка	84
3.1.2. Оптическая спектроскопия	86
3.1.3. Инфракрасная спектроскопия	87
3.1.4. Рамановская спектроскопия	90
3.1.5. Круговой дихроизм	93
3.1.6. Анализ моносахаридного состава	95
3.1.7. Гель-электрофорез	98
3.1.7. Анализ аминокислотного состава	100
3.1.8. Атомно-силовая микроскопия	101
3.1.9. Обработка ферментами	102
3.2 БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	103
3.2.1. Метод Эрне	103

3.2.2. Противовоспалительная активность	105
3.2.2.1. Противовоспалительная активность – каррагинановый отек	105
3.2.2.2. Противовоспалительная активность – формалиновый отек	107
3.2.2.3. Противовоспалительная активность – карманная гранулема	109
3.2.3. Противовирусная активность.....	111
3.2.4. Противоязвенная активность	123
3.2.4.2. Противоязвенная активность в модели Селье	132
3.2.5. Противоопухолевая активность	134
3.2.5.1. Модель карциносаркомы Уокера.....	135
3.2.5.2. Модель карциномы легких Льюиса.....	137
3.2.5.3. Адъювантная активность с производным индолкарбазола.....	142
3.2.5.4. Влияние HTLP на противоопухолевую активность лимфоцитов.....	149
3.2.6. Противолучевая активность	151
3.2.6.1. Протонное и рентгеновское облучение.....	151
3.2.6.2. Микроядерный тест.....	154
3.2.6.3. Выживаемость при 8,0 и 8,5 Гр.....	156
3.2.6.4. Оценка количества гемоцитобластов	159
3.2.7. Биобезопасность	162
3.2.7.1. RAW 264.7 виталити-тест.....	162
3.2.7.2. МТТ-тест	163
3.2.7.3. Анафилактогенная активность.....	164
3.2.7.4. Аллергизирующая активность	165
3.2.7.5. Острая и субхроническая токсичность.....	165
3.2.7.6. Мутагенность	174
3.2.7.7. Эмбриотоксичность и тератогенность	174
3.2.8. Молекулярные механизмы биологической активности.....	176
3.2.8.1. Анализ противовоспалительного действия полисахарида в модели LPS-индуцированного воспаления в макрофагоподобных клетках THP-1	176
3.2.8.2. Инактивация генов целевых рецепторов и блокирование рецепторов антителами	187
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	193
4.1. HTLP	193
4.2. STP	195
4.3. СРАВНЕНИЕ HTLP и STP	195

5. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	203
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	205
СПИСОК ТЕРМИНОВ.....	209
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	211

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Полисахариды, в различных формах, играют ключевую роль в жизнедеятельности всех живых организмов, обеспечивая как доставку и хранение энергии, так и поддержание структурной целостности клеток, а также их защиту. Изучение биохимических основ биологической активности уже известных углеводов и поиск новых средств для терапии различных видов патологических состояний является одной из самых востребованных и динамично развивающихся областей прикладной биотехнологии. Учитывая широкий спектр биологической активности полисахаридов в сочетании с относительно низкой стоимостью и доступностью сырья, необходимого для их производства, такого как растения, микроорганизмы и другие природные источники, становится чрезвычайно важным уделить приоритетное внимание дальнейшим исследованиям этих молекул и выяснению основных механизмов, лежащих в основе их биологической активности.

Достижения в области использования полисахаридов тесно связаны с прогрессом в расшифровке структуры и функции этих молекул в природе. Понимание их многообразия и взаимодействий на молекулярном уровне является необходимым условием для успешной трансляции этих знаний в практическое применение. Это, в свою очередь, позволяет моделировать и формировать различные биологические, физические и химические взаимосвязи, которые имеют место в системах, содержащих полисахариды. Особенно важным представляется тот факт, что полисахариды широко представлены в патологических для человека биологических системах – грибах, бактериях и вирусах, что предопределяет реализацию иммунологической активности таких полисахаридов [Shen Y. et al., 2024]. Иммуностропное действие полисахаридов и их комплексов позволяет создавать на их основе иммуномодулирующие средства, что уже успешно реализуется в разработке противoinфекционных средств различной природы [Chaisuwan W. et al., 2021; Nomaeigohar S. et al., 2023]. Более того, полисахариды, регулируя цитокиновые каскады, могут выступать в качестве биологически активных агентов, влияющих на цитокин-опосредованные процессы в силу плейотропности этих сигнальных молекул, что может быть использовано в различных биомедицинских целях [Sunila E. et al., 2011; Zhou J.Y. et al., 2021].

Вместе с тем, гетерогенность полисахаридов и их комплексов, таких как гликолипиды, гликопептиды, пептидогликаны и других, их разветвленная, зачастую, структура, вызывает небезосновательные трудности в объяснении механизмов их

биологической активности. Полисахариды, будучи сложными углеводными макромолекулами, представляют собой обширный и разнообразный класс биополимеров, обладающих широким спектром биологической активности и значительным потенциалом для биомедицинского применения. Их структурное многообразие, обусловленное вариациями в моносахаридном составе, типах гликозидных связей, структурной организации и молекулярной массе, определяет их способность взаимодействовать с различными клеточными рецепторами и модулировать физиологические процессы. В основе биологической активности полисахаридов лежит их способность специфически распознаваться клеточными рецепторами, например, на поверхности иммунокомпетентных клеток. Наиболее изученными рецепторами, распознающими углеводные последовательности, являются лектины и семейство Toll-подобных рецепторов (TLR).

Лектины представляют собой разнообразную группу белков, включая маннозный рецептор (MR), дектины (Dectin-1, Dectin-2) и галектины, которые играют ключевую роль в распознавании и связывании углеводных структур, представленных на поверхности клеток патогенов и поврежденных тканей. Связывание полисахаридов с лектинами инициирует каскад внутриклеточных сигнальных путей, приводящих к активации иммунных клеток, фагоцитозу, высвобождению цитокинов и другим защитным реакциям [Peiffer AL. et al., 2024]. В частности, дектин-1 распознает β -глюканы, часто встречающиеся в клеточных стенках растений, грибов и дрожжей, а MR связывает маннозилированные гликопротеины и липополисахариды бактерий, что определяет их роль в противоинфекционном иммунитете [Kalia N. et al., 2021]. Галектины распознают и связывают разнообразные углеводные структуры, это позволяет им участвовать в процессах клеточной адгезии, дифференцировки и апоптоза, а также в регуляции воспалительных реакций [Liu, FT. and Stowell, S.R., 2023]. TLR представляют собой семейство трансмембранных рецепторов, играющих критическую роль в распознавании молекулярных структур патогенов (PAMPs) и молекул, связанных с повреждением (DAMPs). Активация TLR полисахаридами приводит к активации белков различных сигнальных каскадов IKK, IRAK, NF- κ B, MAPK и др. и экспрессии различных цитокинов [Kawasaki T and Kawai T., 2014; Vidya MK et al., 2018].

Связывание полисахаридов с лектинами (например, Dectin-1, MR, галектинами) и TLR (особенно TLR2 и TLR4) инициирует каскады внутриклеточных сигнальных путей, которые, в свою очередь, влияют на экспрессию и высвобождение провоспалительных (TNF- α , IL-1 β , IL-6) и противовоспалительных (IL-10, TGF- β) цитокинов. Таким образом, модулируя цитокиновый ответ, полисахариды проявляют противоинфекционные, регенерационные, противоопухолевые и радиопротекторные свойства, воздействуя на

процессы от фагоцитоза и репарации тканей до апоптоза и ангиогенеза. Специфичность взаимодействия полисахаридов с различными рецепторами определяет разнообразие их биологической активности и терапевтический потенциал.

Исследования, связанные с изучением физико-химических свойств и биологической активности полисахаридов и их производных ведутся многими ведущими научными группами по всему миру. На момент начала работы в литературе имелись лишь отдельные примеры биологической активности полисахаридных комплексов, выделенных из клубненосных растений. Важный задел для развития гликобиологии к настоящему времени имеется в смежных отраслях знания, например, протеомике. Ранее не было показано, что полисахариды из *Helianthus tuberosus* L. (топинамбура) могут обладать противоопухолевыми и радиопротекторными свойствами, проистекающими из их иммуномодулирующей активности. Так же и для полисахаридных комплексов из *Solanum tuberosum* L. (картофеля) не было ранее показано наличие противовирусных и противоязвенных свойств, основанных на иммуномодулирующей активности. При этом практически не изучались биохимические механизмы их биологической активности, влияние на экспрессию генов и взаимодействие с рецепторами, что является новым для гликобиологии подходом. В основном механизмы действия не затрагиваются в силу сложности и гетерогенности рассматриваемых систем и доминирует описательный подход по отношению к природе биологической активности. К началу работы не существовало в достаточной степени универсального набора методов для анализа биохимических основ биологической активности полисахаридных комплексов. Не были отработаны методики позволяющие оценить потенциальные пути реализации рецептор-опосредованной биологической активности гликанов и влияние на экспрессию генов, связанных с этой биологической активностью.

Цель и задачи исследования. Цель данного исследования состояла в установлении биохимических механизмов биологической активности полисахаридных комплексов, полученных из клубненосных растений, и определении физико-химических характеристик, влияющих на результаты их возможного биомедицинского применения. В рамках этой цели решались следующие задачи:

1. Выделить, очистить и установить ключевые физико-химические характеристики полисахаридных комплексов из *Helianthus tuberosus* L. (HTLP) и *Solanum tuberosum* L. (STP) необходимые для реализации их биологической активности;

2. Оценить адъювантную и противовоспалительную активность полисахаридных комплексов;
3. Изучить специфическую противоопухолевую активность HTLP в моделях карциносаркомы Уокера и карциномы легких Льюиса, противолучевую активность HTLP в моделях рентгеновского и протонного облучения;
4. Исследовать специфическую противоязвенную активность STP в моделях язвенного дефекта Окабэ и Селье, противовирусную активность STP на модели искусственного заражения SARS-CoV-2;
5. Изучить механизм биологической активности STP и HTLP на цитокиновом и геномном уровне;
6. Оценить параметры биобезопасности изучаемых веществ с использованием моделей: RAW 264.7 виталити-тест, МТТ-тест, анафилактогенная и аллергизирующая активность, острая и субхроническая токсичность, мутагенность, эмбриотоксичность и тератогенность.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования являются полисахаридные комплексы из *Helianthus tuberosus L.* и *Solanum tuberosum L.* Предметом исследования являются биохимические механизмы биологической активности и физико-химические характеристики полисахаридных комплексов из *Helianthus tuberosus L.* и *Solanum tuberosum L.*

Научная новизна работы заключается в следующем:

1. Выделены, очищены и охарактеризованы новые биологически активные полисахаридные комплексы из *Helianthus tuberosus L.* (HTLP) и *Solanum tuberosum L.* (STP);
2. Показано, что полученные полисахаридные комплексы могут быть использованы в качестве противовоспалительных средств, при этом STP – противовирусного и противоязвенного, а HTLP – адъювантного, колониестимулирующего, противолучевого;
3. Впервые показано, что HTLP и STP влияют на концентрацию различных цитокинов: для STP – IL-1 β , IL-4 и IFN- γ , а HTLP – TNF- α , IL-1 β и IL-6;
4. Показано, что иммуноопосредованное действие полисахаридных комплексов из клубненосных растений может быть использовано в биомедицинских целях:

- стимуляции регенерации при язвенных дефектах, стимуляции противовирусного ответа, получения адъювантного и радиопротекторного действия;
5. Показано, что экспериментальная модель индуцированного липополисахаридом воспаления может быть использована для установления влияния полисахаридных комплексов на уровень экспрессии генов и определения предполагаемого механизма биологической активности;
 6. Впервые выявлено влияние полисахаридов на экспрессию генов: STP – GAPDH, TNF, IL1B, IL6, NFkB1, IL10, NRF2, BAX, BCL2, а HTLP – IL1B, IL6, IL10, IL12B, IL23, TNF, CD40, CD80, CD274, CSF1 в макрофагоподобных клетках THP-1;
 7. Показано, что HTLP и STP безопасны *in vitro* (RAW 264.7 виталити-тест, МТТ-тест) и *in vivo* (отсутствие анафилактической и аллергизирующей активностей, острой и субхронической токсичности, мутагенности, эмбриотоксичности и тератогенности) и потенциально могут быть использованы для разработки терапевтических средств.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные являются основой для создания технологий производства и биомедицинского применения полисахаридных комплексов HTLP и STP из растительного сырья. Выявленные механизмы биологической активности HTLP и STP открывают возможность для совершенствования моделей реализации внутриклеточного сигналинга в ответ на взаимодействие специфических рецепторов с углеводными лигандами. Полученные вещества применялись в создании ряда биологически активных добавок и биомедицинских средств. Разработанные методы использовались для выделения полисахаридных комплексов из растительного сырья и наработки их в количествах, достаточных для доклинических исследований, и в перспективе могут быть масштабированы для широкого медицинского применения. Разработанные методы оценки биологической активности и определения физико-химических свойств могут быть использованы для создания методов контроля качества биотехнологических средств из растительного сырья. Созданные подходы повышают доступность важных для биомедицинской промышленности средств. На основании полученных данных были созданы и зарегистрированы три биологически активные добавки. Установленные механизмы биологической активности HTLP и STP необходимы для совершенствования моделей реализации внутриклеточного сигналинга в ответ на взаимодействие специфических рецепторов с углеводными лигандами.

Методология и методы исследования. В работе были использованы различные методики:

1. Хроматографические: ГЖХ, ВЭЖХ, анионообменная хроматография, ГПХ;
2. Спектроскопические: инфракрасная спектроскопия, ультрафиолетовая спектроскопия, рамановская спектроскопия, круговой дихроизм; электрофоретические;
3. Атомно-силовая микроскопия;
4. Изменение биологической активности после обработки ферментами;
5. Тесты на биологическую активность: метод Ерне; противовоспалительные модели (карманной гранулемы, формалинового и каррагинанового отека,); противоязвенные модели (Селье и Окабэ); противовирусная в модели SARS-CoV-2 (штаммы «Дубровка» и «Омикрон»); противоопухолевая (ингибирование роста опухоли и антиметастатическая активность) на мышинных моделях легочной карциномы Льюиса и карциносаркомы Уокера; радиозащитная в моделях абсолютной выживаемости, колониестимуляции и микроядерном тесте при протонном и рентгеновском облучении; иммуномодулирующая на примере уровней продукции TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ и стимуляции активности натуральных киллеров; тест на цитотоксичность в различных моделях (RAW 264.7 виталити-тест, МТТ-тест, анафилактическая и аллергизирующая активность, острая и хроническая токсичность, мутагенность, эмбриотоксичность и тератогенность); трансфекция упаковочными плазмидами GAG, REV, VSVG и конечными вирусными стоками с олигонуклеотидами комплементарными к генам рецепторов CLEC7A, TLR-6, CR3; обработка антителами к рецепторам CLEC7A, TLR-6, CR3; оценка экспрессии генов (GAPDH, TNF, IL1B, IL6, NFkB1, IL10, NRF2, BAX, BCL2, IL12B, IL23, CD40, CD80, CD274, CSF1) в макрофагоподобной культуре клеток THP-1 методом ПЦР РВ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Биологически активные полисахаридные комплексы, полученные из *Helianthus tuberosus* L. (HTLP) и *Solanum tuberosum* L. (STP), представляют собой глюкогалактан, содержащий до 0,5% белковой примеси, и галактоарабиногликан, содержащий до 9% белка, соответственно;
2. HTLP и STP проявляют адъювантную активность – дозозависимо стимулируют антителообразующие клетки и клеточность селезенки в модели Ерне. STP обладает противовоспалительной активностью в моделях каррагинанового отека и карманной гранулемы. HTLP проявляет противовоспалительные свойства в моделях каррагинанового, формалинового отека и карманной гранулемы;

3. HTLP обладает противоопухолевой активностью в моделях карциномы Уокера и карциномы легких Льюиса и может быть использован с другими противоопухолевыми средствами в качестве адъюванта. Радиопротекторную активность HTLP проявляет как при протонном, так и при рентгеновском излучении в широком диапазоне доз;
4. STP обладает противоязвенной активностью в моделях Окабэ и Селье, эффективно стимулируя процессы регенерации слизистой ЖКТ за счет модулирования соотношения про- и противовоспалительных цитокинов. STP проявляет противовирусную активность в модели SARS-CoV-2;
5. HTLP и STP не обладают анафилактической и аллергизирующей активностью, острой и хронической токсичностью, мутагенностью, эмбриотоксичностью и тератогенностью, что позволяет их рассматривать в качестве перспективных компонентов биомедицинских средств.

Личный вклад диссертанта. Вся экспериментальная работа по выделению и анализу полисахаридных комплексов выполнена лично автором диссертации. Автор принимал активное участие в постановке научных задач, планировании экспериментов, разработке моделей, методов, методик, обработке и анализе полученных результатов. Автору принадлежит определяющий вклад в опубликованные в соавторстве работы. Все вынесенные на защиту положения и результаты экспериментов в диссертации были получены под руководством или при непосредственном участии автора, чья роль была определяющей. По теме диссертации под руководством и при участии соискателя были подготовлены обзоры. Работы с животными и возбудителями проводились в совместных проектах квалифицированными специалистами в сертифицированных научных центрах, при непосредственном или косвенном участии автора. Эксперименты, связанные с облучением (рентгеновским или протонным), были выполнены в тесном сотрудничестве с Дюкиной А.Р. (ИТЭБ РАН), Майоровым С.А., Гайдиным С.Г., Косенковым А.М. (ИБК РАН), Агаповым А.В., Мицыным Г.В. (ЛЯП ОИЯИ), Шемяковым А.Е. (ФИАН РАН). Эксперименты, связанные с молекулярно-генетическими исследованиями, были выполнены в тесном сотрудничестве с Крицкой К.А. (ИБК РАН). Эксперименты, связанные с физико-химическими исследованиями, были выполнены в тесном сотрудничестве с проф. Сеницыным А.П. и проф. Яковенко Л.В. (МГУ имени М.В. Ломоносова). Эксперименты, связанные с работой с животными, были выполнены в тесном сотрудничестве с Ларюшкиным Д.П. (ИБК РАН), Голубевой И.С. (НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина) и проф. Мухиной И.В. (НижГМА МЗ РФ). Эксперименты, связанные с вирусологическими

исследованиями, были выполнены в тесном сотрудничестве с Иваниной А.В. и проф. Леновой И.А. (НИИВС имени И.И. Мечникова).

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Достоверность полученных результатов обеспечивается их экспериментальной валидацией в рамках данной диссертационной работы и подтверждается воспроизводимостью экспериментов, проведенных на сертифицированном современном оборудовании. В исследовании были использованы адекватные биологические объекты, а также современные физико-химические, клеточные, вирусологические и биохимические методы анализа, дополненные общепринятыми методами статистической обработки данных. Ряд ключевых результатов были независимо воспроизведены другими научными коллективами. Все экспериментальные данные были получены в достаточном количестве повторов и независимых экспериментах. Полученные результаты демонстрируют соответствие данным, представленным в современной научной литературе и подтверждены публикациями в ведущих рецензируемых журналах. Результаты были представлены на ряде российских и международных конференций и конгрессов: VIII Всероссийский научно-образовательный конгресс с международным участием «Онкорadiология, лучевая диагностика и терапия» (Москва, 2025); научная конференция «Памяти учителей» (Москва, 2024); XI международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов в рамках площадки открытых коммуникаций OPENBIO (Научоград Кольцово, 2024); Twelfth International Conference on Radiation, Natural Sciences, Medicine, Engineering, Technology and Ecology (RAD 2024 Conference) (Herceg Novi, 2024); New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology – Международная конференция, посвященная 300-летию РАН (Москва, 2024); IV Международная научно-практическая конференция «Противодействие новой коронавирусной инфекции и другим инфекционным заболеваниям» (Санкт-Петербург, 2023); XI Международный военно-морской салон (МВМС-2023) (Санкт-Петербург, Кронштадт, 2023); Всероссийская конференция по электрохимии с международным участием (Москва, 2023); XXIX Международная конференция «Математика. Компьютер. Образование» (Дубна, 2022); Армия-2022 (Кубинка, 2022); VI и VII Съезд биофизиков России (Сочи, 2019, Краснодар 2023); Международная научная конференция памяти профессора Л.А. Блюменфельда и профессора С.Э. Шноля, основателей кафедры биофизики физического факультета МГУ (Москва, 2021); XIII, XV, XVI и XIX Международная научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2018, 2020, 2021 и 2024» (Севастополь,

2018, 2020, 2021, 2024); Международная молодежная конференция. Современные проблемы радиобиологии, радиоз экологии и агробиологии (Обнинск, 2019); V и VIII Международная научная конференция SCIENCE4HEALTH (Москва, 2013, 2017); V Международная междисциплинарная конференция «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций» (Москва, 2015); II Всероссийская конференция Фундаментальная гликобиология (Саратов, 2014).

Связь работы с государственными программами. Работа выполнена в рамках государственного задания 2008–2025 гг., в рамках Федеральной целевой программы «Физико-химические и биологические основы стабильного развития и сохранения экосистем» 122091200035-7; гранта 2023–2025 гг. научно образовательных школ МГУ имени М.В. Ломоносова: «Динамика и регуляция управляющих ферментативных систем» 23-Ш06-19 и «Повышение эффективности криоконсервации биологического материала для длительного хранения и транспортировки на дальние расстояния, в том числе в условиях космоса (химический факультет)» 23-Ш01-15.

Публикации. Основные результаты по материалам диссертационной работы изложены в 20 публикациях, из них 16 работ опубликованы в изданиях, рекомендованных Положением о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова (в том числе 1 патент).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 3-х глав, заключения, основных результатов и выводов, списка литературы. Работа изложена на 260 страницах, включает 18 таблиц, 64 рисунка. Общий список литературы содержит 518 источников.

ГЛАВА 1

При подготовке данного раздела диссертации использованы статьи A2-A5, A17, A20 из списка публикаций по теме диссертации.

Обзор литературы

Углеводы представляют собой одну из основных и обширных групп биологических макромолекул, участвующих во множестве биохимических, физиологических и других процессов в живой природе. Среди углеводов занимают особое место гликаны, поскольку во многих биологических процессах они имеют такое же, а в некоторых (гликолиз, запасание энергии и др.) даже большее, значение, чем белки, липиды или нуклеиновые кислоты, которые в настоящее время являются более изученными биомолекулами. Гликаны служат фундаментальными структурными единицами биологических систем и выполняют множество важных функций во всех известных формах жизни [Arora K. et al., 2024]. Вместе с тем, гликаны отличаются гетерогенностью, неоднородностью, структурным разнообразием и, зачастую, разветвленностью, что затрудняет изучение их физико-химических характеристик и механизмов биологической активности [Fellenberg M. et al., 2013]. Известно, что гликаны могут существовать как в виде независимых молекул, так и в качестве структурных компонентов более сложных молекул, таких как гликопротеины, гликолипиды, протеогликаны и др. [Yamada K and Kakehi K. 2011]. В обоих случаях они обладают широким набором биологических активностей, включая противоопухолевые и антиметастатические свойства, противовирусное и антибактериальное действие, энергетическую и метаболическую роль, структурные и двигательные функции, а также рецепторную и сигнальную активность; кроме того, они играют важную роль в таких процессах, как адгезия и миграция клеток, эмбриогенез, онтогенез и другие жизненно важные биологические функции [Генералов Е.А. и Симоненко Е.Ю., 2022; Meudt M. et al., 2024; Smith B.A.H. and Bertozzi C.R., 2021; He M. et al., 2024].

Благодаря уникальным физико-химическим и биологическим свойствам полисахариды и их производные находят широкое применение в различных областях народного хозяйства и научных исследований. В частности, они используются в качестве гелевых матриц для разделения биомолекул методами ионообменной, гельпроникающей и аффинной хроматографии. Полисахариды применяются в качестве сред для

культивирования микроорганизмов, а также в качестве матриц для электрофоретических исследований.

В фармацевтической и медицинской практике полисахариды используются в качестве седативных, иммуномодулирующих и других средств, для создания материалов для слепков в стоматологии, в качестве присыпок, кровоостанавливающих средств, для доставки лекарств, а также для облегчения симптомов легких кишечных расстройств [Khodadadi Yazdi M. et al., 2024]. Они также применяются в качестве плазмозаменителей и антикоагулянтов, как в виде растворов, так и для модификации поверхности искусственных органов [Dahiya D. and Nigam P.S. 2023; Banerjee S. et al., 2021]. Полисахариды могут быть преобразованы в биоактивные материалы для создания мембран и полых волокон, применяемых в гемофильтрации и гемодиализе. Кроме того, они могут контролировать высвобождение лекарственных средств, выступая в качестве полимерных носителей или в составе микрокапсулированных форм. Полисахариды также используются для ускорения процессов заживления при хирургических вмешательствах и в терапии ожогов [Peng L.C. et al., 2017; Valentino C. et al., 2023].

В биологических системах полисахариды играют важную роль в составе интерстициальных жидкостей и соединительной ткани, обеспечивая механическую прочность и смазывающие свойства. Более короткие сахаридные последовательности, связанные с растворимыми белками и клеточными поверхностями, поддерживают конформацию белков и выполняют функцию важных антигенов, участвующих во взаимодействии с растворимыми и мембраносвязанными белками [Foote C.A. et al., 2022]. Подобные взаимодействия играют ключевую роль в регуляции межклеточного и внутриклеточного транспорта белков, а также в их выведении из сыворотки крови. Кроме того, они участвуют в контроле роста тканей посредством контактного ингибирования, а также важны в процессах типирования крови. В диагностических исследованиях полисахариды применяются для различения нормальных и злокачественных клеток, в анализе клеточной поверхности, радиоиммуноанализе и в качестве элементов для адресной доставки лекарственных средств к определенным тканям. Наконец, внеклеточные полисахариды и поверхностные углеводы бактерий играют важную роль в активации иммунной системы и используются в качестве вакцин и иммунологических адъювантов [Pifferi C. et al., 2021].

1.1. Структуры углеводов

Углеводы можно разделить на отдельные группы, включая моносахариды, дисахариды, олигосахариды и полисахариды, которые классифицируются в зависимости от количества моносахаридных звеньев, составляющих полимерные цепи. Отдельные мономерные звенья, составляющие эти полимерные цепи, связаны друг с другом гликозидными связями. Биологическую активность в наибольшей степени проявляют олиго- и полисахариды. Среди полисахаридов, которые хорошо изучены и активно используются в биотехнологических целях, — гликоген, хитин, крахмал, целлюлоза и гиалуроновая кислота составляют лишь небольшую часть обширного спектра выделенных из растительного сырья полисахаридов [Simsek M. et al., 2021; Benalaya I. et al., 2024]. Полисахариды значительно отличаются друг от друга по моносахаридному составу, структуре, ветвлению, типам гликозидных связей, молекулярной массе, длине основной цепи, конформационным особенностям и наличию примесей. Это разнообразие обусловлено их метаболической природой и контрастирует с белками, которые кодируются нуклеиновыми кислотами. Благодаря этому полисахариды обладают широким спектром биологических активностей, включая иммуномодулирующие эффекты, радиопротекторные свойства, антиоксидантные способности, регенеративные функции, метаболические роли, сигнальные пути, противоопухолевые эффекты, антикоагулянтные свойства и многие другие [Yu Y. et al., 2018].

Моносахариды, самая простая форма углеводов, являются производными многоатомных спиртов. Эти «строительные блоки» углеводов содержат от двух атомов углерода, например у глицеральдегида, до девяти атомов углерода в 3,4-кетал-D-галактозе, и содержат только одну альдегидную или кетонную группу. Кроме того, в зависимости от специфического расположения карбонильной группы в их молекулярной структуре моносахариды можно разделить на две отдельные категории: альдозы, в которых карбонильная группа расположена на конце углеродной цепи, и кетозы, в которых карбонильная группа находится в любом положении, кроме конечного. Вместе с тем, в зависимости от количества атомов углерода, присутствующих в их структуре, моносахариды часто подразделяют на низшие, средние и высшие. Так, например, диозы содержат два атома углерода, триозы — три, тетразы — четыре и относятся к низшим моносахаридам, пентозы и гексозы — пять и шесть, соответственно, и являются средними; остальные — высшие. Этот подход задает четкую иерархическую структуру в классификации углеводов. Олигосахариды представляют собой полимерные цепочки, состоящие из моносахаридов в количестве от 2 до 10 единиц в цепи.

Полисахариды представляют собой следующий уровень организации углеводов в более длинные полимерные цепи, чем олигосахариды. Они состоят из цепочек моносахаридных звеньев (более 10), которые связаны друг с другом гликозидными связями. Структурные конфигурации этих макромолекул чрезвычайно разнообразны: от линейного расположения до сильно разветвленных образований. Полисахариды можно разделить на два основных типа: гомополисахариды, состоящие исключительно из моносахаридов одного типа, и гетерополисахариды, состоящие из двух или более различных типов моносахаридов. Также важно подчеркнуть, что полисахариды могут включать в свои структуры различные функциональные группы, такие как сульфо, фосфатные и карбоксильные, что может существенно влиять на их биологическую активность и свойства.

Каждая существующая система классификации углеводов обладает своими преимуществами и недостатками, отражающими сложность и разнообразие углеводных структур и функций. В настоящее время отсутствует общепринятая система классификации, которая бы всесторонне охватывала все свойства и характеристики, связанные с углеводами, что подчеркивает необходимость продолжения исследований в этой области.

Циклические формы углеводов, образующиеся в растворах, являются доминирующей конформацией в водных средах, определяя свойства и биологическую активность. Они образуются преимущественно за счет внутримолекулярного взаимодействия альдегидной или кетонной группы с гидроксильной группой. В зависимости от участия в циклизации углеродного атома карбонильной группы, циклические структуры разделяются на фуранозы (пятичленное кольцо) и пиранозы (шестичленное кольцо).

Полисахариды дополнительно классифицируются в зависимости от типа гликозидной связи. Гликозидная связь образуется в результате взаимодействия гидроксильной группы одного моносахарида с полуацетальной группой другого моносахарида в молекуле полисахарида, представленной как $C-O-C-OH$. Гликозидные связи можно подразделить на два отдельных типа в зависимости от ориентации гидроксильной группы, связанной с C1, и гидроксильной группы, связанной с C2 во время образования циклической структуры: α -конфигурация, в которой гидроксильные группы расположены по одну сторону, и β -конфигурации, где гидроксильные группы расположены по разные стороны относительно плоскости кольца. Кроме того, могут образовываться гликозидные связи с участием различных атомов углерода в кольцах моносахаридов, что приводит к различным типам связей, таким как $1 \rightarrow 2$, $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 4$, $1 \rightarrow 6$ и другие. Например, в молекуле лактозы, которая классифицируется как дисахарид, остатки глюкозы и галактозы соединены гликозидной связью β -($1 \rightarrow 4$).

Биологическая активность углеводов обуславливается их структурными особенностями; однако, в некоторых случаях, эта корреляция не может быть однозначно установлена, что затрудняет окончательное определение механизма реализации какой-либо отдельной биологической активности. Несмотря на это, классификация углеводсодержащих биополимеров в соответствии с их биологическими функциями, связанными с их структурными особенностями, оказывается весьма универсальной и применимой в различных биологических контекстах.

Одной из важнейших характеристик углеводов является их молекулярная масса (ММ). Различия в ММ могут влиять на конформацию полисахаридов в растворе, их способность образовывать водородные связи, взаимодействовать с другими молекулами и участвовать в биологических процессах.

Пектины и альгинаты используются в качестве гелеобразующих и загущающих агентов, при этом их эффективность снижается при наличии «низкомолекулярных хвостов» в их распределениях по ММ (что показано еще в 1986 г в работе [Launay B. et al., 1986]). Другим примером, когда низкомолекулярные фракции оказывают влияние на свойства полимера, является токсичность низкомолекулярных форм каррагинана [Engster M. and Abraham R., 1976]. Каррагинан в качестве пищевой добавки был запрещен в ряде стран из-за его провоспалительных свойств и связи с инсулинорезистентностью [Borsani B. et al., 2021; Wagner R. et al., 2024].

Представителями высокомолекулярных полисахаридов являются β -глюканы — полимеры глюкозы, связанные β -гликозидными связями. Они, вместе с пептидогликанами, хитозаном и маннанами, известны своими мощными иммуностимулирующими свойствами. Эти полисахариды способны активировать рецепторы врожденного иммунитета, такие как Dectin-1, TLR и NOD, приводя к фагоцитозу, активации комплемента и высвобождению цитокинов [Shen Y. et al., 2024].

Способность полисахаридов модулировать иммунный ответ в значительной степени определяется их структурными особенностями, включая разветвленность, ММ, наличие ацетильных или сульфатных групп, конформацию, моносакхаридный состав и типы гликозидных связей [Sasaki D. et al., 2020]. ММ полисахаридов является одним из ключевых факторов, при этом, как правило, полисахариды с меньшей ММ проявляют более выраженные иммуномодулирующие эффекты, что показано, например, для полисахарида, экстрагированного из *Taxus media* [Fan J. et al., 2024]. Кроме того, исследования показали, что способность полисахаридов из *Schisandra chinensis* модулировать иммунную систему обратно пропорциональна их молекулярной массе [Zhao T. et al., 2014]. Предполагается, что низкая ММ и более простая структура полисахаридов обеспечивают им преимущество по

сравнению с некоторыми другими типами биомолекул, позволяя легче проникать через клеточные барьеры, что было показано на полисахаридах кукурузного шелка, которые обладают антиоксидантной активностью, способностью хелатировать ионы железа, защищать клетки от повреждения кристаллами оксалата кальция [Chen J.-Y. et al., 2020].

Было обнаружено что низкомолекулярные полисахариды проявляют выраженный иммуностимулирующий эффект. Они активируют иммунные клетки, такие как натуральные киллеры (НК), дендритные клетки и макрофаги, что приводит к усилению продукции цитокинов и других сигнальных молекул, участвующих в иммунных реакциях [Jiang L. et al., 2018]. В некоторых работах напрямую говорится об обратно пропорциональной зависимости иммуностимулирующей активности от молекулярной массы [Fan J. et al., 2024; Tian W. et al., 2023]. Вместе с тем, Гомес с соавторами отмечают, что у хитозана есть прямо пропорциональная зависимость противомикробной активности от ММ [Gomes L.C. et al., 2021]. Антимикробная активность хитозана – аминополисахарида, зависит от его степени ацетилирования и ММ. Хитозан с более высокой степенью деацетилирования имеет более высокую плотность положительно заряженных аминогрупп вдоль полимерной цепи и, следовательно, обладает более высокой растворимостью и более сильным антимикробным действием, чем хитин [Dam J.E.G. et al., 2017]. Была проведена работа по моделированию зависимости антимикробной активности хитозана в зависимости от ММ, которая показала, что активность выходит на плато при достижении порогового уровня ММ [Masson M., 2024].

В то же время, показано, что гликаны с различной ММ могут по-разному влиять на иммунные реакции. Полисахариды с более низкой ММ могут оказывать иммуносупрессивное действие, в то время как более крупные полисахариды обычно способствуют активации иммунной системы [Kasai A. et al., 2015; Jang J.-Y. et al., 2014]. Такая регуляция может иметь терапевтическое значение в лечении заболеваний, характеризующихся дисрегуляцией иммунных реакций, таких как аутоиммунные заболевания — ревматоидный артрит, рассеянный склероз, болезнь Крона и др., за счет противовоспалительного действия. Гликаны могут подавлять активацию аутореактивных иммунных клеток и воспаление, опосредованное цитокинами [Yang K. et al., 2023].

В проявлении биологической активности полисахаридов важна не только ММ, но и конформационные особенности (стереохимические параметры) молекул. Так, например, для лентинана характерно проявление биологической активности в случае его существования в виде тройной спирали. Было установлено, что молекула должна обладать определенным размером, необходимым для формирования тройной спирали, и предполагалось, что фрагменты меньшего размера, не способные образовывать такие

спирали, являются неактивными [Bohn J.A. and Bemiller J., 1995]. Сходные данные были получены и для склероглюкана, β -(1 $\rightarrow$ 3)-, β -(1 $\rightarrow$ 6)-глюкана из гриба рода *Sclerotium*: с использованием просвечивающей электронной микроскопии было показано, что активность действительно связана со структурой тройной спирали [Falch B.H. et al., 2000]. Основываясь на этих последних результатах, можно заключить, что как количество точек ветвления, так и размер молекулы являются важными характеристиками, необходимыми для формирования тройной спирали, которая играет ключевую роль в проявлении биологической активности β -(1 $\rightarrow$ 3)- и β -(1 $\rightarrow$ 6)-глюканов. Жанг с соавторами показали, что существует значительная корреляция между конформацией цепи и иммуномодулирующей активностью лентинана при различных температурах обработки в воде. Изменения в конформации цепи оказывают существенное влияние на иммунную активность [Zhang C. et al., 2022]. Многие β -(1 $\rightarrow$ 3)-глюканы обладают важной для активности жесткой стержнеобразной структурой — тройной спиралью и могут при нагревании перестраиваться в структуру неорганизованного клубка.

Аналогичная структура, возможно, характерна и для ацетилированных глюкоманнанов, поскольку β -(1 $\rightarrow$ 4)-маннаны обладают способностью формировать водородные связи между цепями. Ацетильные группы в этом случае, вероятно, выступают из основного «стержня» подобно боковым цепям β -(1 $\rightarrow$ 3)-глюканов, однако требуются дополнительные структурные исследования [Zhong X. et al., 2023].

Общие структурные особенности, характерные для арабиногалактанов типа II, рамногалактуронанов типа I и II, обеспечивают остовам молекул значительную жесткость, при этом боковые цепи определяют общую форму и поверхность, что важно для взаимодействия с рецепторами. Скорее всего, для проявления биологической активности требуется наличие нескольких сайтов связывания, что характерно, например, для таких гликопротеинов, как иммуноглобулины [Manabe N. and Yamaguchi Y., 2021].

Важной группой полисахаридов являются фруктаны, среди которых наиболее известны инулин, граминан, агавин и леваны. В растениях фруктаны, как правило, выполняют функцию резервных углеводов, а не структурных компонентов. Фруктозные остатки в цепях фруктанов связаны между собой β -(2 $\rightarrow$ 1)- и/или β -(2 $\rightarrow$ 6)-гликозидными связями [Radosavljević M. et al., 2024]. Инулин, будучи наиболее изученным и коммерчески значимым фруктаном, привлекает особое внимание благодаря своим пребиотическим свойствам и иным видам полезных биологических активностей. Инулины представляют собой линейные полимеры β -(2 $\rightarrow$ 1)-D-фруктофуранозы с терминальным D-глюкопиранозным остатком, связанным α -(1 $\rightarrow$ 2)-гликозидной связью. Степень полимеризации варьируется в широких пределах в зависимости от растительного

источника. Наиболее распространенными промышленными источниками для извлечения инулина являются девясил, цикорий (особенно корень), одуванчик (особенно корень) и топинамбур [Redondo-Cuenca, A. Et al., 2021; Savych, A. et al., 2021].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что для углеводов, с точки зрения реализации биологической активности, существуют оптимальные значения ММ и других физико-химических параметров.

1.2. Биологическая активность углеводов

Запасающие полисахариды (разветвленные α -глюканы), такие как крахмал и гликоген, имеют разную структуру и свойства. Крахмал состоит из амилозы и амилопектина. Амилоза — это полисахарид, состоящий из тысяч молекул глюкозы, связанных между собой α -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями. Линейные цепи α -(1 $\rightarrow$ 4)-глюкана образуют внутримолекулярные водородные связи и становятся спиральными. Амилоза содержит небольшое количество боковых групп, содержащих α -(1 $\rightarrow$ 2)- и α -(1 $\rightarrow$ 6)-гликозидные связи (менее 1%), что придает ей практически линейную структуру. Благодаря малому количеству точек ветвления амилоза принимает форму левозакрученной спирали [Miguel, A.S. et al., 2013].

Амилопектин имеет структуру, состоящую из молекул глюкозы, связанных α -(1 $\rightarrow$ 4)-связями с линейной гликановой цепью, при этом 5–6% разветвленных цепей связаны α -(1 $\rightarrow$ 6)-связями. Считается, что амилопектин имеет тандемную кластерную структуру. На рисунке 1 приведено строение амилопектина. Его структура состоит из повторяющихся областей со многими точками ветвления и областей с небольшим количеством точек ветвления, при этом в области с небольшим количеством точек ветвления разветвленные цепи могут образовывать структуру двойной спирали. Когда образуется спиральная структура, молекулы воды вытесняются, что приводит к кристаллизации и переходу в нерастворимую форму. По этой причине области с большим и малым количеством точек ветвления называются аморфными и кристаллическими, соответственно. Для крахмала из зерновых и картофеля характерны кристаллы А- и В-типа, соответственно, отличающиеся количеством точек ветвления и, как следствие, геометрией кристаллов. Кроме того, существует также смешанный, состоящий из смеси А и В – С1 тип [Fujita N. et al., 2011; Suzuki R. and Suzuki E., 2021].

Полисахаридные комплексы могут включать в свой состав молекулы различной не углеводной природы: липиды, белки, нуклеиновые кислоты. Наиболее распространенными являются комплексы полисахаридов и белков или липидов, которые в зависимости от

пропорций входящих в состав компонентов могут быть классифицированы как гликопротеины (большой процент представлен углеводным компонентом), протеогликаны, гликолипиды, липидогликаны, и т.д. Хотя данная классификация не всегда соблюдается и к гликопротеинам относят, например, коллаген, в котором процент углеводного компонента варьируется в зависимости от источника от 0,5% почти до 20% [Toniasso D.P.W. et al., 2022].

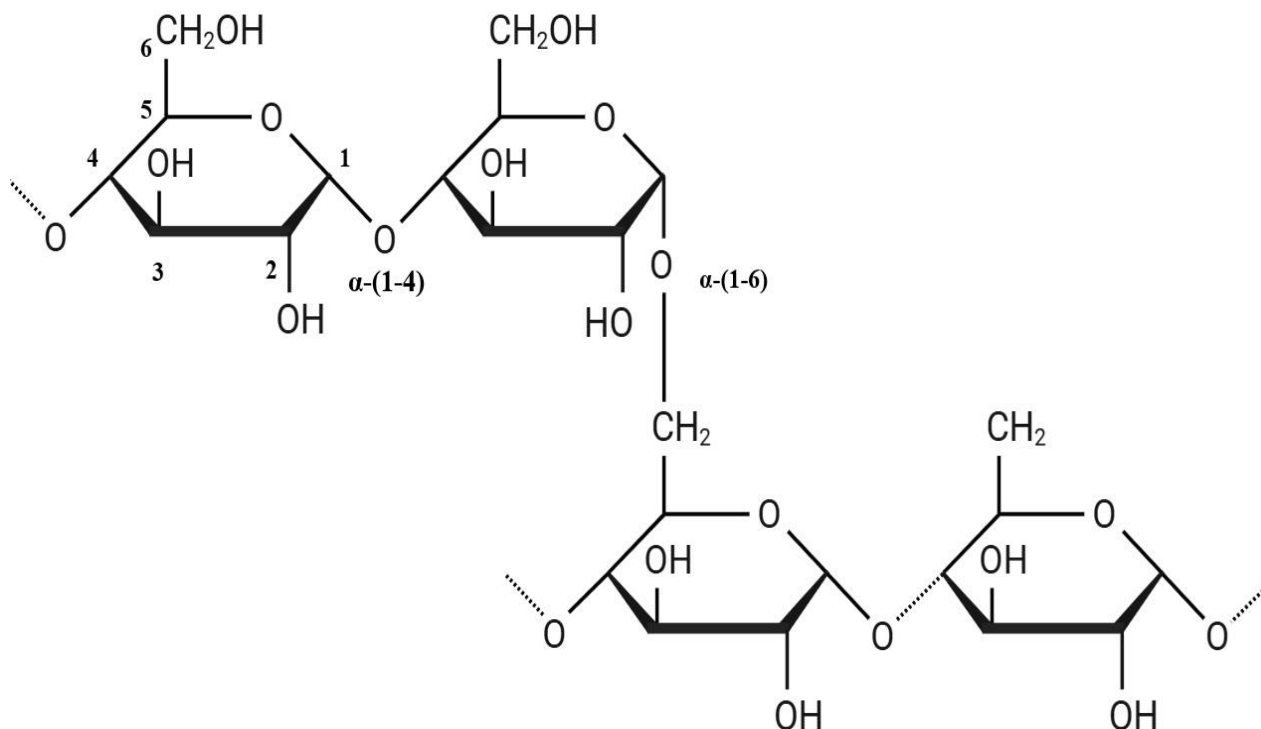


Рисунок 1. Структура амилопектина с нумерацией атомов углерода.

Белок-углеводные комплексы можно подразделить на четыре группы в зависимости от типа связи между аминокислотами и гликанами: О-гликозильные, N-гликозильные, С-гликозильные и с участием GPI-заякоренного присоединения [Wiederschain, G.Y. and Wiederschain, G.Y., 2013; He, M. et al., 2024]. Среди них N-гликозилирование и О-гликозилирование являются наиболее распространенными процессами, которые вовлекаются в подавляющее большинство патологических процессов, связанных с гликозилированием или его нарушением.

Гликозилирование белка — это ковалентное присоединение углеводного компонента к полипептидной цепи через N-связь с аспарагином или О-связь с серином или треонином. Гликозилирование бывает с участием фосфора (P-) — присоединение к серину; углерода (C-) — манноза связывается с индольным кольцом триптофана; серы (S-) — присоединение, например, к цистеину. Кроме того, известно неферментативное гликозилирование — гликирование, которое возникает в ходе реакции Амадори, реакции

Шиффа или реакции Майяра, с участием восстанавливающего углеводного конца и молекулой белка, липида или нуклеиновой кислоты. Гликирование играет ключевую роль в патогенезе метаболических заболеваний, расстройствах головного мозга, старении и нарушении регуляции микробиома кишечника [Bangar N.S. et al., 2022].

N-гликаны, которые могут иметь сложные, гибридные или высокоманнозные структуры, соединяются с аспарагином через N-ацетилглюкозамин (GlcNAc). O-гликаны образуются, когда N-ацетилгалактозамин (GalNAc) связывается с серином или треонином. Внутриклеточные белки в цитоплазме, митохондриях и ядре могут содержать отдельные молекулы GlcNAc, которые присоединяются к остаткам серина или треонина с помощью O-GlcNAc. Некоторые гликопротеины, например, закрепленные на гликозилфосфатидилинозитоле (GPI), находятся во внешнем слое плазматической мембраны. Значительная доля внешнего слоя плазматической мембраны состоит из гликосфинголипидов. Конечные сиаловые кислоты могут быть использованы для дальнейшей модификации различных структур, составляющих эти керамид-связанные гликаны [Wilkinson H. and Saldova R., 2020].

Протеогликаны представляют собой гликопротеины, входящие в состав внеклеточного матрикса, содержат, помимо стандартных N-гликанов и O-гликанов, длинные углеводные повторы. Эти удлиненные сахарные цепи, известные как гликозаминогликаны, значительно увеличивают молекулярную массу протеогликанов. В то время как N-гликаны обычно состоят из 5–12 моносахаридов, мотивы гликозаминогликанов могут включать более 80 сахаридных остатков. Например, кератансульфат представляет собой поли-N-ацетиллактозаминовую цепь, содержащую до 50 дисахаридных единиц [Caterson B. and Melrose J., 2018]. Длинные цепи гликозаминогликанов формируются из дисахаридных повторов, состоящих из GlcNAc или GalNAc в сочетании с уроновыми кислотами (глюкуроновой или идуроновой) или галактозой. Гликозаминогликаны обладают разнообразными функциональными свойствами и включают такие соединения, как гепарансульфат, хондроитинсульфат, кератансульфат и гиалуронан. Они играют ключевую роль в формировании гликокаликса – структуры, необходимой для поддержания целостности клеточной мембраны, а также участвующей в межклеточном взаимодействии и формировании межклеточного матрикса [Gaudette S. et al., 2020; Moore K.H. et al., 2021].

Углеводы играют ключевую роль в клеточной сигнализации, метаболизме и иммунном ответе [Khatun F. et al., 2020]. Уникальные химические свойства делают углеводы перспективными кандидатами для разработки новых технологий и материалов с особыми функциональными характеристиками. Биотехнология углеводов имеет целью разработку методов и способов их прикладного применения в медицине, фармакологии, пищевой

промышленности, топливно-энергетическом комплексе, материаловедении и других отраслях народного хозяйства. Например, растительная биомасса используются с целью получения этанола [Синицын А.П. и Синицына О.А., 2021].

Основные методы, используемые в биотехнологии углеводов, включают ферментацию, экстракцию и химическую модификацию. Ферментация позволяет получать углеводы из различных источников, включая растительные отходы, что делает процесс более устойчивым и экономически выгодным. И наоборот, например, моно- и олигосахариды могут влиять на активность транскрипции генов ферментов грибов [Синицын А.П. и др., 2020; Чулкин А.М. и др., 2021]. Ферментация углеводов с помощью *Saccharomyces cerevisiae* может быть применена для получения биоразлагаемых полимеров, которые могут быть использованы в упаковочной промышленности [Delgado J.F., 2016]. Химическая модификация углеводов позволяет изменять их свойства и создавать новые материалы с заданными характеристиками [Chen X. et al., 2024]. Например, модификация целлюлозы с использованием ацетилирования или карбоксилирования позволяет создавать производные с улучшенными механическими и термическими свойствами [Luz S.M. et al., 2008; Benhamou A.A. et al., 2022]. Эти модифицированные углеводы используются для создания высокопрочных композитов и пленок, которые находят свое применение в различных отраслях, включая упаковку и строительство [Aziz T. et al., 2022].

В регенеративной медицине такие углеводы, как хитозан, альгинат и гиалуроновая кислота, используются для создания биосовместимых матриц [Ghahremani-nasab M. et al., 2023]. Хитозан, получаемый из хитина, обладает не только биосовместимостью, но и антибактериальными [Khayrova A. et al., 2022] свойствами, что способствует ускоренному заживлению ран [Guarnieri, A. et al., 2022]. Хитозан обладает высокой степенью полярности и содержит множество аминогрупп, что обеспечивает его растворимость в кислых средах и создает возможности для химической модификации. Химическая модификация хитозана, например, его ацетилирование, может улучшить механические свойства молекулы и взаимодействие с клетками, что делает его возможным кандидатом для применения в тканевой инженерии [Freier T. et al., 2005]. Способность хитозана образовывать гидрогели и композиты может быть использована при создании матриц для клеточной адгезии и роста [Domalik-Pyzik P. Et al., 2019]. Способность хитозана к образованию пленок позволяет использовать его для создания барьеров, способствующих заживлению ран. Хитозан может использоваться как основа для трехмерных структур, которые обеспечивают механическую поддержку клеткам и способствуют их миграции, пролиферации и дифференцировке. Например, хитозановые матрицы могут быть дополнены коллагеном, эластином или другими биополимерами для улучшения их

биологических свойств и механической прочности. Хитозан также используется в качестве компонента в системах доставки клеток и лекарств. Его способность к образованию комплексных соединений с различными молекулами позволяет использовать хитозан для улучшения биодоступности активных веществ. Например, хитозановые наночастицы могут быть использованы для целенаправленной доставки антибактериальных средств, что особенно актуально в контексте лечения пациентов с инфицированными ранами [Rashki S. et al., 2021].

Другие полисахариды также активно используются в целевых системах доставки лекарств. Гепарин и хондроитинсульфат, являются гликозаминогликанами, которые взаимодействуют с различными белками и рецепторами, способствуя селективному накоплению лекарственных средств в целевых клетках. Конъюгирование гепарина с химиотерапевтическими агентами позволяет повысить их терапевтическую эффективность за счет селективного связывания с опухолевыми клетками, что минимизирует токсичность для здоровых тканей [Fang Z. et al., 2023].

Полисахариды, такие как арабиногалактан, бета-глюканы и маннаны, обладают иммуностимулирующими свойствами и могут использоваться как иммуноадъюванты. Они активируют макрофаги и дендритные клетки, что способствует усилению клеточного и гуморального иммунного ответа. Например, бета-глюканы, получаемые из грибов или злаков, активируют паттерн-распознающие рецепторы (PRR), такие как Dectin-1 и TLR, что приводит к повышенной продукции цитокинов и активации Т-лимфоцитов. С точки зрения промышленной применимости, такие вещества могут выступать в качестве адъювантов и использоваться с целью увеличения наработки антител [Córdova-Martínez A. et al., 2021].

Биотехнология углеводов также включает создание новых лекарственных форм, таких как наночастицы на основе полисахаридов. Эти системы позволяют улучшить растворимость и биодоступность лекарственных средств, а также обеспечить их целенаправленное высвобождение. Например, использование полиэтиленгликоля (ПЭГ) для модификации полисахаридов может увеличить их растворимость и стабильность в физиологических условиях, что важно при разработке эффективных терапевтических средств [Hoang Thi T.T. et al., 2020; Villela K.S.V. et al., 2024].

Молекулярная модификация полисахаридов является перспективным подходом для усиления их исходной биологической активности или придания им новых свойств [Han Y. et al., 2020; Liang L. et al., 2018]. В частности, сульфатирование широко используется для модификации полисахаридов, поскольку оно часто приводит к улучшению их биологической активности [Wu S., et al., 2020]. Сульфатирование гидроксильных групп в полисахаридных структурах может повысить их антикоагулянтные, противовирусные,

иммуномодулирующие и, в особенности, противоопухолевые свойства. В ряде исследований было продемонстрировано усиление противоопухолевой активности сульфатированных полисахаридов по сравнению с их немодифицированными аналогами. Например, сульфатированный арабиногалактан, выделенный из *Larix principis-rupprechtii*, индуцировал апоптоз и подавлял пролиферацию раковых клеток [Tang S. et al., 2019; Li H. et al., 2020].

Углеводы становятся основой для разработки новых биопластиков и композитных материалов. Полимеры на основе крахмала и целлюлозы обладают отличными механическими свойствами и могут быть использованы для создания упаковки, которая является более экологически чистой альтернативой традиционным пластикам. Например, термопластичные крахмалы, полученные из кукурузы или картофеля, могут быть переработаны в различные формы, что открывает новые возможности для упаковочной промышленности [Li H. et al., 2022]. Современные исследования сосредоточены на создании биопластиков, которые не только обладают хорошими механическими характеристиками, но и могут быть биodeградируемыми. Полимеры на основе лактата и целлюлозы могут быть использованы для производства упаковочных материалов, которые разлагаются в естественных условиях, что значительно снижает негативное воздействие на окружающую среду [Zhao X. et al., 2023; Nduko J.M. et al., 2021]. Исследования показывают, что использование углеводов в качестве матриц для композитов может привести к созданию материалов с улучшенными свойствами, такими как повышенная прочность и устойчивость к влаге [Ravichandran M. et al., 2020].

В работе Biswas и соавторов подчеркивается роль биополимеров в том числе на основе полисахаридов и их комплексов, в доставке лекарств, тканевой инженерии, заживлении ран и биосенсорах [Biswas M.C. et al., 2022]. Salave и соавторы [Salave S. et al., 2022] предлагают различные подходы к использованию полисахаридов при разработке имплантатов для улучшения их биоразлагаемости и биосовместимости. Обзорная работа Kooyada и соавторов посвящена применению природных камедей-полисахаридов в доставке лекарств и тканевой инженерии. Такие биосовместимые биополимеры, имеют большой потенциал для использования в заживлении ран, доставке лекарств и тканевой инженерии, а также важные характеристики, такие как биосовместимость и биodeградация [Kooyada A. and Orsu P., 2021].

Биотехнология углеводов находит также экологические применения, например, в очистке сточных вод и биоремедиации [Fakhri V. et al., 2023]. Полисахариды могут использоваться как биосорбенты для связывания тяжёлых металлов и других загрязняющих веществ, что способствует их удалению из окружающей среды [Wang J. and Chen C., 2009].

Например, использование целлюлозных волокон для очистки сточных вод от тяжелых металлов, таких как свинец и кадмий, продемонстрировало высокую эффективность и экономическую целесообразность [Meng P. et al., 2024].

В работах Kolya et al отмечается, что углеводные полимеры получают все большее признание в качестве важных материалов для широкого спектра применений [Kolya H. et al., 2024; Kolya H. and Kang C.-W., 2024]. В пищевой промышленности углеводные полимеры используются, в основном, для улучшения текстуры, консервирования, в качестве загустителей и др. В частности, моносахариды и дисахариды используются в качестве подсластителей, в то время как полисахариды, такие как альгинаты, агар и маннитол, используются в качестве гелеобразователей и загустителей для улучшения консистенции и в качестве стабилизаторов в различных пищевых продуктах. Кроме того, как отметили Janík с соавторами [Janík M. et al., 2023], для снижения риска порчи пищевых продуктов в качестве микрокапсулирующих агентов эффективно используются как ди-, так и полисахариды. В области пищевых технологий такие вещества, как целлюлоза, желатин, декстрины, смолы и модифицированные пищевые волокна, в основном используются в качестве заменителей жиров.

Полисахариды могут быть использованы в качестве средств, повышающих термостабильность, улучшающих текстуру и структурные свойства продуктов [Yan Y. et al., 2020]. Желирующие свойства пектина можно регулировать этерификацией. Гели, содержащие метоксипектин, находят широкое применение в пищевой промышленности благодаря своим желирующим, стабилизирующим и загущающим свойствам. Они используются для производства джемов и желе, где их свойства необходимы для формирования текстуры и консистенции, обеспечивая при этом стабильность. Гели с низким содержанием метоксипектина используются в производстве мороженого и йогурта [Bilal M. et al., 2021].

Полисахариды используются с целью создания биопластиков и съедобных упаковок. Они обеспечивают барьерные свойства, защищая продукты от влаги и кислорода. Съедобные упаковки из полисахаридов также уменьшают количество отходов и могут продлить срок хранения продуктов [Gamage A. et al., 2024].

На основе полисахаридов успешно создаются различные бионаноструктуры необходимые как в пищевой промышленности, так и других областях. В связи с тем, что сырье для полисахаридов относительно легкодоступно и биосовместимо, а сами полисахариды обладают хорошей биоразлагаемостью и низкой токсичностью, материалы на их основе становятся весьма востребованы в широком спектре практических задач. Так, например, производные хитозана и крахмала позволяют получать антимикробные

упаковочные материалов [Panjagari N.R. et al., 2015]. Кроме того, хитозан может быть использован в качестве армирующего агента, повышающего модуль упругости. Более того, гидрофобные свойства хитозана используются для повышения влагостойкости материалов из углеводов [Aleksanyan K.V., 2023; Liu F. et al., 2023].

Полисахариды также были исследованы на предмет обеспечения химической функциональности ряда неорганических наноструктур, таких как магнитные, металлические и биоорганические наночастицы, углеродные нанотрубки, квантовые точки и нанокомпозиты, что привело к созданию ряда гибридных биоматериалов, имеющих многообещающие применения в различных областях, включая пищевые технологии [Bilal M. et al., 2021].

Помимо своей роли в пищевой промышленности и тканевой инженерии, полисахариды и моносахариды обладают терапевтическими свойствами, которые можно использовать для лечения пациентов с различными заболеваниями [Wang X.F. et al., 2022; Salehi M. et al., 2024]. Некоторые β -(1 $\rightarrow$ 3)-глюканы уже используются в клинической практике в различных странах мира [Zhong X. et al., 2023]. Существуют противобактериальные препараты на основе углеводов (аминогликозидные антибиотики), в том числе такие известные, как стрептомицин, неомицин и гентамицин [Krause K.M. et al., 2016].

В научной литературе описаны различные растительные полисахариды с иммуномодулирующими свойствами, среди которых выделяются α -глюканы. Так, полисахариды, экстрагированные водой из корней салата посевного (*Lactuca sativa*), представляют собой линейные α -(1 $\rightarrow$ 4)-глюканы с чередующейся структурой, характеризующиеся наличием терминального остатка GlcP, связанного с положением O-6, который часто присутствует в разветвлениях цепи. Исследования показали, что эти полисахариды проявляют провоспалительную активность, вызывая дозозависимое увеличение фагоцитарной активности, концентрации оксида азота (NO), а также уровней интерлейкинов IL-1 β , IL-6 и фактора некроза опухоли- α (TNF- α) [Zou, X. et al., 2024].

Полисахариды (α -глюканы), выделенные из известного лекарственного растения *Pueraria lobata*, индуцируют повышение уровней IL-2, IL-4 и TNF- α , а также стимулируют специфические популяции Т- и В-лимфоцитов *in vitro*. Стоит отметить, что провоспалительными свойствами обладает основная структура α -(1 $\rightarrow$ 4)-глюканов, полученных не только из растительных источников, но и из тканей моллюсков и грибов [Cui, F.J. et al., 2020; Cai G. et al., 2023].

Полисахариды, полученные из растений рода *Arctium* после ферментации грибом *Rhizopus nigricans*, были изучены в моделях *in vitro* (с использованием циклофосфида).

Эти полисахариды активировали сигнальные пути через TLR-4, MAPK и NF- κ B и, помимо описанных выше общих эффектов, вызывали повышение экспрессии белков плотных контактов, таких как клаудин-5 и окклюдин, в кишечнике мышей [Xu X. et al., 2023]. Белки плотных контактов играют важную роль в поддержании целостности межклеточных соединений эпителия, тем самым уменьшая избыточное проникновение нежелательных патогенов в собственную пластинку кишечника [Schreiber F., et al., 2024].

С другой стороны, иммунный ответ может быть активирован или подавлен запуском внутриклеточных сигнальных каскадов после взаимодействия углеводного фрагмента с рецептором. Иммунная система млекопитающих, в частности человека, является сложной системой распознавания «свой-чужой». Распознавание определяется лиганд-рецепторными взаимодействиями на поверхности или внутри клеток хозяина. Основой для распознавания, чаще всего, являются гликаны, входящие в состав инфекционных агентов и не представленные в организме хозяина. Одним из механизмов реализации врожденного иммунного ответа является фагоцитоз, который активируется за счет взаимодействия макрофагальных лектиновых рецепторов (например, DC-SIGN) с гликанами бактериального, грибкового, паразитарного или вирусного происхождения. Другим механизмом реализации иммунного ответа на патоген является активация системы комплемента за счет опсонизации патогена маннозо-связывающим белком или фиколином.

На поверхности иммунокомпетентных клеток имеются рецепторы, которые распознают углеводные последовательности, присущие организму в норме, что приводит к ингибированию аутологического иммунного ответа. Примером такого ингибирования может быть взаимодействие α -(2 $\rightarrow$ 6)-связанных остатков сиаловой кислоты с рецептором CD22 (представитель семейства Siglec) на поверхности В-клеток, что приводит к ингибированию пролиферации В-клеток и, как следствие, предотвращению аутореактивности [Clark E.A. and Giltiay N.V., 2018]. Противоположным примером, с патологической активацией иммунокомпетентных клеток, является связывание трегалозы димиколата *Mycobacterium tuberculosis* с Mincle на макрофагах С-типа, что активирует макрофаги по провоспалительному пути, стимулируя экспрессию провоспалительных цитокинов [Lee W.B. et al., 2012; Cramer J., 2021].

Для проникновения в клетки вирусы используют белки, способные связываться с гликанами (GBP) на поверхности этих клеток. Белки, способные связываться с сиаловыми кислотами, обнаружены у вируса гриппа, реовируса, вируса Сендай и других. Остатки сиаловых кислот играют роль гемагглютининов и позволяют вирусам не только вступить в контакт с клетками, но и запустить процесс слияния мембран. Так, например, GBP вируса гриппа человека тропен к комплексам галактозы и сиаловой кислоты, соединенных

α -(2→6)-гликозидной связью, на поверхности клеток человека, а у птиц α -(2→3)-гликозидной связью [Sasaki G.L. et al., 2013; Zhao C. et al., 2022]. Вирус простого герпеса взаимодействует с гепарансульфатными протеогликанами на поверхности клеток за счет своих адгезинов [Pataki Z. et al., 2022].

Биосинтез и структура гликанов определяется не геномной последовательностью, а метаболизмом, клеточным статусом и биохимическими реакциями в клетке [Varki A., 2016; Jaroentomeechai, T., et al., 2024]. Конформационная изомерия также является важным фактором углеводного разнообразия [Hsieh P.H. et al., 2016; Ostash B. et al., 2022]. Вместе с тем, биологическая активность углеводов определяется их молекулярной массой, типом гликозидной связи, третичной структурой, моносакхаридным составом и видами боковых радикалов, что в настоящее время широко используется в прикладных и научных целях [Mohammed A.S.A. et al., 2021; Chen Y.J. et al., 2024].

Давно известны народные средства на основе экстрактов из растительного сырья, особенно в Китае, – *Astragalus*, *Ginseng*, *Cordiceps*, основными биологически активными компонентами которых являются углеводы [Liu M. et al., 2021]. Полисахарид из *Astragalus* (APS) широко используется в качестве противомикробного средства и иммуностимулятора в развивающихся странах [Li Y. et al., 2021; Wang Y. et al., 2022]. Недавние исследования показали, что APS увеличивает уровни экспрессии провоспалительных цитокинов, включая продукцию TNF- α и NO, в клетках RAW264.7 [Feng S. et al., 2021]. Вместе с тем, APS продемонстрировал противовоспалительное действие на индуцированное липополисахаридом (LPS) воспаление в нескольких клеточных линиях [Lu J. et al., 2013; Ren Qi. Et al., 2018].

В настоящее время началось интенсивное применение гликоинженерии и гликотерапии в современной медицине и биотехнологии, разрабатываются лекарственные препараты на основе углеводов. С использованием методов углеводной химии, химической биологии и гликобиологии создаются улучшенные или новые продукты на основе гликанов, способные существенно влиять на состояние здоровья и течение болезней человека и животных [Mahara G. et al., 2023; Smith B.A.H. and Bertozzi C.R., 2021].

В последние годы исследования подтвердили, что полисахариды из натуральных продуктов обладают разнообразными полезными терапевтическими эффектами. В частности, морские водоросли и полученные из них полисахариды, такие как альгинат, фукоидан, каррагинан, ламинаран и агар [Akter A. et al., 2024], широко применяются для биомедицинских и биологических целей [Zargarzadeh M. et al., 2020; Ahmad Raus R. et al., 2021; Iqbal M.W. et al., 2022; Mirzaei A. et al., 2023; Shah M. et al., 2024], например, в тканевой инженерии, для доставки лекарств, заживления ран и создания биосенсоров.

Введение растительных полисахаридов животным с асептическим воспалением и ожоговыми ранами стимулирует иммунный ответ путем активации макрофагов и нейтрофилов, стимуляции фагоцитоза, экспрессии цитокинов, активирующих Т- и В-лимфоциты [Burgess M. et al., 2022; Murphy E.J. et al., 2023].

При введении полисахаридов в организм происходит их взаимодействие с макрофагами и моноцитами, приводящее к активации клеток, усиливая их иммунологические функции, пролиферации лимфоцитов в селезёнке, тимусе и лимфоузлах. Благодаря этому стимулируется экспрессия цитокинов и хемокинов, активирующих иммунокомпетентные клетки и каскады системы комплемента [Yin M. et al., 2019; Lv H. et al., 2023].

Полисахариды играют важную роль в регуляции обмена веществ в организме, взаимодействуя с липопротеинами плазмы и действуя как детоксицирующие средства. Так, например, в медицинских целях для этих задач широко применяются декстраны. Красные водоросли являются известным источником полисахаридов, таких как каррагинан, ламинарин и сульфогалактозаны, которые демонстрируют гипохолестеринемическую активность. Исследования показали, что сульфаты крахмала, пектина и целлюлозы у крыс с повышенным уровнем липидов в крови приводили к снижению и даже нормализации концентрации липидов [Fotschki B. et al., 2014; Li K. et al., 2024]. Кроме того, крахмал способен стимулировать обмен желчных кислот [Dhakal S. and Dey M., 2022].

Полисахариды, экстрагированные из топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.), обладают способностью регулировать функции желудочно-кишечного тракта, модулировать иммунный ответ, а также снижать уровень глюкозы в крови и действовать как гиполипидемические и противовирусные агенты [Rubel I.A. et al., 2014; Shoaib M. et al., 2016]. Например, исследование Ван и соавторов [Wan X. et al., 2022] показало, что водный экстракт топинамбура, содержащий полисахарид типа инулина, проявляет противовирусную активность в модели респираторно-синцитиального вируса (РСВ), сопоставимую с действием стандартного противовирусного препарата рибавирина. Этот полисахарид не только существенно уменьшил потерю веса у мышей, инфицированных РСВ, но и снизил повреждение легких, вызванное вирусом. Введение полисахарида привело к значительному снижению уровня мРНК. Механизм действия инулина реализуется через ингибирование мРНК-рецепторных белков TLR-3/4, снижение концентрации провоспалительных цитокинов TNF- α и β , а также увеличение уровня противовоспалительного IL-4. Антиоксидантные свойства инулина были также подтверждены другими исследователями, которые показали, что спиртовой экстракт из

Helianthus tuberosus L. положительно влияет на антиоксидантный статус [Oszmiański J. et al., 2021; Shariati, M. A. et al., 2021].

Полисахариды, полученные из различных частей растения *Helianthus tuberosus* L., проявляют разнообразную биологическую активность. Исследования показали, что экстракты клубней обладают антиоксидантными свойствами, а также противодиабетической и ранозаживляющей активностью [Mariadoss A.V.A. et al., 2021]. Другая группа ученых обнаружила, что спиртовые экстракты из топинамбура, примененные на мышах с атопическим дерматитом, вызванным клещом *Dermatophagoides farina* и кератиноцитами HaCaT, способствовали уменьшению клинических проявлений, снижению толщины эпидермиса и увеличению экспрессии филаггрина [Kang Y.M. et al., 2018]. Также имеются данные о слабительном, желчегонном, тонизирующем, диуретическом и сперматогенном действии экстрактов из топинамбура [Poray I., 2014; Méndez-Yañez A. et al., 2022].

Грубые экстракты клубней топинамбура использовались в различных целях. Например, Afoakwah с соавторами [Afoakwah N.A. et al., 2023] показали противоопухолевые, антимикробные и тормозящие пищеварение свойства экстракта топинамбура. Экстракты способны дозозависимо ингибировать рост клеток колоректальной аденокарциномы толстой кишки HT-29, что установлено по фрагментации ДНК и индукции позднего апоптоза. Подавление пролиферации клеток достигало 78%, что согласуется с нашими данными [Generalov E.A., 2015].

Вместе с тем, показано, что не только экстракты клубней, но и листьев топинамбура обладают биологической активностью. Такие экстракты характеризуется значительно более высоким содержанием фенолов и флавоноидов по сравнению с экстрактами клубней. На модели фибробластов экстракты клубней стимулируют их рост, а листьев — только в малых концентрациях. Аналогичные тенденции наблюдались и для кератиноцитов. При этом, оба экстракта в фибробластах увеличивали экспрессию гена супероксиддисмутазы 1 (SOD-1), фермента, инактивирующего АФК, но не экспрессии гена NADPH-оксидазы 4 (Nox-4), фермента, продуцирующего АФК. В кератиноцитах наблюдался противоположный эффект [Nizioł-Lukaszewska Z. et al., 2018]. Экстракты листьев и клубней топинамбура влияют на пролиферацию клеток и могут изменять экспрессию генов, связанных с окислительным стрессом, что позволяет предположить их потенциальную пользу в качестве антиоксидантных средств.

Из клубней топинамбура был получен, охарактеризован и сульфатирован инулин. Было обнаружено усиление противоопухолевой активности сульфатированного инулина в

сравнении с инулином без модификации на клетках гепатоцеллюлярной карциномы [Shao T. et al., 2021].

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является одной из наиболее распространенных и важных сельскохозяйственных культур в мире. Полисахариды картофеля представляют собой гетерогенную группу, различающуюся по структуре, составу и свойствам. Помимо крахмала, основного углевода картофельных клубней, они содержат значительное количество других полисахаридов, таких как пектины, гемицеллюлозы и другие некрахмальные полисахариды [Ralet M.-C. et al., 2016]. Эти полисахариды привлекают все больше внимания благодаря своей разнообразной биологической активности и потенциалу для применения в различных областях, включая пищевую, фармацевтическую и косметическую промышленность.

Так, например, на основе поли-(D-L-молочно-гликолевой кислоты) (PLGA), конъюгированной с лектином из картофеля, был разработан биоразлагаемый наноноситель для доставки лекарств при интраназальном введении в центральную нервную систему (ЦНС). Авторы показали значимое усиление эндоцитоза конъюгированных частиц PLGA с лектином по сравнению с немодифицированными наночастицами PLGA в эпителиальных клетках легких человека. При этом по накоплению флуоресцентного красителя в тканях головного мозга установлено, что накопление конъюгата происходит в обонятельной луковице, полушариях головного мозга и стволе мозга уже через 0,25 часа после введения [Chen J. et al., 2012]. Эти данные подтверждают важность лектин-зависимого эндоцитоза и возможность его использования в средствах доставки лекарств.

Пектины являются основными структурными полисахаридами клеточных стенок растений. В картофеле они представлены в основном гомогалактуронами, рамногалактуронами I и II [Oomen, R.J.F.J. et al., 2003]. Гомогалактуронаны состоят из остатков α -(1 $\rightarrow$ 4)-D-галактуроновой кислоты, а рамногалактуронаны имеют в своем составе боковые цепи, содержащие рамнозу, галактозу, арабинозу и другие моносахариды [Feng X. et al., 2021]. Гемицеллюлозы также являются компонентами клеточных стенок и включают ксиланы, глюканы и другие полисахариды. В картофеле преобладают ксиланы и глюкоманнаны [Otulak-Kozieł K. et al., 2018]. Пектиновые полисахариды обладают разнообразной биологической активностью: иммунорегуляторной, противовоспалительной, гипогликемической, антибактериальной, антиоксидантной и противоопухолевой [Minzanova S.T. et al., 2018].

Крахмал является основным запасным углеводом и преобладает в клубнях. Однако крахмал, как правило, не рассматривается в контексте биологической активности наравне с пектинами и гемицеллюлозами или другими некрахмальными полисахаридами. Картофель

также содержит другие полисахариды в меньших количествах, такие как целлюлоза, арабиногалактаны и некоторые другие. Например, были выделены и охарактеризованы три фракции пектина с молекулярными массами 430, 93 и 11,3 кДа. Фракция 11,3 кДа состоит из свободных β -(1 $\rightarrow$ 4)-галактановых цепей, тогда как фракции 430 и 93 кДа представляют собой рамногалактуронаны I типа с длинными β -(1 $\rightarrow$ 4)-галактановыми боковыми цепями, достигающими 80 остатков Gal, и короткими β -(1 $\rightarrow$ 4)-галактановыми боковыми цепями до 3 остатков Gal. Структурные особенности этих полисахаридов хорошо коррелируют с их активностью в отношении связывания с галектином-3 и стимуляции роста кишечных бактерий. Учитывая, что эти полисахариды входят в состав коммерческих наборов, в качестве модельных полисахаридов для исследований биоактивности [Feng Z. et al., 2023], можно констатировать актуальность развития методов выделения активных компонентов из растительного сырья.

Бета-глюканы представляют собой гетерогенную группу полисахаридов, состоящих из остатков глюкозы, соединенных гликозидными связями β -(1 $\rightarrow$ 3) или β -(1 $\rightarrow$ 4). Их иммуномодулирующие свойства хорошо известны. Бета-глюкан является молекулой патоген-ассоциированного молекулярного паттерна (PAMP), присутствие которой в организме часто вызывает иммунный ответ при грибковых и бактериальных инфекциях [Krishnan R. et al., 2022]. Биологическая активность β -глюканов зависит от специфического взаимодействия с несколькими PRR, такими как Dectin-1, CR3, SR и LacCer. Связывание с этими рецепторами инициирует передачу сигнала в клетках-мишенях: макрофагах, моноцитах, дендритных клетках, лимфоцитах и нейтрофилах [Noorbakhsh Varnosfaderani S.M. et al., 2024]. Важно отметить, что биологическая активность β -глюканов варьируется в зависимости от типа клеток и представленных на них рецепторах.

Кроме того, β -глюканы демонстрируют способность улучшать метаболизм липидов и глюкозы, что делает их полезными в контексте лечения при заболеваниях, связанных с нарушениями метаболизма, таких как диабет и ожирение. Исследования показывают, что добавление β -глюканов в рацион может привести к снижению уровня холестерина в крови и улучшению чувствительности к инсулину [McCarthy C. et al., 2024]. Это делает их важными компонентами функционального питания и диетических добавок.

Полисахариды, полученные из других источников, таких как грибы, также продемонстрировали разнообразные биологические эффекты. Например, полисахариды, выделенные из грибов *Ganoderma lucidum* и *Lentinula edodes*, обладают иммуномодулирующими, противоопухолевыми и антиоксидантными свойствами [Zhang C.H. et al., 2015]. Эти эффекты связаны с их способностью активировать макрофаги,

увеличивать продукцию цитокинов и стимулировать пролиферацию Т-клеток, что делает их перспективными для использования в иммунотерапии.

Другим важным способом, с помощью которого полисахариды выполняют свою защитную функцию, является создание механических и электростатических барьеров на слизистых оболочках, которые препятствуют проникновению инфекционных агентов. Одним из наиболее известных представителей является гиалуроновая кислота — несulfурированный гликозаминогликан [Zahm J.M. et al., 2011; Díaz-Montes E., 2022]. В модели язвенного колита гиалуроновая кислота в форме ректальных полимерных частиц продемонстрировала способность улучшать барьерные функции, что привело к снижению концентрации провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6, а также к повышению трансэпителиального электрического сопротивления за счет сохранения целостности кишечного барьера [Kotla N.G. et al., 2022].

Однако гиалуроновая кислота выполняет не только барьерную функцию, но и участвует в различных клеточных взаимодействиях. Она взаимодействует с гликопротеином CD44, который экспрессируется в лейкоцитах, эндотелиальных и эпителиальных клетках, фибробластах и кератиноцитах. Это взаимодействие инициирует множество физиологических процессов, включая изменения в межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействиях, пролиферацию клеток, их адгезию и миграцию, а также активацию лимфоцитов, выживание клеток и апоптоз. В условиях патологических процессов CD44 может способствовать развитию хронического воспаления и прогрессированию неопластических процессов [Xu Y. et al., 2020].

Другим рецептором гиалуроновой кислоты, является CD168, который также известен как рецептор подвижности. Исследования показывают, что CD168 может стимулировать как злокачественные процессы, так и процессы заживления ран и воспаления, особенно в случае мышей с нокаутом CD44. Рецептор TLR-4 также способен связываться с гиалуроновой кислотой, что приводит к активации сигнального каскада через NF- κ B, который, в свою очередь, стимулирует выработку как провоспалительных цитокинов, так и интерферонов типа I [Ouasti S. et al., 2020].

Взаимодействие гиалуроновой кислоты с рецепторами CD168, CD44 и TLR4 и их чувствительность к количеству и размеру молекул гиалуронана могут быть использованы для создания биосенсоров состояния стромы, окружающей клетку. В этом контексте ММ гиалуроновой кислоты играет ключевую роль в ее биологической активности. Например, низкомолекулярные формы (менее 200 кДа) обладают провоспалительными свойствами и могут способствовать росту опухолевых новообразований, тогда как высокомолекулярные

формы (от 200 кДа до 2 МДа) оказывают противовоспалительное и противоопухолевое действие [Naor D., 2016].

Растительные полисахариды также обладают иммуномодулирующими свойствами, способствуя активации фагоцитарных клеток, созреванию иммуноглобулинов и усилению гуморального иммунитета. Например, полисахариды из *Aloe vera* проявляют противовоспалительное действие, способствуют регенерации органов и обладают противоионфекционными, противоопухолевыми, антиоксидантными и радиопротекторными свойствами. Однако следует учитывать, что экстракты содержат множество компонентов, часто обладающих противоположной активностью, таких как верацилглюканы В и С [Babu S. et al., 2020; Rizqi J. et al., 2022].

Ацеманнан, β -(1,4)-ацетилированная полиманноза, выделяемая из *Aloe vera*, проявляет иммуномодулирующую активность как *in vitro*, так и *in vivo*, активируя лимфоциты селезенки, макрофаги и дендритные клетки, а также усиливает активацию лимфоцитов аллоантигеном. Ацеманнан способствует экспрессии цитокинов TNF- α и IL-1 и увеличивает клеточность и индекс селезенки [Bai Y et al., 2023]. Он способен связываться с TLR-5, вызывая экспрессию IL-6 и IL-8 и активируя связывание NF- κ B/ДНК в фибробластах десны человека, а его взаимодействие с TLR-4 на макрофагах запускает каскад сигнальной активности NF- κ B [Thunyakitpisal P. et al., 2017; Kim S.H. et al., 2023].

Полисахариды, полученные из *Porphyridium cruentum* (ММ = 6,53 кДа), продемонстрировали наивысшую иммуностимулирующую активность по сравнению с полисахаридами как большей, так и меньшей ММ [Sun L. et al., 2012]. Эти результаты были подтверждены в исследованиях, касающихся антиоксидантной активности фракций полисахаридов, извлеченных из *Astragalus* и солодки, которые имели различные ММ [Kondeva-Burdina M. et al., 2016; Chang X. et al., 2022].

Изучение фракций полисахаридов *Astragalus* (APS) различной ММ, таких как APS-I (более 2 МДа), APS-II (ММ = 10 кДа) и APS-III (ММ = 300 Да) [Li K. et al., 2020], показало их иммуномодулирующие свойства. Эти фракции способствовали пролиферации лимфоцитов селезенки, индуцированной митогеном Т-клеток Con, в широком диапазоне концентраций. Интересно, что APS в низких концентрациях способствовал образованию лимфоцитов, однако при концентрациях выше 100 мкг/мл наблюдалось постепенное снижение этого эффекта. В экспериментах с митогеном В-клеток LPS было установлено, что фракции APS также стимулировали пролиферацию лимфоцитов селезенки и секрецию IgG в различной степени. В разных экспериментах фракции APS проявляли стимулирующее действие на фагоцитоз и активность NK-клеток, при этом в модели секреции провоспалительных цитокинов (IL-2, IL-4, IFN- γ) наблюдалось их провоспалительное

действие. Авторы [Li K. et al., 2020] пришли к выводу, что биологическая активность APS зависит от их ММ и структурных характеристик, причем это взаимодействие носит нелинейный характер.

В клетках RAW264.7 фракции APS взаимодействуют с В-клеточным рецептором (BCR) и TLR-4, усиливая сигнальные пути TLR4/NF- κ B и Ca²⁺-сAMP [Wang Z. et al., 2016]. Кроме того, APS может блокировать передачу сигнала NF- κ B в эндотелиальных клетках-предшественниках крыс, увеличивая при этом экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и его рецептора [Zhang X. et al., 2015; Zheng D. et al., 2020]. В модели язвенного колита было показано, что APS обладает противовоспалительной и антиоксидантной активностью, ингибируя синтез TNF- α , IL-6, IL-1 β и малонового диальдегида, а также восстанавливая активность супероксиддисмутазы, путем восстановления продукции короткоцепочечных жирных кислот и регуляции гомеостаза клеток Th17/Treg в зависимости от микробиоты [Zhang Y. et al., 2025].

Биологическая активность углеводов определяется множеством механизмов, включая взаимодействие с рецепторами и гликансвязывающими белками (GBP). GBP, также известные как гемагглютинины и адгезины у микроорганизмов, были обнаружены во всех живых организмах и могут быть разделены на лектины (например, рицин и конканавалин А) и сульфатированные гликозаминогликаны (GAG), связывающие белки, такие как гепаран, дерматан и хондроитин [Zhang B., 2021]. Обширное семейство лектиновых рецепторов включает белки, различающиеся по доменам распознавания углеводов, которые могут быть как отдельными молекулами, так и частями белковых комплексов. Эти домены обладают неглубокими карманами, позволяющими взаимодействовать с концевыми последовательностями остатков сахаров. Взаимодействия GAG с углеводными остатками обеспечиваются заряженными остатками аминокислот [Zappe A. et al., 2022].

Активация иммунокомпетентных клеток углеводами осуществляется через распознавание специфических олиго- и моносахаридных мотивов соответствующими рецепторами. К таким рецепторам относятся PRR, которые распознают антигенные детерминанты на начальной стадии иммунного ответа [Rabinovich G.A. et al., 2012]. Например, макрофаги способны связываться с растительными полисахаридами и различными гликоконъюгатами через различные рецепторы, такие как TLR-4, CD36, CD14, CD1, рецептор комплемента 3 (CR3), рецепторы-мусорщики (SR), Dectin-1, рецептор маннозы (MR), лектин галактозы (MGL), MARCO, $\alpha\beta3$, β GR и DC-SIGN. Аналогичные рецепторы, такие как Langerin, CD209, TLR1, TLR2, TLR6, Dectin-2, NOD-1 и NOD-2, также присутствуют на других типах клеток [Yin M. et al., 2019; Busold S. et al., 2020].

Распознавание PAMP рецепторами клеток-хозяев часто приводит к активации различных компонентов иммунной системы. Лектиновые рецепторы представляют собой весьма гетерогенное семейство, но все они являются углеводными PRR. Первоначально считалось, что лектиновые рецепторы С-типа (CTLR) осуществляют Ca^{2+} -зависимое распознавание остатков моносахаридов. CTLR включает CRD, способные связываться с маннозными и галактозными остатками, терминальными аминокислотными последовательностями (глицин-пролин-аспарагин и глутаминовая кислота-пролин-аспарагин, соответственно), расположенными в различных частях молекулы. В этом взаимодействии могут участвовать ионы Ca^{2+} и карбонильные группы CRD, сайты связывания которых также регулируются кальцием. Тип связанной молекулы сахара и ее место на рецепторе зависят от аминокислотных остатков, вовлеченных в распознавание. В настоящее время установлено, что типичная складка CTLR, известная как лектин-подобный домен С-типа (CTLD), может выполнять свои функции независимо от Ca^{2+} . Существует более тысячи белков, содержащих CTLD, обладающих различной биологической активностью, влияющей на фагоцитоз, эндоцитоз, активацию комплемента, клеточную адгезию, регенерацию и миграцию клеток [Arnold J.N. et al., 2022].

Одним из примеров является Dectin-1, который распознаёт β -глюканы, содержащиеся в клеточных стенках грибов. Активация Dectin-1 приводит к активации сигнальных путей, которые способствуют выработке провоспалительных цитокинов и активации макрофагов, что усиливает иммунный ответ на инфекцию [Pedro A.R.V. et al., 2021]. Другие лектиновые рецепторы, такие как маннозный рецептор (MR), играют важную роль в эндоцитозе и представлении антигенов, что также способствует активации Т-клеток и формированию адаптивного иммунного ответа [Villar J. et al., 2021].

Важно отметить, что полисахариды могут оказывать как иммуномодулирующее, так и иммуносупрессивное действие в зависимости от их структуры, ММ и контекста. Например, некоторые полисахариды могут снижать воспаление и подавлять чрезмерный иммунный ответ, что может быть полезно в терапии аутоиммунных заболеваний и хронических воспалительных состояний [Di Sotto A. et al., 2020; Murphy E.J. et al., 2023].

Очень многие функции углеводов связаны с их способностью связываться с определенными группами рецепторов [Generalov E.A. and Yakovenko L.V., 2023].

1.3. Рецептор-опосредованная биологическая активность углеводов

В силу гетерогенности и широкой распространенности гликанов в живой природе, для них существует огромное количество рецепторов [Raposo C.D. et al., 2021]. Основными

группами рецепторов являются лектиновые, TLR, NLR, SR, CR. В таблице 1 представлены семейства лектинов, их последовательности связывания и участие в биологических процессах (рассматриваются только лектины, находящиеся на клеточной мембране). Стоит отметить, что разные рецепторы могут распознавать схожие лиганды, но иметь свои структурные и функциональные особенности. Наиболее изученными и перспективными для рассмотрения, в данной работе, являются семейства CTLR и TLR.

Таблица 1. Описание лектинов.

Лектины	Последовательность связывания	Биологическая роль	Ссылка
Р-типа	GalNAc; последовательности галактозы	Регуляция ферментов и гликопротеиновых гормонов. Участие в иммунологических процессах.	Gary-Bobo M. et al., 2007; Kawsar S.M.A. et al., 2021; Cummings R.D. et al., 2022;
С-типа	Гиалуроновая кислота, трисахариды Gal- β -(1 $\rightarrow$ 3 или 1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc- β -(1 $\rightarrow$ 2)-Man; N-связанные d-маннозоолигосахариды; боковые цепи L-фукозы; N-связанные гликаны; N-ацетил-d-глюкозамин; остатки маннозы, фукозы, глюкозы и галактозы; α -(1 $\rightarrow$ 2)- или α -(1 $\rightarrow$ 4)-маннаны; концевые фрагменты β -d-галактозы и N-ацетилгалактозамина; кератансульфат; β -глюканы; Трегалоза 6,6'-димиколат; LPS; сиаало-орозомукоид; фукоидан; гепарин; β -(1 $\rightarrow$ 3)- и β -(1 $\rightarrow$ 6)-d-гликаны; пептидогликаны и др.	Клеточная адгезия (селектины), клиренс гликопротеинов, врожденный иммунитет (коллектины)	Meier M. et al., 2000; Olin A.I. et al., 2001; Schorey J.S. and Lawrence C., 2008; Geurtsen J. et al., 2010; Riboldi E. et al., 2011; Nagae M. et al., 2016; Chen Z. et al., 2019; Scur M. et al., 2023;
Ф-типа	Концевые остатки фукозы олигосахаридов	Врожденный иммунитет, оплодотворение, микробная адгезия и патогенез	Vasta G.R. et al., 2017; Vasta G.R. and Feng C., 2020; Ahmmed M.K. et al., 2022;

I-типа (SigLec)	Сиаловые кислоты; гиалуронан; N-гликаны, содержащие повторы фукозы; N-ацетилнейраминавая кислота; N-связанные повторы маннозы; GlucA- β -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal- β -(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc (HNK-1 антиген)	Клеточная адгезия. Участие в вирусной инфекции, лейкемии, лимфоме, хроническом воспалении легких, болезни Альцгеймера и нейровоспалении, а также других патологических состояниях.	Collins B.E. et al., 1997; Floyd H. et al., 2000; Munday J. et al., 2001; Scholler N. et al., 2001; Macauley M.S. et al., 2014; Spence S. et al., 2015; Läubli H. and Varki A., 2020; Jame-Chenarboo Z. et al., 2024;
S-типа (Галектины)	Лактоза; β -D-галактозиды; LacNAc; Gal; GalNAc	Иммунный ответ, способствуют воспалению. Игрют важную роль в инвазии, прогрессировании, метастазировании и ангиогенезе опухолей. Сшивание гликанов во внеклеточном матриксе.	Ebrahim A.H. et al., 2014; Chou F.C. et al., 2018; Modenutti C.P. et al., 2019; Verkerke H. et al., 2022;
X-типа (Интеллектины)	Концевые ациклические 1,2-диолсодержащие структуры, включая β -d-галактофуранозу, d-фосфоглицерин-модифицированные гликаны, d-глицеро-d-тало-окт-2-улозоновую кислоту, 3-дезоксид-манно-окт-2-улозоновая кислота; Gal; галактофуранозы; пентозы	Врожденный иммунитет; оплодотворение и эмбриогенез. Связываются с олигосахаридами бактериальных патогенов, является частью врожденной иммунной системы.	Than N.G. et al., 2014; Raposo C.D. et al., 2021; Varki A. et al., 2022;
Фиколины	GlcNAc; GalNAc; Fuc; LPS; β -глюканы	Врожденный иммунитет, связывают углеводные последовательности на поверхности грамположительных и грамотрицательных бактерий, участвуют в активации системы комплемента.	Mizushima T. et al., 2004; Matsushita M., 2017; Bidula S. et al., 2019;

Хитиназа-подобные (Хитолектины)	Хитин и хитин-олигосахариды; GalNAc; GlcNAc; Rib; Man	Метаболизм коллагена. Связывают и гидролизуют (хитиназы, но не хитолектины) олигосахариды. Участие в оплодотворении некоторых видов.	Zaheer-ul-Haq, 2007; Schimpl M. et al., 2012; de la Fuente D. et al., 2024;
---------------------------------	---	--	---

1.3.1. Лектины R-типа (RTL)

Лектины R-типа (RTL) представляют собой семейство углеводов-связывающих белков, содержащих R-домен, который отвечает за распознавание углеводов. Домен R-типа — это белковый мотив, который встречается во многих гликозилтрансферазах, а также в бактериальных и грибковых гидролазах. Интересно, что углевод-распознающий домен (CRD) R-типа — один из немногих высоко гомологичных лектинов у животных, растений и бактерий. Этот домен аналогичен таковому у рицина, который был открыт в 1888 году Штильмарком и использовался Паулем Эрлихом как иммуногенный агент. Большинство лектинов R-типа связываются с остатками галактозы (Gal), N-ацетилгалактозамина (GalNAc) и маннозы (Man) [Imberty A.H. et al., 2017; Cummings R.D. et al., 2022]. Структурно рицин содержит цепь A из восьми α -спиралей и восьми β -тяжей, составляющих его каталитическую субъединицу. Цепь B, которая содержит домены лектина R-типа, имеет два tandemных CRD, которые находятся на расстоянии ~ 35 Å друг от друга и имеют форму, напоминающую штангу, с одним связывающим доменом на каждом конце. Каждый домен R-типа имеет трехдольную организацию, которая представляет собой структуру β -трилистника. Предположительно, каждая доля может быть независимым местом связывания. Связывание сахара в этих петлях относительно слабое и возникает из-за укладки ароматических аминокислот против остатков Gal/GalNAc, что приводит к образованию водородных связей между аминокислотами и гидроксильными группами углеводов [Gupta R.K. and Gupta G.S., 2012].

1.3.2. Лектин-подобные рецепторы C-типа (CTLR)

Семейство лектиноподобных рецепторов C-типа (CTLR) у человека представлено 86 белками, а у мышей количество CTLD-содержащих белков составляет 123 [Cummings R.D. et al., 2022]. Их принято в настоящее время подразделять на 16 групп. Лиганды этих рецепторов весьма разнообразны и представлены не только углеводными

последовательностями. Связывание CTLR с лигандами активирует различные клеточные процессы и запускает внутриклеточные сигнальные каскады, что приводит к множеству биологических эффектов. Среди них: распознавание патогенных паттернов, регуляция гомеостаза, миграция кератиноцитов в процессе заживления ран, а также модуляция иммунного ответа через регуляцию уровня цитокинов и хемокинов (таких как TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, CXCL-2, CCL-3, GM-CSF и др.). Рецепторы CTLR могут активировать разнообразные сигнальные каскады, с участием, в том числе, иммунорецепторного тирозинового активирующего мотива (ITAM), ITEM, DEAD и других [Chifoleau E., 2018].

1.3.2.1. Dectin-1

Одним из ключевых представителей семейства CTLR является кластер рецепторов Dectin-1. В эту группу входят такие рецепторы, как CLEC7A (Dectin-1 – название совпадает с названием всего кластера), CLEC9A, CLEC-2, CLEC-1, M1CL, MАН и LOX1. Хотя точные углеводные лиганды для CLEC-1, CLEC-2 и LOX-1 пока не до конца изучены, эти рецепторы играют важную роль в качестве контрольных точек иммунной системы. Например, CLEC-1 взаимодействует с DAMP (молекулы, высвобождающиеся при повреждении тканей) и инициирует провоспалительные реакции в дендритных клетках и макрофагах [Lopez Robles M.D. et al., 2017]. CLEC-2 связывается с подопланином, который экспрессируется в лимфатических эндотелиальных, миелоидных и ретикулярных фибробластных клетках, способствуя миграции дендритных клеток и усиливая выработку противовоспалительного цитокина IL-10 в сочетании с LPS [Bourne J.H. et al., 2021].

Лектиноподобный рецептор окисленных липопротеинов низкой плотности-1 (LOX-1) представляет собой рецептор-мусорщик, экспрессируемый в различных типах клеток, включая эндотелиальные и гладкомышечные клетки сосудов, кардиомиоциты, адипоциты, тромбоциты, моноциты, макрофаги, дендритные клетки (ДК), В-лимфоциты и хондроциты [Yoshida H. et al., 1998; Hashimoto K. et al., 2017]. Взаимодействие этого рецептора с окисленными липопротеинами низкой плотности инициирует внутриклеточные сигнальные каскады в эндотелиальных клетках, тромбоцитах, макрофагах, гладкомышечных клетках и кардиомиоцитах через пути NF- κ B, митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и каспазы. LOX-1 также функционирует как рецептор-мусорщик в врожденном иммунитете [Barreto J. et al., 2020].

Кластер рецепторов Dectin-1 представляет собой группу V CTLR, содержащую один CTLD и трансмембранную часть. Рецепторы этой группы характеризуются наличием одного ITEM-подобного мотива, иммунорецепторных тирозин-ингибирующих мотивов

(ITIM) и домена эффектора смерти (DED) на их внутриклеточной части. Рецептор Dectin-1, являясь трансмембранным рецептором типа II, участвует в распознавании различных β -глюканов и является основным лейкоцитарным рецептором для идентификации инфекционных агентов, таких как бактерии, простейшие и грибы. Минимальная длина распознаваемых β -(1 $\rightarrow$ 3)-глюканов составляет всего 9–10 моносахаридных единиц, а наличие боковых β -(1 $\rightarrow$ 6) связей значительно увеличивает сродство и эффективность их взаимодействия с рецептором. После связывания β -глюкана, Dectin-1 активирует сигнальный путь Syk-киназы через ITЕМ-подобный мотив, приводящий к фосфорилированию и активации фосфолипазы C γ (PLC γ) и CARD9-зависимых каскадов. Далее, активация PLC γ инициирует продукцию вторичных мессенджеров, включая инозитол-1,4,5-трифосфат (IP3) и диацилглицерин (DAG), что ведет к мобилизации внутриклеточного кальция и активации протеинкиназы C (PKC). В конечном счете, активация этих каскадов приводит к экспрессии провоспалительных цитокинов и усилению фагоцитоза, играя ключевую роль в противогрибковом иммунном ответе [Wagener M. et al., 2018].

Известно, что Dectin-1 способен вызывать провоспалительный ответ, активируя экспрессию ряда генов, ответственных за действие естественных киллеров, и инициируя иммунные ответы Th1 и Th17 [Gringhuis S.I. et al., 2022]. Эти рецепторы присутствуют на мембранах многих фагоцитарных клеток, включая макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки, которые способны распознавать β -глюканы [Deerhake M.E. et al., 2021]. В макрофагах активация Dectin-1 приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α и IL-12, через NF- κ B сигнальный путь. В дендритных клетках стимуляция Dectin-1 вызывает активацию адаптивного иммунного ответа путем созревания и миграции этих клеток в лимфатические узлы. Кроме того, рецепторы из этого кластера играют важную роль в различных патологиях. Например, рецептор CLEC7A был обнаружен в опухолевых клеточных линиях молочной железы [Shiao S.L. et al., 2021], что дало возможность эффективно применять β -глюканы в онкологических моделях, таких как меланома, нейробластома, лимфома, рак легких, молочной железы и желудка [Ikewaki N. et al. 2022; Mishra V. et al., 2023]. В опухолевых клетках Dectin-1 может способствовать активации MAPK-путей, регулирующих пролиферацию и метастазирование, что, с одной стороны, указывает на его роль в прогрессии рака, а с другой – открывает терапевтические возможности для воздействия на этот рецептор. β -глюканы, связываясь с Dectin-1 на опухолевых клетках, также могут индуцировать апоптоз, что является дополнительным механизмом противоопухолевого действия. Один из механизмов этой активности заключается в том, что β -глюканы стимулируют переход иммуносупрессивных макрофагов

в макрофаги типа M1, которые способны выполнять противоопухолевые функции [Zhu Z. et al., 2023]. Этот процесс сопровождается активацией IFN- γ и iNOS сигнальных путей в макрофагах, способствующих усилению фагоцитоза и презентации антигена опухолевым клеткам. Таким образом, β -глюканы могут перепрограммировать микроокружение опухоли, делая его более враждебным к опухолевым клеткам. Кроме того, β -глюканы активируют цитотоксические Т-клетки и усиливают цитотоксическую активность NK-клеток [Ding J. et al., 2015; Lee Y.J. et al., 2017]. В этих клетках Dectin-1 может взаимодействовать с другими рецепторами, такими как NKG2D, потенцируя их цитотоксическую активность через сигнальные каскады, связанные с перфорином и гранзимами. Эта кооперация усиливает эффективность иммунного ответа против опухолей и инфицированных клеток.

С другой стороны, активация Dectin-1 подавляет сигнализацию через TLR4, что приводит к снижению воспалительного ответа и уменьшению экспрессии TNF α , IL-6 и хемокинов [Seifert L. et al., 2015]. Этот механизм регуляции воспаления включает в себя ингибирование MyD88-зависимого сигнального пути TLR4 через активацию фосфатаз, что уменьшает транскрипцию провоспалительных цитокинов. В итоге, это способствует разрешению воспаления и предотвращает избыточный иммунный ответ. Взаимодействуя с лигандами, такими как Galectin 3/9, Dectin-1 может запускать процессы иммунной толерантности, что, в свою очередь, способствует ингибированию роста опухолевой ткани [Daley D. et al., 2017]. Галектин-3, связываясь с Dectin-1, может активировать каскад сигнальных событий, приводящих к экспрессии иммуносупрессивных цитокинов, таких как IL-10 и TGF- β . Это взаимодействие способствует развитию толерантности к опухоли и ее ускользанию от иммунного надзора.

Активация Dectin-1 представляет собой сложный процесс, способный как усиливать, так и подавлять воспалительные реакции в зависимости от типа и свойств лиганда, состояния клетки, микроокружения и активности других клеточных рецепторов. Данный рецептор способен инициировать противогрибковый Th1-зависимый иммунный ответ и широкий спектр клеточных реакций [Salazar F. and Brown G.D., 2018]. Важно отметить, что активация Dectin-1 в различных иммунных клетках приводит к дифференцированной активации транскрипционных факторов, таких как NFAT, AP-1 и CREB, что обуславливает многообразие его биологических эффектов и специфичность иммунного ответа в контексте конкретной патологии. ITAM-подобный мотив, расположенный на внутриклеточной части Dectin-1, опосредует его сигнальную функцию через фосфорилирование тирозинкиназой Src. Тирозинкиназа селезенки Syk, являющаяся ключевым адапторным белком, индуцирует CARD9-Bcl10-Malt1 сигнальный комплекс, что приводит к образованию активных форм кислорода (ROS), активации транскрипционного фактора NF- κ B и секреции

провоспалительных цитокинов. Syk-зависимую сигнализацию способны осуществлять лишь рецепторы Dectin-1, CLEC-2 и CLEC9A. Syk активирует передачу внутриклеточных сигнальных каскадов через адапторные белки CARD9 и MAP-киназы, что ведет к активации дельта-типа протеинкиназы C (PKC δ). PKC δ , в свою очередь, контролирует комплекс кальциневрина/NFAT, инфламмасому ROS/NLRP3 и фосфорилирование CARD9-BCL10-Malt1. CARD9 может активировать NF- κ B или NIK. Таким образом, Dectin-1 интегрирует сигналы от внешнего микроокружения и направляет их через сложную сеть адапторных белков к соответствующим сигнальным путям, обеспечивая тонкую настройку иммунного ответа [Strasser D. et al., 2012; Cai Y. and Wu K., 2024].

1.3.2. Dectin-2

Рецепторы семейства Dectin-2, включая антиген 2 дендритных клеток крови (BDCA2), рецептор активации дендритных клеток (DCAR), иммунорецептор дендритных клеток (DCIR), суперсемейство 8 лектинов C-типа (CLECSF8) и лектин C-типа, индуцированный макрофагами (Mincle), экспрессируются в различных клетках. Эти рецепторы содержат один внеклеточный консервативный CTLD и способны опосредовать внутриклеточную сигнализацию как напрямую через интегральные сигнальные домены, так и через ассоциацию с сигнальными адаптерными молекулами. Семейство Dectin-2 распознает широкий спектр эндогенных и экзогенных лигандов и может функционировать как PRR для различных патогенов (грибков, бактерий и гельминтов), модулируя различные компоненты иммунной системы [Malamud M. and Brown G.D., 2024]. Dectin-2 связывается с углеводами, взаимодействуя с остатками маннозы, что особенно важно для α -маннанов, и определяет его роль в иммунитете и аллергии. Связывание лиганда с Dectin-2 приводит к выработке ROS и оттоку калия, что активирует сборку инфламмасы NLRP3 и обработку proIL-1 β [Tavares A.H. et al., 2015].

С точки зрения влияния углеводов на иммунный ответ, интерес представляют hBDCA-2, mDECTIN-2 и mMINCLE, поскольку их лиганды содержат углеводные последовательности: сиало-галактозил-олигосахариды с концевыми β -(1 $\rightarrow$ 3)- и β -(1 $\rightarrow$ 4)-галактозами для hBDCA-2, α -маннаны для mDECTIN-2 и трегалозо-димиколат (антиген клеточной стенки микобактерий) и его синтетический аналог трегалозо-дигегенат для mMINCLE [Lang R., 2013; Choi J.Y. et al., 2020; Kim H.W. et al., 2024].

Dectin-2, как и Dectin-1, активно участвует в иммунном ответе на инфекции, особенно грибковые. Он распознает специфические углеводы, такие как α -маннаны, которые присутствуют на поверхности грибов, и запускает сигнальные каскады,

способствующие активации иммунных клеток [Kirkland T.N. and Fierer J., 2020]. При связывании с лигандами Dectin-2 инициирует активацию различных клеточных сигнальных путей, включая путь инфламмасомы NLRP3, что приводит к продукции проинфламматорных цитокинов IL-1 β и IL-6. Это, в свою очередь, способствует активации клеток Th17, которые играют ключевую роль в защите против грибковых инфекций и в патогенезе различных аутоиммунных заболеваний [Zheng, D. et al., 2020; Lee J.S. and Kim C., 2024].

Кроме того, Dectin-2 может взаимодействовать с другими рецепторами, такими как TLRs, что усиливает иммунный ответ на патогены. Это взаимодействие может приводить к кооперативной активации различных сигнальных путей, что усиливает продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также активирует фагоцитоз [Malamud M. and Brown G.D., 2024]. Например, активация Dectin-2 в сочетании с CD209a может приводить к усиленному производству IL-1 и IL-23, что важно для формирования эффективного иммунного ответа [Kalantari P. et al., 2018].

Dectin-2 также играет важную роль в контексте аллергических реакций и хронического воспаления. Его взаимодействие с лигандами способствует продукции IL-4, IL-5 и IL-13 и активации эозинофилов, что связано с патогенезом аллергических заболеваний [Norimoto A. et al., 2014]. В этом контексте важно отметить, что Dectin-2 может выступать как мишень для профилактических и терапевтических вмешательств, направленных на модуляцию иммунного ответа [Clarke D. et al., 2014; Chen M.H. Et al., 2019; Salkeni M.A. et al., 2024].

1.3.5. Dectin-3

Макрофагальный лектин С-типа (MCL), также известный как Dectin-3, представляет собой трансмембранный рецептор лектинов С-типа (CLR), экспрессируемый в макрофагах [Balch S.G. et al., 1998], моноцитах, нейтрофилах и дендритных клетках. Фактор некроза опухоли (TNF) способен повышать экспрессию Dectin-3, Mincle и Dectin-2 в макрофагах [Schick J. et al, 2020]. Dectin-3, взаимодействуя с адаптерным белком FcR γ [Miyake Y. et al., 2013], функционирует как активирующий рецептор, способный инициировать иммунные сигнальные пути через тирозинкиназу Syk, CARD9 и NF- κ B, что играет важную роль в антимикробной защите, фагоцитозе, экспрессии цитокинов и респираторном взрыве [Graham L.M. et al., 2012]. Рецептор Dectin-3 состоит из трех частей: мембранной, цитоплазматической и внеклеточной. В его структуре отсутствуют ITIM и ITAM [Hou H. et al., 2017; Li M. et al., 2022].

Dectin-3 способен распознавать определенные α -маннаны, входящие в состав клеточных стенок бактерий и грибов [Zhao XQ et al., 2014]. Механизм активации Dectin-3 аналогичен таковому для Dectin-2: после связывания с лигандом происходит взаимодействие с адаптерным белком FcR γ . Этот комплекс активирует тирозинкиназу Syk и инициирует образование мультимолекулярного комплекса CARD9-Bcl10-Malt1, что, в свою очередь, приводит к активации сигнального пути NF- κ B. В результате происходит индукция выработки провоспалительных цитокинов и стимуляция иммунного ответа организма [Li D. et al., 2021].

Дектин-3 может образовывать гетеродимеры с Dectin-2, что обеспечивает синергетический эффект в противодействии грибковым инфекциям. Исследования, проведенные Zhu с соавторами, продемонстрировали *in vivo* и *in vitro*, что гетеродимеризация Dectin-2 и Dectin-3 повышает чувствительность врожденной иммунной системы к *Candida albicans* и индуцирует усиленную продукцию цитокинов, таких как TNF- α и IL-6 [Zhu L.L. et al., 2013]. Ингибирующие антитела к обоим рецепторам снижают выживаемость мышей, инфицированных *Candida albicans*, что подтверждает важность их совместной работы в противогрибковом иммунитете.

Кроме того, показано, что α -(1 $\rightarrow$ 2)- и α -(1 $\rightarrow$ 6)-маннопротеины, взаимодействуя с клеточными рецепторами, могут способствовать пролиферации клеток и ингибированию апоптоза посредством активации сигнального пути Akt. Активация данного пути приводит к усилению клеточного роста и повышению выживаемости клеток [Jiang H.-H., et al., 2019].

1.3.6. Mincle

Mincle (индуцируемый макрофагом лектин С-типа) усиленно экспрессируется на поверхности макрофагов после воздействия различных стимулов (стерины, β -глюкозилцерамиды, α -манноза, глицерогликолипид и маннозиловые жирные кислоты, связанные с маннитолом) [Yamasaki S. et al., 2008; Huang X. et al., 2023]. Этот рецептор играет ключевую роль в распознавании различных экзо- и эндогенных лигандов и является важным паттерн-распознающим рецептором для противогрибковой защиты [Yamasaki S. et al., 2009]. Mincle способен распознавать широкий спектр молекулярных паттернов, ассоциированных с патогенами (PAMP) и молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждениями (DAMP) [Williams S.J., 2017]. К экзогенным лигандам относятся такие молекулы, как грибковая α -манноза, гликолипиды микобактерий и димиколат трегалозы [Holzheimer M. et al., 2021]. Особенно важно, что трегалоза-димиколат, корд-фактор *Mycobacterium tuberculosis*, ингибирует слияние лизосомы и фагосомы,

позволяя микобактериям избегать иммунного ответа [Ishikawa E et al., 2009]. Дополнительные DAMP, распознаваемые рецептором: различные формы холестерина, β -глюкозилцерамиды (β -GlcCer) и сплайсосомный белок SAP130 [Kiyotake R. et al., 2015; Nagata M. et al., 2017], который высвобождается при гибели клеток.

Mincle обычно функционирует как активирующий рецептор, который взаимодействует с ITAM-содержащим FcR γ и инициирует нижележащие сигнальные пути посредством рекрутирования тирозинкиназы Syk, формирования комплекса CARD9/Bcl-10/MALT1 и активации NF- κ B. Это приводит к индукции иммунных ответов, включая выработку цитокинов и хемокинов, а также рекрутирование иммунокомпетентных клеток [del Fresno C. et al., 2018].

Mincle у мышей отвечает за функцию выявления комменсалов в пейеровых бляшках кишечника, регулируя продукцию интерлейкина-17 (IL-17) и интерлейкина-22 (IL-22) врожденными лимфоидными клетками (ILC) и Т-клетками. Это обеспечивает выработку ряда кишечных антимикробных белков (например, RegIII γ , IgA) и, в конечном итоге, ограничивает аберрантную микробную транслокацию [Martinez-Lopez M. et al., 2019].

Mincle взаимодействует с общей γ -цепью Fc-рецептора (FcR γ), что активирует внутриклеточный сигнальный каскад через Syk. Это, в свою очередь, приводит к активации CARD9-зависимого пути через NF- κ B. Киназа Syk стимулирует мобилизацию внутриклеточного кальция и активацию пути через кальциневрин-NFAT. Активация Mincle ведет к экспрессии различных цитокинов (TNF, IL-2, KC, IL-10, IL-6, CXCL1/2), активации NALP3 (цитоплазматический Nod-подобный рецептор семейства NALP, участвующий в активации каспаз 3 и 5, образовании инфламмосомы и активных IL-1 β и IL-18) и респираторному взрыву, что является ключевым элементом иммунного ответа на патогены [Ishikawa E. et al., 2009].

1.3.7. Антиген 2 дендритных клеток крови (BDCA2)

BDCA2 (CD303) представляет собой лектин С-типа II типа, который экспонируется на поверхности плазмацитоидных дендритных клеток. Эти клетки являются основными продуцентами интерферона I (IFN-I) и играют важную роль как во врожденном, так и в адаптивном иммунитете. Рецептор BDCA2 способен интернализироваться через клатрин-опосредованный эндоцитоз и также может ингибировать экспрессию генов IFN-I [Röck J. et al., 2007; Pellerin A. et al., 2015].

BDCA2 связывается с остатками маннозы, глюкозы или N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и может селективно взаимодействовать с N-связанными галактозо-

терминированными гликанами, что приводит к противовоспалительному ответу. Взаимодействие с маннозой происходит с участием Ca^{2+} в основном сайте связывания, что характерно для С-типа CRD, тогда как остатки GlcNAc и галактозы могут связываться с белковой неглубокой бороздкой, находящейся рядом с основным сайтом связывания, что было подтверждено данными рентгеноструктурного анализа. BDCA2 также может связываться с гликанами (с остатками галактозы) в доменах константной области IgG с аффинностью до 1 мкМ, что позволяет рассматривать его в качестве еще одного Fc-рецептора [Jégouzo S.A. et al., 2015; Kim J.-W. et al., 2018].

1.3.8. DC-SIGN

DC-SIGN (CD-209) является лектином С-типа, презентуется на поверхности дендритных клеток и участвует в распознавании различных вирусов (таких как ВИЧ-1, вирус гепатита С, вирус денге, цитомегаловирус и вирус Эбола), а также микробов рода *Leishmania* и грибов рода *Candida*. Этот трансмембранный белок II типа имеет один CRD в своем внеклеточном домене и экспрессируется в незрелых моноцитарных дендритных клетках. Этот рецептор способен связывать ICAM-3 на Т-клетках во вторичных лимфоидных органах для обеспечения первичного контакта между этими клетками. DC-SIGN распознает определенные углеводные структуры, богатые маннозой или фукозой, на поверхности патогенов. Связывание лиганда с DC-SIGN запускает эндоцитоз в эндолизосомальных компартментах и последующую презентацию антигена через молекулы главного комплекса гистосовместимости класса I (MHC-I) и класса II (MHC-II) [Berzi A. et al., 2016].

Каноническая изоформа DC-SIGN представляет собой трансмембранный белок с ММ 46 кДа, состоящий из 404 аминокислот [Geijtenbeek T.B. et al., 2000; Caminschi I. et al., 2006; Sales Pereira L.H. et al., 2021]. Его внеклеточная область содержит Ca^{2+} -зависимый углевод-связывающий лектиновый домен. CRD в CTLD часто содержит трипептидные мотивы EPN (Glu-Pro-Asn) или QPD (Gln-Pro-Asp) [Lee R.T. et al., 2011].

Домен «шеи» (Neck) является характерной структурной особенностью DC-SIGN, необходимой для мультимеризации [Gupta G.S. and Gupta R.K., 2012.]. Дисульфидные мостики в домене CTLD поддерживают мультимеризацию домена шеи. Наличие протяженного α -спирального участка в домене шеи позволяет рецептору тетрамеризоваться независимо от CRD [Yu Q.D. et al., 2009]. Мультимеризация домена шеи DC-SIGN дополнительно стабилизирует рецептор и влияет на распознавание патогенов. Процесс тетрамеризации является рН-зависимым и влияет на константу связывания

лигандов [Jégouzo S.A. et al., 2013]. Домен шеи является основным для полимеризации рецептора.

DC-SIGN способен модулировать сигнализацию TLR через путь NF-κB. Взаимодействие с рецептором инициирует сигнальные каскады через сериновые и треониновые киназы Raf-1, что приводит к ацетилированию субъединицы p65 NF-κB и увеличению транскрипции IL-10, что усиливает продукцию противовоспалительных цитокинов. Среди патогенов, взаимодействующих с DC-SIGN, можно отметить *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Candida albicans*, вирусы кори и ВИЧ-1, что позволяет им избегать действия иммунной системы за счет ингибирования сигналов с TLR-рецепторов [van Kooyk, Y. and Geijtenbeek T., 2003; Gringhuis S.I. et al., 2007; den Dunnen J. et al., 2009; Sales Pereira L.H. et al., 2021].

Кроме того, DC-SIGN и его родственный рецептор DC-SIGNR участвуют в межклеточных взаимодействиях в иммунной системе, связываясь с ICAM-3. Лигандом для DC-SIGN служат остатки маннозы и родственные сахара, такие как олигосахарид Man9GlcNAc2 [Mitchell D.A. et al., 2001].

1.3.9. CLEC9A

CLEC9A, синонимичное название – DNGR-1, представляет собой рецептор, который находится на поверхности моноклеарных клеток периферической крови, включая лейкоциты, дендритные клетки и NK-клетки [Schreibelt G. et al., 2012]. Этот рецептор способен связываться как с апоптотическими, так и с некротическими клетками, используя открытые актиновые филаменты и β-глюканы, такие как зимозан. Распознает нитевидную форму актина в ассоциации с актин-связывающими доменами цитоскелетных белков, включая спектрин, которые становятся доступными для связывания при повреждении клеточных мембран. CLEC9A относится к классу V лектинов C-типа (CTLR) и содержит один внеклеточный домен CTLD, в структуре которого присутствуют шесть остатков цистеина, образующих дисульфидные мостики для стабилизации доменной структуры. Внутриклеточный домен CLEC9A включает сигнальную последовательность, аналогичную ITAM, и соединен с внеклеточным доменом через трансмембранный участок. Активация CLEC9A инициирует внутриклеточную сигнализацию через киназу Syk, что способствует иммунному ответу [Huysamen C. et al., 2008; Hanč P. et al., 2016]. В последнее время этот рецептор рассматривается в качестве мишени в противоопухолевой терапии. Так, например, был создан специфический интерферон I типа к Clec9A-PD-L1 для изменения опухолевого

микроокружения, что привело к появлению проиммуногенных макрофагов и нейтрофилов [Van Lint S. et al., 2023].

1.3.10. Маннозные рецепторы (MR)

Эти рецепторы находятся на поверхности фагоцитов, тканевых макрофагов, лимфоидных и эндотелиальных клеток печени, эпителиальных клеток сетчатки, антигенпрезентирующих клеток сердечной и скелетных мышц и являются маннан-связывающими лектинами суперсемейства лектинов С-типа. MR представляет собой трансмембранный белок с относительной ММ около 175 кДа, содержащий пять структурных доменов: N-концевая богатая цистеином область (CR), область фибронектина II типа, домены распознавания углеводов С-типа, трансмембранная область и цитоплазматическая область. CR может участвовать в связывании сульфатированных углеводов, а Ca^{2+} -зависимые CRD могут связываться с гликоконъюгатами L-фукозы, D-маннозы и GlcNAc. У человека семейство MR включает четыре основных рецептора: CD206, рецептор фосфолипазы A2 (PLA2), DEC-205 и Endo180. Все эти рецепторы содержат домен лектина R-типа, что и определяет их название. MR – крупные химерные трансмембранные гликопротеины I типа, которые включают один домен фибронектина II типа и несколько доменов CTLD, что также позволяет называть их лектинами С-типа. Некоторые из CTLD в MR и Endo180 способны связывать гликаны, что способствует клатрин-зависимому эндоцитозу и захвату внеклеточных лигандов, содержащих гликан. Эти рецепторы могут связывать лиганды как в «цис», так и в «транс» конформациях, что означает, что они взаимодействуют как с гликоконъюгатами клеточной мембраны, так и с растворимыми лигандами [van der Zande H. et al., 2021; Cummings R.D., 2022; Yee E.J. et al., 2024].

MR экспрессируются макрофагами, дендритными клетками и эндотелиальными клетками печени. Эти рецепторы являются уникальными многофункциональными лектинами, содержащими домен лектина К-типа и несколько доменов лектинов С-типа. Лигандами для MR являются различные гликаны, присутствующие, в том числе, на поверхности микроорганизмов: N-ацетилглюкозамин, дрожжевые маннаны, липоарабиноманнаны микобактерий и маннозосодержащие олигосахариды вирусов. Важно отметить, что белок, связывающий маннозу (MBL), взаимодействует с углеводами гликопротеина gp120 ВИЧ-1 и может ингибировать захват и распространение ВИЧ, опосредованное DC-SIGN [Jin C. et al., 2016; Pustynnikov S. et al., 2016]. Связывание MBL с лигандом активирует эндоцитоз, что подчеркивает его роль в иммунном ответе, включая

стимуляцию поглощения полиморфноядерными клетками, опсонизацию патогенов и активацию лектинового пути системы комплемента [Jack D.L. et al., 2005; Feinberg H. et al., 2021; Kalia N. et al., 2021].

Связывание с лигандами происходит через три различных типа белковых доменов. Домен R-типа в N-концевой части MBL связывается с остатками сульфатированного N-ацетилгалактозамина (4-SO₄-GalNAc) на невосстанавливающих концах гликанов. Домен фибронектина II типа связывается с фрагментами тройной спирали коллагена. Третий домен состоит из восьми лектиноподобных доменов C-типа, которые отвечают за связывание с углеводными остатками; один из этих доменов способен распознавать и связывать маннозосодержащие олигосахариды в отсутствие других доменов. Взаимодействие этих доменов с лигандами может приводить как к клатрин-зависимой интернализации и лизосомальной деградации патогенов, так и к фагоцитозу неионизированных лигандов. MR участвует в распознавании микроорганизмов, таких как *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*, *Leishmania donovani* и *Mycobacterium tuberculosis*, а также в созревании макрофагов и дендритных клеток [Porcaro I et al., 2003; Zhao X. et al., 2015; Feinberg H. et al., 2021]. Кроме того, при лиганд-рецепторном взаимодействии стимулируется фагоцитоз, презентация антигенов, стимулируется выработка цитокинов (IL-1, IL-6, IL-17, GM-CSF, TNF и другие) и других различных провоспалительных трансмиссоров, включая активные формы кислорода и азота [Yamamoto Y. et al., 1997; van de Veerdonk FL et al., 2009]. MR-опосредованная презентация антигенов и активация Т-клеток в настоящий момент рассматривается в качестве одного из перспективных подходов к терапии при онкологических заболеваниях и стимулированию иммунного ответа к антигену при вакцинации. Для этого уже разработан ряд синтетических манноза-содержащих молекул [Paurević M. et al., 2024].

1.3.11. Endo180

Endo180, также известный как CD280 или MK2, является рецептором с молекулярной массой 180 кДа, обнаруженным на макрофагах, моноцитах и фибробластах человека. Он экспрессируется инвазивными опухолями молочной железы человека. Endo180 является конститутивно рециркулирующим эндоцитарным рецептором, который участвует в таких процессах, как сигналинг из эндосомальных компартментов для генерации пространственно локализованной сократимости, ремоделирование внеклеточного матрикса и стимулировании миграции опухолевых клеток при повышенной экспрессии, за счет активного связывания коллагена. Endo180 состоит из нескольких

ключевых доменов: N-концевого цистеин-богатого домена (CR), фибронектиноподобных доменов типа II (FNII), трансмембранного домена и короткого цитоплазматического хвоста. Основная функция Endo180 связана с эндоцитозом и метаболизмом компонентов внеклеточного матрикса (ВМ), в частности коллагена. Он распознает и связывает различные лиганды, включая денатурированный коллаген, фибронектин и ламинин, способствуя их интернализации через клатрин-опосредованный эндоцитоз.

Кроме того, N-ацетилглюкозамин, манноза и фукоза выступают в качестве его лигандов, связываясь с CTLD доменом при участии ионов кальция. Четыре концевых домена формируют участок, ответственный за связывание с коллагеном, коллектинами и углеводами. Коллектины играют активную роль в процессах воспаления и фиброза. Endo180 участвует в эндоцитозе коллектинов из поврежденной ткани фибробластами, что подчеркивает его значимость как иммунорегуляторного рецептора. Гликозилированные лиганды Endo-180 подвергаются клатрин-опосредованному эндоцитозу, что приводит к их интернализации из внеклеточного пространства и доставке в эндосомальный компартмент. [Howard M.J. et al., 2002; Wienke D. et al., 2007; Gucciardo F. et al., 2022; Zhao Z. et al. 2022].

1.3.12. Галактозоподобный лектин макрофагов человека (MGL)

MGL экспрессируется в различных тканях и органах, особенно в лимфоидных тканях, таких как лимфатические узлы и селезенка. Представляет собой трансмембранный белок II типа, который включает короткий N-концевой цитоплазматический домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен. Внеклеточный домен содержит CRD, который включает мотивы глутамин-пролин-аспарагиновая кислота и триптофан-аспарагин-аспарагиновая кислота, отвечающие за распознавание субстрата. MGL экспрессируется дендритными клетками и макрофагами. Лигандами этого рецептора являются терминальные комплексы, содержащие уроновые кислоты (GalNAc и GalNAc-Ser/Thr) и/или LacdiNA. MGL распознает антигены, связанные с опухолеассоциированным муцином и эффекторными Т-клетками, и играет важную роль в гомеостазе адаптивного иммунитета, включая противоопухолевую защиту. CRD MGL специфично связывается с β -связанными галактозой или GalNAc, представленными на гликопротеинах и гликолипидах. В отличие от других лектинов С-типа, MGL характеризуется узкой лигандной специфичностью, что делает его более избирательным в распознавании конкретных углеводных структур. Важно отметить, что MGL не связывается с маннозой, в отличие от других лектинов С-типа. У мышей гомологичные рецепторы MGL1

и MGL2 специфически распознают углеводные последовательности и участвуют в иммунной регуляции [Singh S.K. et al., 2009; Szczekutowicz J. et al., 2023].

MGL участвует в различных клеточных процессах: распознавании патогенов (связывает гликозилированные компоненты, присутствующие на поверхности патогенов, таких как грибы и некоторые бактерии, способствуя их фагоцитозу); клиренсе апоптотических клеток (распознает апоптотические клетки, связываясь с гликозилированными компонентами); модуляции иммунного ответа (посредством связывания с различными лигандами, что приводит к активации сигнальных путей и высвобождению цитокинов; в дифференцировке и активации ДК, влияя на развитие Т-клеточного иммунитета); в тканевом гомеостазе (связывается с компонентами внеклеточного матрикса и регулирует ремоделирование и организацию тканей) [Gucciardo F. et al., 2022].

1.3.13. Лангерин

Лангерин (CD207) — это трансмембранный белок II типа, который экспрессируется клетками Лангерганса и играет ключевую роль в захвате, обработке и презентации антигенов, способствуя индукции иммунных реакций. Он распознает свои лиганды (эпитопы маннозы, фукозы, N-ацетилманнозамина (ManNAc), GlcNAc, сульфатированные углеводы, гепарин, глюкозу, галактозу и β -глюканы из клеточных стенок грибов) в присутствии ионов Ca^{2+} , что приводит к его интернализации и запуску процесса презентации антигена [Xuan S. et al., 2022].

Лангерин имеет типичную для лектинов С-типа структуру, включающую внеклеточный CRD, трансмембранный домен и цитоплазматический хвост. CRD лангерина связывается с маннозой и фукозой, присутствующими на гликопротеинах и гликолипидах. В частности, он проявляет высокую аффинность к α -связанной маннозе, что делает его эффективным рецептором для связывания с микроорганизмами, богатыми маннозой, такими как грибы и некоторые бактерии. Важно отметить, что лангерин способен формировать тримерные структуры на поверхности клетки, что усиливает его связывающую способность. Помимо CRD, лангерин содержит дополнительный сайт связывания сульфатированных углеводов, благодаря остатку лизина [Feinberg H. et al., 2013; Cramer J., 2021].

Хотя точная иммунологическая роль лангерина еще не установлена, его участие в захвате вирионов ВИЧ-1, их деградации в гранулах Бирбека и предотвращении заражения Т-клеток представляет собой интересный аспект исследования [van den Berg, L.M. et al.,

2014]. Лангерин участвует в представлении антигенов Т-клеткам через молекулы МНС I и II классов, что ведет к активации CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов, соответственно. В этом контексте Лангерин можно рассматривать как антагонист рецептора DC-SIGN, который, напротив, может способствовать развитию инфекции ВИЧ [Kervevan J. et al., 2021]. Кроме того, отмечается роль Лангерина в проникновении *Yersinia pestis* в клетки за счет лиганд-рецептор-опосредованного взаимодействия олигосахаридных остатков [Yang K. et al., 2015].

1.3.14. Толл-подобные рецепторы (TLR)

Толл-подобные рецепторы (TLR) представляют собой ключевые PRR в иммунокомпетентных клетках [O'Neill L.A. et al., 2013]. Это семейство рецепторов эволюционно консервативно и имеет древние корни с некоторыми структурными доменами, обнаруженными даже у растений и низших многоклеточных организмов. TLR, за исключением TLR-4, могут находиться на поверхности цитоплазматических мембран или быть ассоциированными с мембранами лизосом и других везикул. В частности, TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 и TLR-10 находятся на цитоплазматической мембране, тогда как TLR-3, TLR-7, TLR-8 и TLR-9 локализованы на мембранах лизосом.

На сегодняшний день идентифицировано 13 типов TLR (10 у человека и 11 у мышей), которые выполняют основные иммунологические функции, распознавая специфические молекулы на поверхности антигенов. Первые девять TLR идентичны у человека и мышей, TLR-10 обнаружен только у человека, а TLR-11 — только у мышей. В человеческом организме отсутствуют TLR-11, TLR-12 и TLR-13.

Все TLR являются трансмембранными гликопротеинами типа 1 с ММ от 95 до 115 кДа. Они содержат подковообразный лиганд-связывающий домен, известный как LRR (лейцин-богатый повтор), и сигнальный домен TIR (Toll/IL-1R), который структурно схож с рецептором IL-1. Взаимодействие с адаптерными молекулами происходит через домен TIR, состоящий из центрального β -слоя, окруженного пятью α -спиралями. Короткая трансмембранная область соединяет TIR и LRR, обеспечивая интеграцию в цитоплазматическую или лизосомальную мембрану. Сигнальная функция TLR обусловлена механизмами обратимого фосфорилирования и убиквитинирования. При связывании лиганда происходят конформационные изменения, приводящие к димеризации рецепторов и образованию гомодимерных или гетеродимерных комплексов TIR-TIR, связанных с адаптерными белками, такими как MyD88, TRIF/TICAM1, TIRAP/MAL и TRAM/TICAM-2/TIRP [El-Zayat S.R. et al., 2019]. Основной путь активации иммунного ответа через TLR осуществляется по пути NF- κ B через адаптер MyD88 с участием различных киназ, включая

IRAK, TAK-1 и TBK-1/IKKi. Существуют также альтернативные пути, такие как PI3K и TRIF, которые могут инициировать апоптоз или стимулировать выработку провоспалительных цитокинов и противовирусный иммунный ответ [Lester S.N. and Li K., 2014; Fitzgerald K.A. and Kagan J.C., 2020].

TLR-10 модулирует функции TLR-2 в процессе воспаления, однако его собственный лиганд и биологическая функция остаются невыясненными. Его наличие подтверждено только у высших позвоночных [Rodrigues C.R. et al., 2024].

Каждый TLR специфичен к различным патогенам, включая как грамположительные (TLR-1, TLR-6), так и грамотрицательные бактерии (TLR-4, TLR-5), вирусы (TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9), а также простейшие и грибы (TLR-1, TLR-2, TLR-6). В данном обзоре акцент будет сделан на TLR, лигандами которых являются полисахариды или их фрагменты: TLR-2, TLR-4 и TLR-6.

Рецепторы TLR-1, TLR-2, TLR-6 и TLR-10 образуют суперсемейство TLR-2, димеризуясь для распознавания патогенов и передачи сигнала в клетку. TLR-1, взаимодействуя с TLR-2, распознает триацилированные липопептиды, в то время как диацелированные липопептиды связываются димером TLR-6/TLR-2 [Takeuchi O. et al., 2001; 2002].

TLR-2 обладает самым широким спектром распознавания микробиологических молекул, что, вероятно, связано не только с его способностью распознавать паттерны, но и с возможностью димеризации с другими рецепторами, что усиливает и модифицирует сродство димерного комплекса. Он способен распознавать пептидогликаны, липотейхоевые кислоты и липопротеины грамположительных бактерий, липоарабиноманнаны микобактерий, белки оболочки SARS-CoV-2, дрожжевой зимозан и некоторые типы LPS [Girard R. et al., 2003; Zheng, M. et al., 2021; Colleselli K. et al., 2023].

Одним из наиболее изученных представителей семейства TLR является TLR-4. Он активно экспрессируется практически во всех иммунокомпетентных клетках: макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, естественные киллеры, тучные клетки, эозинофилы и базофилы [Delneste Y., 2007], и играет ключевую роль в активации и координации врожденного иммунного ответа при проникновении патогенов.

Наиболее известным лигандом этого рецептора является LPS, полученный из грамотрицательных бактерий. Напрямую LPS не может связаться с TLR-4, для образования комплекса TLR-4/LPS необходим адаптерный белок — фактор дифференцировки миелоидных клеток 2 (MD-2) [Kim H.J. et al., 2023]. TLR-4 представляет собой трансмембранный рецептор, состоящий из внеклеточного лектинового домена, трансмембранного сегмента и внутриклеточного TIR домена. Внеклеточный домен TLR-4

играет ключевую роль в распознавании лигандов. Содержит несколько консервативных цистеиновых остатков, участвующих в формировании дисульфидных связей и придающих ему специфическую конформацию. Трансмембранный домен обеспечивает закрепление рецептора в плазматической мембране. Внутриклеточный TIR домен TLR-4 важен для активации внутриклеточных сигнальных каскадов. В комплексе с MD-2 TLR-4 взаимодействует с другими адаптерными белками, такими как TRIF и MyD88 (т.е. два различных сигнальных пути, а именно независимый и зависимый от MyD88), что приводит к активации транскрипционных факторов, таких как NF- κ B и IRF3/7, которые регулируют экспрессию генов, вовлеченных в провоспалительный иммунный ответ (стимуляция экспрессии провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1 β , IL-6, и интерферонов) [Wei J. et al., 2023].

С точки зрения применения в биомедицинских целях, рецептор TLR-4 является одной из перспективных мишеней, в том числе при аутоиммунных и инфекционных заболеваниях. Ингибирование MyD88 представляет собой перспективный терапевтический подход для лечения хронических воспалительных заболеваний, продемонстрирована его способность минимизировать неблагоприятные последствия острого инфаркта миокарда и подавлять рост опухолей. Кроме того, при ингибировании MyD88 проявляется противовирусная активность, что указывает на его потенциал в качестве терапевтической мишени при патологиях легких, возникающих в результате чрезмерного иммунного ответа (в том числе, цитокинового шторма) и секреции цитокинов, вызванных инфекцией COVID-19 [Saikh K.U., 2021].

TLR-6, образующий димеры с TLR-2, связывает зимозан, представляющий собой β -(1,3)-глюкан. Лигандами этого комплекса являются диацилированные и триацилированные липопептиды, а также внешний поверхностный белок A из *Borrelia burgdorferi* (OspA), фенол-растворимый модулин и растворимый туберкулезный фактор (STF). Взаимодействие TLR-6/TLR-2 активирует внутриклеточные сигнальные каскады через пути MyD88 и TRAF6, что приводит к активации NF- κ B и секреции провоспалительных цитокинов, в основном макрофагами. При взаимодействии с TLR-4 происходит интернализация окисленного липопротеина низкой плотности (oxLDL), что вызывает продукцию цитокинов CXCL1, CXCL2 и CCL9 через путь NF- κ B, а также цитокинов CCL5 и IL-1 β через сигнальный путь TICAM1.

1.3.15. Nod-подобные рецепторы (NLR)

Nod-подобные рецепторы (NLR) представляют собой цитоплазматические PRR и, наряду с TLR, составляют вторую по значимости группу в регуляции врожденного иммунитета. NLR имеют общую структурную организацию, включающую N-концевой домен (белок-белковый взаимодействующий домен, участвующий в передаче внутриклеточного сигнала). Это может быть CARD (домен активации каспаз), PYD (пириновый домен), BIR (домен ингибирования апоптоза) или центральный нуклеотид-связывающий олигомеризационный домен (NOD, участвует в олигомеризации NLR при связывании с лигандом). С-концевой домен состоит из LRR, ответственных за распознавание лигандов. В настоящее время известно 23 типа NLR у человека и 34 у мышей. Эти рецепторы делятся на два основных подсемейства: NOD и NLRP, которые, в свою очередь, подразделяются на четыре семейства, в зависимости от структуры их N-концевой аминокислотной последовательности [Franchi L. et al., 2009]. В зависимости от наличия N-концевого домена, подсемейства NLR классифицируются: NLRC (NLR с CARD) — NOD1 и NOD2, которые активируют сигнальный каскад NF-κB, и MAP-киназы, участвующие в индукции воспалительных реакций; NLRP (NLR с PYD) — NLRP3, NLRP1, NLRP6, способные формировать инфламмосомы, которые активируют каспазу-1, приводя к процессингу и экспрессии цитокинов IL-1β и IL-18; NLRB (NLR с BIR) — NAIP, чьи функции и активация мало изучены; NLRX – NLRX1, расположенный на митохондриях и участвующий в регуляции их функции и иммунных процессов [Platnich J.M. and Muruve D.A., 2019; Pei G. and Dorhoi A., 2021; Sundaram B. et al., 2024].

Все рецепторы NOD содержат домен CARD, тогда как NLRP характеризуются наличием пуринового домена. Оба типа доменов (пуриновый и CARD) способны взаимодействовать с адаптерными белками через гомотипические взаимодействия, включая обратимое автофосфорилирование. NOD также имеют С-концевой домен NACHT, который отвечает за связывание лиганда. Эти структурные домены участвуют в олигомеризации после связывания патогена внутри клетки и образовании инфламмосомы, что, в свою очередь, активирует ферменты, протеолитически активирующие IL-1β и другие цитокины [Motta V.N. et al., 2015].

Подсемейство NOD включает NOD1 и NOD2. NOD1 распознает дипептид D-γ-глутамил-мезо-DAP, характерный для грамотрицательных бактерий, тогда как NOD2 связывает мурамилдипептид. Адаптерным белком для этих рецепторов является серин-треонин киназа RIP2, которая в активной форме устраняет ингибирование NF-κB через убиквитинирование IκBγ [Schneider M. et al., 2012].

Рецепторы семейства NLR распознают разнообразные лиганды (пептидогликаны, флагеллин, вирусную РНК, гифы грибов и т. д.). Так, например, NOD1 и NOD2 распознают фрагменты бактериального пептидогликана (мурамилдипептид, MDP) с различными модификациями. В свою очередь, NLRP3 имеет весьма широкий набор лигандов, включая PAMPs (например, бактериальный LPS), DAMPs (например, кристаллы урата мононатрия, АТФ), и частицы (например, кварц). Рецептор NLRP1 активируется определенными бактериальными токсинами, а NAIP распознает компоненты бактериальной системы секреции III типа.

В результате активации NLR активирует внутриклеточные сигнальные каскады, в зависимости от N-концевого домена. Для NLRC (NOD1 и NOD2) — это NF- κ B и MAPK каскады, что приводит к транскрипции провоспалительных генов. Для NLRP (NLRP3, NLRP1 и др.) активируется формирование инфламмасом, которые активируют каспазу-1 и процессинг провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18.

Таким образом NLR участвуют в различных биологических процессах, включая врожденный иммунный ответ (способствуя распознаванию патогенов и активации воспалительного ответа), адаптивный иммунный ответ (регулируя его активацию, в частности Th1 и Th17 клеток), апоптоз и воспаление [Chia K.S. and Carella P., 2023].

Дисрегуляция NLR связана с различными заболеваниями. Так, например, наличие мутаций в NOD2 связаны с болезнью Крона [Yamamoto S. and Ma X., 2009], а патологическая активация NLRP3 инфламмасы связана с различными аутовоспалительными заболеваниями [Li Z. et al., 2020]. В свою очередь, NLR играют роль как в защите от инфекционных патогенов (вирусов, грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов), так и в развитии избыточных воспалительных реакций [Kim Y.K. et al., 2016].

Обнаружена роль NLR в опухолевых процессах. Они могут влиять на развитие и прогрессирование неопластически трансформированных клеток, как стимулируя противоопухолевый иммунитет, так и способствуя росту опухоли. Активация NLR, особенно через NOD1 и NOD2, может способствовать созреванию дендритных клеток и стимуляции Т-клеточного иммунного ответа. Инфламмасы, активированные NLRP3 и NLRP1, способствуют высвобождению провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-18), которые могут усиливать противоопухолевый иммунитет, активируя NK-клетки и CD8⁺ Т-лимфоциты. NLR могут способствовать активации и привлечению иммунных клеток в опухолевое микроокружение, способствуя элиминации опухолевых клеток [Saxena M. and Yeretssian G., 2014].

NLR могут участвовать в развитии метаболических заболеваний, таких как диабет 2 типа и ожирение, через активацию воспалительных путей в жировой ткани, способствуя инсулинорезистентности и дисфункции адипоцитов. В случае диабета 2 типа активация NLRP3 инфламмосомы вносит вклад в развитие резистентности к инсулину, дисфункцию бета-клеток и хроническое воспаление. NLR вносят вклад в патогенез метаболического синдрома, который характеризуется совокупностью нарушений, включая ожирение, инсулинорезистентность, дислипидемию и гипертонию. [Geddes K. et al., 2009; Jimenez-Duran G. and Triantafilou M., 2021].

1.3.16. Рецепторы-мусорщики (SR)

Рецепторы-мусорщики (SR) представляют собой мембранные гликопротеины, состоящие из двух трансмембранных доменов, двух внутриклеточных доменов и одного внеклеточного домена. Относятся к классу PRR, участвующих в обнаружении и связывании широкого спектра лигандов, включая компоненты клеточных стенок бактерий и грибов, а также полисахариды и липиды. SR являются гетерогенной группой трансмембранных белков, которые также называют супергруппой SR. На основе структурных характеристик SR подразделяются на подсемейства от A до J, при этом SRA и SRB являются наиболее изученными. Рецепторы представляет собой гликофинголипид, содержащий фрагменты церамида и сахара. Эти рецепторы формируют микродомены на плазматической мембране совместно с тирозинкиназой Lyn из семейства Src и субъединицей G α i белка G [Iwabuchi K. et al., 2015].

SR, экспрессируемые макрофагами, дендритными клетками и нейтрофилами, способствуют захвату и элиминации патогенов путем фагоцитоза. SR характеризуются наличием внеклеточного домена, богатого цистеиновыми остатками, и способностью формировать мультимерные комплексы. Важно отметить, что домены, связывающие лиганды, могут распознавать широкий спектр углеводных структур, включая гликопротеины, гликолипиды и полисахариды. Их лигандами являются полианионные соединения, липопротеины низкой и высокой плотности, а также окисленные или ацетилированные молекулы и β -глюканы, включая зимозан, лентинан и карбоксиметил- β -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкан. Однако для связывания зимозана и других β -глюканов требуется предварительная активация TLR-9, что указывает на то, что этот тип рецепторов не является строго специфичным для углеводов [Taban Q. et al., 2022]. Связывание лиганда инициирует активацию внутриклеточных сигнальных каскадов через киназы PI3K, MAPK

и Akt. Эти рецепторы экспрессируются макрофагами, эпителиальными, эндотелиальными и миелоидными клетками [Alquraini A. and El Khoury J., 2020; Taban Q. et al., 2022].

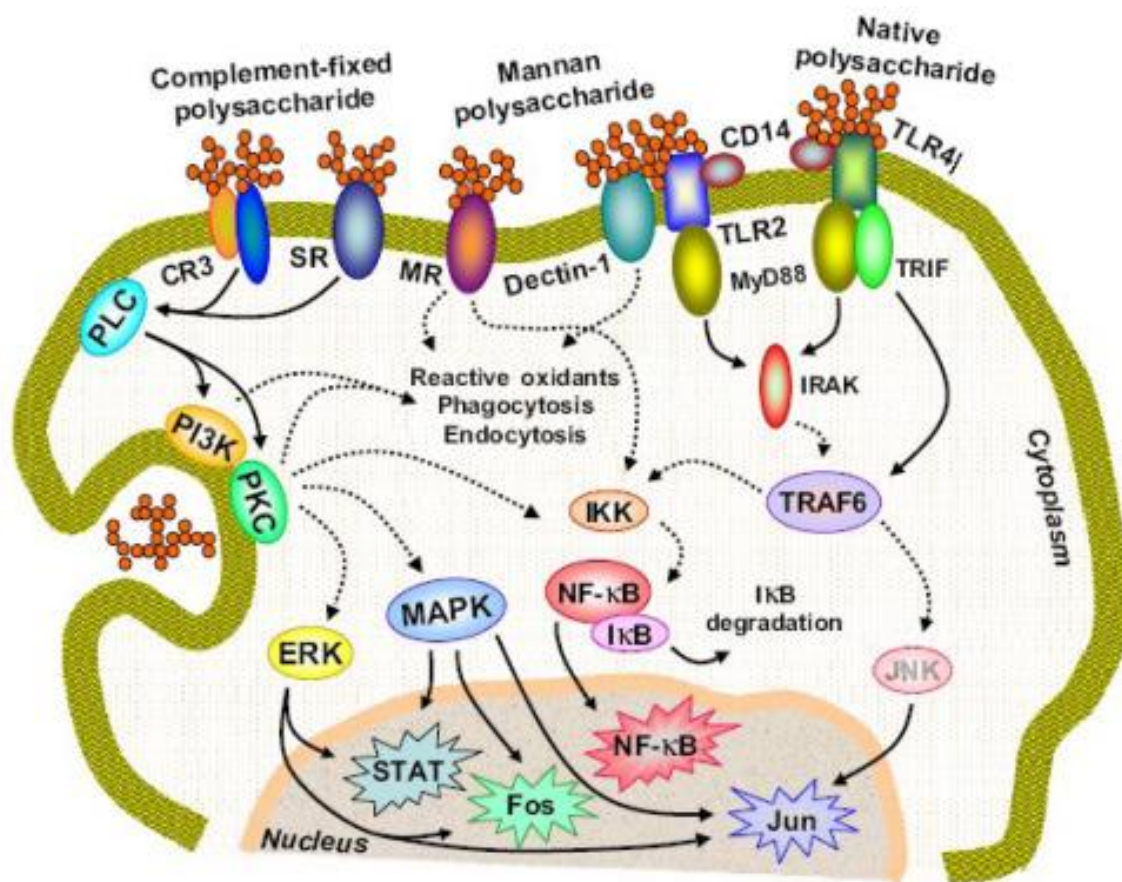


Рисунок 2. Набор наиболее изученных рецепторов-мусорщиков и их внутриклеточных сигнальных каскадов (рисунок взят из [Nazario-Toole A.E. and Wu L.P., 2017]).

SR играют важную роль в распознавании разнообразных углеводных лигандов. Многие SR, особенно SR-A1 и SR-A2, способны связываться с различными полисахаридами, присутствующими на поверхности микроорганизмов, такими как LPS бактерий, β -глюканы грибов и маннозы. Это связывание приводит к активации иммунных клеток, фагоцитозу патогенов и запуску воспалительных реакций. Другие SR, включая SR-B1 и CD36, также могут связываться с гликопротеинами и гликолипидами, что может влиять на клеточную адгезию, миграцию и дифференцировку. Важно отметить, что специфичность связывания SR зависит от конфигурации и структуры гликозилированных остатков, что позволяет им распознавать широкий спектр углеводных паттернов. Подтип A1 связывает липополисахариды и липотейхоевые кислоты. После связывания комплекс лиганд-рецептор фагоцитируется, что приводит к активации молекул-адаптеров и ядерных факторов транскрипции. Зачастую SR рецепторы взаимодействуют с другими иммунологическими

рецепторами. Например, SR-A1 и TLR4 взаимодействуют при фагоцитозе *Escherichia coli*, тогда как SR-A1 и TLR2 взаимодействуют для усиления фагоцитоза *S. aureus*. Совместное связывание лигандов SR-A с рецептором TLR-4 инициирует активацию макрофагов через путь NF- κ B [Amiel E. et al., 2009; Yu H. et al., 2012]. На Рисунке 2 представлены некоторые из SR.

Связывание SR со своими лигандами приводит к активации фосфолипазы C (PLC). Продукты ферментативного гидролиза, полученные в результате активации PLC, в свою очередь, активируют протеинкиназу C (PKC) и фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K). Далее происходит активация митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK), внеклеточных киназ, регулируемых сигналами (ERK), и NF- κ B. Эти сигнальные пути приводят к транскрипции генов, участвующих в иммунном ответе и других клеточных процессах. Кроме того, связывание полисахаридов с SR может дополнительно активировать пути p38MAPK и NF- κ B в клетках, что способствует высвобождению макрофагами различных цитокинов и медиаторов воспаления [Chatterjee S. et al., 2021].

1.3.17. Рецептор лактозилцерамида (LacCer)

LacCer — это рецептор, распознающий патогены на поверхности нейтрофилов и эндотелиальных клеток. Основными компонентами LacCer являются длинные жирные кислоты C24:0 и C24:1 [Iwabuchi K. et al., 2015]. Лигандами LacCer выступают β -(1 $\rightarrow$ 3)-глюканы, обнаруживаемые у бактерий и грибов. Например, β -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкан в клеточной мембране *Pneumocystis carinii* подавляет синтез NF- κ B, MIP-2 и TNF- α через протеинкиназу C [Evans S.E. et al., 2012]. Аналогичные эффекты наблюдаются у *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* и *Saccharomyces cerevisiae*. Блокирование CR3 и LacCer антителами приводит к отсутствию активационного ответа нейтрофилов на β -глюканы. В то же время, при связывании LacCer с лигандом в нейтрофилах стимулируется продукция ROS через Lap-киназу по путям MAPK и PI3K, что помогает нейтрализовать микробы [Iwabuchi K. and Nagaoka I., 2002].

Кроме того, положительный хемотаксис косвенно регулируется через связывание LacCer в нейтрофилах. Взаимодействие LacCer с лигандом приводит к высвобождению хемоаттрактанта IL-8 и секреции цитокинов, усиливающих антимикробное действие нейтрофилов [Chiricozzi E. et al., 2015]. Например, PGG-глюкан, растворимый β -(1 $\rightarrow$ 6)-глюкан с β -(1 $\rightarrow$ 3) боковыми цепями из дрожжей *Saccharomyces*, при связывании с LacCer выступает в роли иммуномодулятора, стимулируя активацию лейкоцитов, пролиферацию мегакариоцитов и миелоидных клеток. Исследования показали, что разные

полисахариды имеют различную прочность связывания с LacCer, а наивысшее сродство к LacCer было обнаружено у гликогена и β -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 6)-глюканов по сравнению с контролем без конкурента [Wakshull E. et al., 1999; Legentil L. et al., 2015].

1.3.18. Рецепторы системы комплемента (CR)

Рецепторы системы комплемента представляют собой специализированные мембранные гликопротеины, расположенные на поверхности различных иммунокомпетентных клеток. Такие рецепторы были обнаружены на плазматических мембранах различных типов лейкоцитов, включая нейтрофилы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки и В-лимфоциты, что подчеркивает их широкое распространение и потенциальное функциональное значение в иммунном ответе. CR3 играет основную роль во взаимодействиях клетка-клетка и клетка-матрикс. Эти рецепторы можно разделить на четыре категории в зависимости от их паттерн-распознающих свойств: связывающие молекулы C1q, C3b и C4b (CR1, или CD35); C3dg и IC3b (CR2, или CD21); IC3b и IC4b (CR3, или CD11b/CD18); IC3b (CR4, или CD11c/CD18); и, наконец, IC3b (известный как CR4, или CD11c/CD18). Тем не менее, было установлено, что CR3 имеет сродство к β -глюканам, что приводит к передаче внутриклеточного сигнала. CR2, например, не способен передавать внутриклеточные сигналы из-за ограниченной длины своего внутриклеточного домена [Santos-López J. et al., 2023].

Рецептор CR3 (интегрин α M β 2, или Mac-1), который является неотъемлемым компонентом семейства адгезивных интегринов, состоит из двух основных доменов, а именно CD11b и CD18, и известен своей способностью распознавать широкий спектр лигандов, одновременно действуя в качестве важной адгезивной молекулы в иммунной системе. Этот рецептор характеризуется наличием двух отдельных сайтов связывания, один из которых расположен на С-конце и специально предназначен для связывания β -глюканов, тогда как другой сайт связывания расположен на N-конце и предназначен для взаимодействия с фрагментом IC3b системы комплемента. На сродство связывания фрагмента IC3b с рецептором значительно влияет концентрация ионов Mg^{2+} в окружающей среде, что позволяет предположить, что этот ион играет ключевую роль в опосредовании взаимодействия рецептор-лиганд. Кроме того, CR3 содержит β -субъединицу, которая представляет собой трансмембранный гликопротеин с ММ около 155 кДа, а также имеет ионозависимый сайт связывания металлов, известный как MIDAS, который необходим для стимулирования связывания лигандов со свободным рецептором, о чем свидетельствует исследование [Sándor et al., 2016].

CR3 существует в двух конформационных состояниях: низкоаффинном и высокоаффинном [Jensen R.K. et al., 2020]. Для эффективного фагоцитоза необходима активация CR3, переводящая его в высокоаффинное состояние. Этот процесс активации может происходить посредством двух основных механизмов. Во-первых, корецептор-опосредованной активации за счет взаимодействия CR3 с другими рецепторами на поверхности клетки, такими как рецепторы Fc γ (Fc γ R) или селектины (связывание лигандов с этими корецепторами приводит к активации CR3, требующей перестройки актинового цитоскелета для фагоцитоза). Во-вторых, активации CR3 через G-белок-сопряженные рецепторы (GPCR), с которым связывается лиганд (например, фактор активации тромбоцитов (PAF) или хемотаксических цитокинов), независимо от перестройки актина, и что приводит к повышению его аффинности к лигандам [Fällman M. et al., 1993].

После успешного связывания β -глюканов и IC3b с рецептором CR3 происходит заметное усиление адгезии лейкоцитов к антигенам, что затем запускает каскад комплемента по классическому пути активации и, в конечном итоге, приводит к стимуляции цитотоксических механизмов в иммунокомпетентных клетках, которые имеют решающее значение для оказания противоопухолевого действия, как сообщили Ли и др. [Li B. et al., 2006]. В случаях, когда зимозан связывается с рецептором, происходит последующая стимуляция НК, что приводит к заметному усилению их противоопухолевой активности. Кроме того, было показано, что связывание β -глюканов вызывает конформационные изменения в домене I, расположенном на С-конце рецептора, которые зависят от присутствия ионов магния и активности протеинтирозинкиназ. Это конформационное изменение раскрывает и активирует CRM 1/5 из этого домена через эпитоп, который критически участвует в сигнальных путях, связанных с фагоцитозом и цитотоксическими эффектами, направленными на опсонизированные клетки. Это открытие привело к использованию β -(1 $\rightarrow$ 3)-глюканов в качестве адъювантов в терапевтических стратегиях, направленных на лечение трансформированных клеток в сочетании с моноклональными антителами, что было продемонстрировано различными группами исследователей [Avni O. et al., 1998; Vandendriessche S. et al., 2021].

При активации нейтрофильных и моноцитарных форм CR3 происходит заметная стимуляция фагоцитоза, сопровождающаяся секрецией активных метаболитов кислорода и специфических гранул, особенно в нейтрофилах, что подчеркивает функциональную роль этого рецептора во врожденном иммунитете. Кроме того, CR3 играет решающую роль в опосредовании антителозависимого цитотоксического ответа эозинофилов, включающего иммуноглобулин E (IgE), который приводит к секреции активных метаболитов кислорода в ответ на распознавание паразитарных антигенов, а также способствует выработке

моноцитами NO. Рецептор в значительной степени участвует в адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам и их последующей миграции во время воспалительных реакций. Этому процессу способствует реорганизация архитектуры цитоскелета клетки посредством фосфорилирования паксиллина, который является критическим белком цитоскелета. Одновременно взаимодействие между рецептором и его лигандом вызывает фосфорилирование эндогенных белков, тем самым активируя критические сигнальные пути с участием оксидазы НАДФН и фосфолипаз A2 и D [Ehlers M.R., 2000; Zhang J. et al., 2014]. Рецептор CR3 также играет важную роль в опосредовании противоопухолевой активности, связанной с цитотоксическими процессами во время опсонизации трансформированных клеток. Этот эффект был экспериментально подтвержден для β -(1 $\rightarrow$ 3)- и β -(1 $\rightarrow$ 4)-гликанов, выделенных из ячменя и введенных перорально, а также для глюкана WGP, который распознается макрофагами и затем доставляется в лимфоидные органы, где он взаимодействует с гранулоцитами, как показали исследования, проведенные Хонгом и др. в 2004 году [Hong F. et al., 2004]. Аналогичная противоопухолевая активность наблюдалась в контексте почечной карциномы при использовании моноклональных антител [Sier C.F. et al., 2004]. Вместе с тем известно, что CR3 может вызывать дерегуляцию НК-зависимого надзора за опухолями [Liu C.F. et al., 2017].

Другим важным биомедицинским применением углеводов и их комплексов с молекулами различной природы является их использование в системах доставки, например, малой интерферирующей РНК (siRNA), используемой для подавления экспрессии генов патологических белков. Нативные молекулы siRNA обладают слабой стабильностью и низкой проницаемостью через клеточные мембраны [Zhang J. et al, 2023]. Углеводные полимеры и конъюгаты активно используются в качестве биосовместимых и биоразлагаемых средств доставки. Например, модификация наночастиц, покрытых полиэтиленгликолем или липидными слоями, различными углеводами (такими как глюкоза, галактоза, лактоза и др.) позволяет им избирательно нацеливаться на клетки, гиперэкспрессирующие углевод-распознающие рецепторы (MR, TLR, GLUT1 и другие), что важно в случае, например, онкологических заболеваний благодаря эффекту Варбурга [Zhang J. et al., 2025]. Использование таких природных полимеров, как крахмал (амилоза и амилопектин), хитин (и его производное хитозан), а также инулин, позволяет создавать стабильные полиплексы или гидрогели [Zhao L. et al, 2023], которые защищают siRNA от нуклеаз и способствуют эффективному эндосомальному высвобождению после интернализации.

Ключевым моментом для успешной доставки является последующее высвобождение siRNA или других терапевтических агентов из эндосом. Многие углеводные полимеры,

особенно хитозан и его производные, обладают “эффектом протонной губки” [Carpifisco A.E. et al., 2022], поскольку их аминогруппы способны буферизовать протонный градиент внутри эндосомы. Накопление протонов приводит к набуханию и разрыву эндосомальной мембраны, высвобождая siRNA в цитозоль, где она может быть интегрирована в комплекс RISC для подавления экспрессии целевого гена [Shevelev A. et al., 2025]. Одним из удачных и реализованных решений в медицинских средствах является использования для таргетирования молекул GalNAc, благодаря высокоспецифичному взаимодействию с рецептором асиалогликопротеина (ASGPR). ASGPR активно экспрессируется на поверхности гепатоцитов и опосредует его интернализацию [Springer A.D. et al., 2018]. Печеночный тропизм при системном введении снижает системную токсичность и позволяет говорить о таргетном воздействии в случае заболеваний печени. На сегодняшний день известен целый ряд зарегистрированных препаратов (например, вутрисиран, патисиран, недосиран и др.), одобренные для лечения наследственного транстиретинового амилоидоза и других заболеваний [Shevelev A. et al., 2025].

Разнообразие природных полисахаридов открывает широкие возможности для инженерии систем доставки, адаптированных к различным биологическим барьерам. Хитозан (деацетилированный хитин), будучи положительно заряженным полимером в физиологических условиях, эффективно связывает отрицательно заряженную siRNA, формируя стабильные наночастицы. Его биоразлагаемость и способность к набуханию в кислой среде делают его идеальным кандидатом для доставки в опухолевые микроокружения. Инулин, полимер фруктозы, который является пребиотиком, также исследуется из-за его способности к самосборке и биосовместимости [Jiménez-Sánchez M. et al., 2019]. Он может быть химически модифицирован для прикрепления терапевтической нагрузки или для изменения поверхностного заряда. Кроме того, крахмал и его производные (например, гидроксипропилметилцеллюлоза) могут использоваться в качестве стабилизирующих матриц или для создания оболочек, обеспечивающих замедленное высвобождение [Lukova P. et al., 2023]. Углеводные последовательности не только облегчают захват, но и могут влиять на кинетику распада наноносителя *in vivo*, обеспечивая долгосрочную циркуляцию и снижая токсичность, что делает их перспективной платформой для безопасной и эффективной невирусной доставки нуклеиновых кислот [Serrano-Sevilla I. Et al., 2019].

Несмотря на подробное изучение углеводов, их комплексов, биологической активности и физико-химических характеристик остается много белых пятен в механизмах их биологической активности, особенно на молекулярном уровне. Так, например, полисахаридные комплексы из клубненосных растений практически не изучены с точки

зрения влияния на паттерны экспрессии генов и их рецепторного взаимодействия, которые, в конечном счете, обуславливаются биохимическими и физико-химическими свойствами этих молекул. Выработка стратегии поиска и определения молекулярных механизмов действия активных веществ, является актуальной и важной задачей с фундаментальной и прикладной точек зрения. Понимание механизмов и их взаимосвязи с физико-химическими особенностями изучаемых полисахаридных комплексов позволит создавать биомедицинские и биотехнологические продукты на их основе. Вместе с тем, широкий спектр задействованных рецепторов, интермедиатов, пересечение сигнальных каскадов от разных рецепторов, их плеiotропность и другие факторы, все еще являются препятствием на пути к созданию обобщенной математической модели сигналинга полисахаридов. Именно этот факт обуславливает экспериментальный подход, использованный в данной работе, к изучению биохимических основ их биологической активности.

ГЛАВА 2

При подготовке данного раздела диссертации использованы статьи статьи A1, A2, A6-A16, A18, A19 из списка публикаций по теме диссертации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данном разделе приводятся материалы и методы для экспериментов и манипуляций, которые были использованы для работы и с *Helianthus tuberosus L.*, и с *Solanum tuberosum L.* Материалы и методы, использованные в специфических экспериментах для каждого объекта исследования, приводятся в соответствующих разделах, посвященных изложению результатов исследований и обсуждению конкретных видов биологической активности полисахаридов [Генералов Е.А., 2015].

2.1. Материалы

Полисахариды выделяли из клубненосных растений: *Helianthus tuberosus L.* и *Solanum tuberosum L.* Использованные клеточные культуры были получены в: ФГБУН ИМБ им. В.А. Энгельгардта, НИИВС им. И.И. Мечникова, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, ФГБУН ИТЭБ РАН, ИБК РАН или ФИЦ ПНЦБИ РАН. Экспериментальных лабораторных животных получали из разведения экспериментально-биологической лаборатории ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, питомника «Андреевка» ГУ НЦ биомедицинских технологий РАМН или питомника ФИБХ РАН Питомник «Пушино».

Все исследования с лабораторными животными проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Все эксперименты на животных проводились по стандартам FELASA (FELASA Guidelines and Recommendations) [Guillen J., 2012], в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых Институтом для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 18 Марта 1986). Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г по охране животных, используемых в научных целях [<https://www.fao.org/faolex/results/details/ru/c/LEX-FAOC098296/>]. Прибывших животные до начала исследований помещали на 14-дневный карантин в отдельное помещение.

Соблюдались правила работы с животными, приведенные в: руководстве «Guide for the care and use of laboratory animals» [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>]; национальном стандарте РФ ГОСТ [ГОСТ 33044-2014, 2015]; в соответствии с Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза [<https://www.eaeunion.org/>].

2.2. Методы

2.2.1. Химические методы анализа

Количественное содержание углеводов в изучаемых образцах определяли фенол-сернокислотным методом [Dubois M. et al., 1956]. Калибровочную кривую строили по растворам стандартных образцов D-глюкозы. Оптическую плотность растворов исследуемых образцов разной концентрации определяли на спектрофотометре UV-1800 Shimadzu (Япония). Общее содержание углеводов определяли по калибровочному графику.

Для количественного определения белка, входящего в состав исследуемого полисахарида, использовали метод окрашивания белков по методу Лоури [Lowry O.H. et al., 1951]. Калибровочную кривую строили по растворам стандартных образцов овальбумина. Оптическую плотность растворов определяли на спектрофотометре UV-1800 Shimadzu (Япония). Общее содержание белков определяли по калибровочному графику.

2.2.2. Экстракция и ультрафильтрация активной фракции

Полисахариды из клубней *Helianthus tuberosus L.* или *Solanum tuberosum L.* выделяли из коркового слоя без и с ростками, соответственно, путем водной экстракции, с последующим центрифугированием (Polylab Pte Ltd, ООО НПФ Гемма-Б). Супернатант очищали и концентрировали с помощью ультрафильтрации на установке SartoJet (Sartorius stedim biotech) против дистиллированной воды, используя 50, 100 (для *Solanum tuberosum L.*) или 300 (для *Helianthus tuberosus L.*) фильтры Sartocon Slice Cassette (полиэтерсульфоновые). Затем проводили ультрафильтрацию и концентрирование. Образцы были высушены лиофильно в лиофилизаторе Virtis Advantage 2,0 BenchTop Freeze Dryer Lyophilizer (SP Scientific, США). Только биологически активные фракции в модели Эрне использовали для дальнейшего выделения активных компонентов. Разделение по молекулярным массам проводили, используя ГПХ на препаративном хроматографе Akta Avant (Cytiva).

2.2.3. Хроматографическое фракционирование

Фракцию из *Helianthus tuberosus* L. с диапазоном молекулярных масс больше 300 кДа, после ультрафильтрации, фракционировали на колонке DEAE 650 S TSK ($2,6 \times 35$ см). Элюирование проводили дистиллированной водой и с градиентом концентраций растворов от 0,5 М KCl до 2 М KCl. Детектирование проводили при длинах волн 210 и 280 нм, а также кондуктометрически. Полученные фракции проверяли на общее содержание углеводов фенол-серноокислотным методом, а также строили профиль элюции зависимости объема выхода фракции от поглощения при 490 нм. Фракцию 0,5 М KCl после ионообменника DEAE 650 S TSK хроматографировали на колонке XK 50/100 (5×100 см) с Toyopearl HW 75 (Sigma-Aldrich) [Генералов Е.А., 2017].

Фракции из *Solanum tuberosum* L. с молекулярной массой 50–100 кДа подвергали хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой 650 S TSK ($2,6 \times 35$ см) с элюированием дистиллированной водой и ступенчатым градиентом концентрации хлорида калия (0,1–1,0 М). Детектирование проводили при длинах волн 210 и 280 нм и кондуктометрически. Фракции из *Solanum tuberosum* L. после ионообменника DEAE 650 S TSK хроматографировали на колонке XK 50/100 (5×100 см) с Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich) [Генералов Е.А. и Яковенко Л.В., 2023].

Фракции объединяли, концентрировали, подвергали диализу и лиофилизации. Полученные фракции проверяли на наличие углеводов фенол-серноокислотным методом, а также строили профиль элюции зависимости объема выхода фракции от поглощения при 490 нм.

Полученные фракции обессоливали, объединяли и концентрировали с использованием установки тангенциальной ультрафильтрации Минитан (Millipore) с отсечением молекулярных масс менее 10 кДа. После этого концентраты подвергали лиофильной сушке.

Все работы по изучению структурных характеристик и биологической активности проводили именно с фракциями, прошедшими все этапы очистки, под названием полисахарид из *Helianthus tuberosus* L. (HTLP) и полисахарид из *Solanum tuberosum* L. (STP). Наличие одного единственного узкого и симметричного пика на профиле элюции ВЭЖХ-ГПХ свидетельствовало о достаточной однородности и гомогенности полученных фракций.

Для оценки молекулярной массы HTLP и STP использовали систему Prominence Series HPLC system (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) с детектором на фотодиодной матрице (для детектирования был выбран диапазон 220 нм) и колонкой

TSKG6000PW ($7,5 \times 300$ мм) (Tosoh Bioscience GmbH, Germany) для HTLP или TSKgel G4000PW из нержавеющей стали ($7,5 \times 300$ мм) (Tosoh Bioscience GmbH, Германия) – для STP. ММ исследуемых полисахаридов рассчитывали по калибровочным кривым зависимости логарифма ММ от коэффициента распределения [Wilson K. and Walker J., 2010].

Стандартную кривую зависимости логарифма ММ относительно времени выхода для фракций *Helianthus tuberosus* L. строили с использованием декстранов Т-серии с известными молекулярными массами: Т-800, Т-500, Т-100, Т-80 и голубым декстраном молекулярной массы 2 МДа (Sigma-Aldrich). В случае *Solanum tuberosum* L. – стандартов декстрана Т-130, Т-100, Т-80, Т-40 и Т-20 кДа (Sigma-Aldrich). Для определения общего объема колонки использовали стандартный раствор глюкозы. Каждый из этих стандартов был отдельно нанесен в количестве 10 мг/мл.

2.2.4. Физико-химические характеристики

2.2.4.1. Оптическая спектроскопия

Для регистрации оптических спектров поглощения использовали двухлучевой спектрофотометр UV-1800 Shimadzu (Shimadzu, Япония) в спектральном диапазоне 190–1100 нм. Растворы полисахаридов STP и HTLP концентрации 1 мг/мл, центрифугировали и дегазировали, после чего проводили измерение.

2.2.4.2. Инфракрасная спектроскопия

ИК-спектры получали на фурье-инфракрасном спектрометре IRAffinity-1 FTIR System (Shimadzu Corporation, Токио, Япония) с приставкой полного внутреннего отражения ATR MIRacle-10 (PIKE Technologies, США). Образцы представляли собой таблетки из спрессованных гомогенизированных навесок STP и HTLP с 1% KBr. Измерения проводили в спектральном диапазоне $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$. Для обработки данных использовали пакет ADLabs/Spectrus после ATR-коррекции базовой линии.

2.2.4.3. Рамановская спектроскопия

В работе использовали Рамановский комплекс на базе оптического микроскопа, модель R532 (ООО «Фотон-Био», Россия), с длиной волны возбуждающего излучения 532 и 638 нм. Оптическая схема прибора представлена на Рисунке 3.

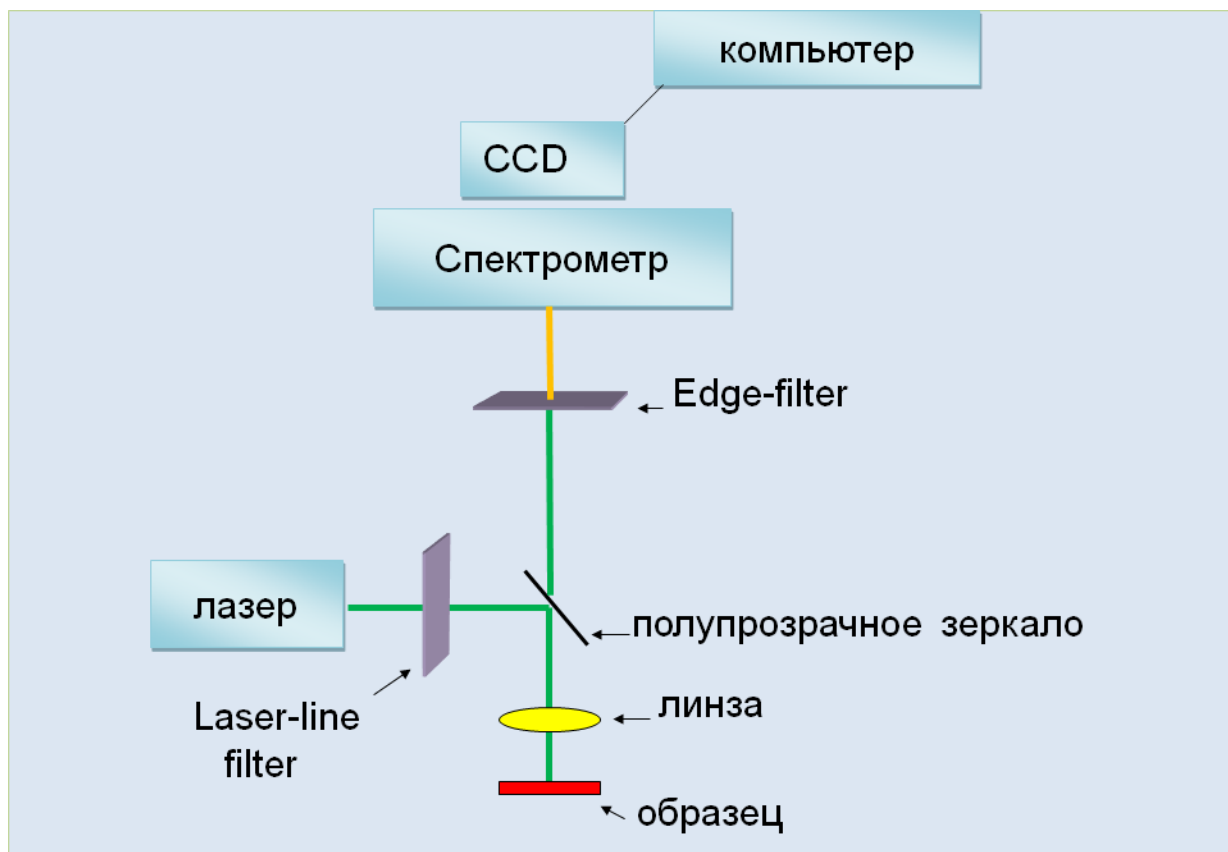


Рисунок 3. Оптическая схема прибора для Рамановской спектроскопии.

Запись спектров проводили при мощности лазера 30 мВт и времени экспозиции 2000 мс следующим образом: навеску вещества 2 мг наносили на предметное стекло, которое помещали на предметный столик микроскопа и облучали лазером. Для жидких растворов аликвоту 10 мкл с концентрацией 1–2 мг/мл наносили на предметное стекло, которое помещали на предметный столик микроскопа и облучали лазером.

Для проведения поверхностно-усиленной Рамановской спектроскопии (SERS) использовали сферические наночастицы серебра с плазмонным резонансом в области 416 нм. Наночастицы серебра (AgNP416) были получены по методу Леопольда-Лэндля [Leopold N. and Lendl B., 2003]. При комнатной температуре и интенсивном перемешивании к 90 мл водного раствора едкого натра и гидроксиламина гидрохлорида с концентрациями $1,67 \times 10^{-3}$ и $3,33 \times 10^{-3}$ М, соответственно, добавляли по каплям 10 мл водного раствора

AgNO_3 с концентрацией 10^{-2} М. Реакцию проводили в течение 30 мин, после чего готовый коллоид центрифугировали при 5000 g и ресуспендировали в 10 мл деионизированной воды. Спектр поглощения коллоидного раствора серебра представлен на Рисунке 4.

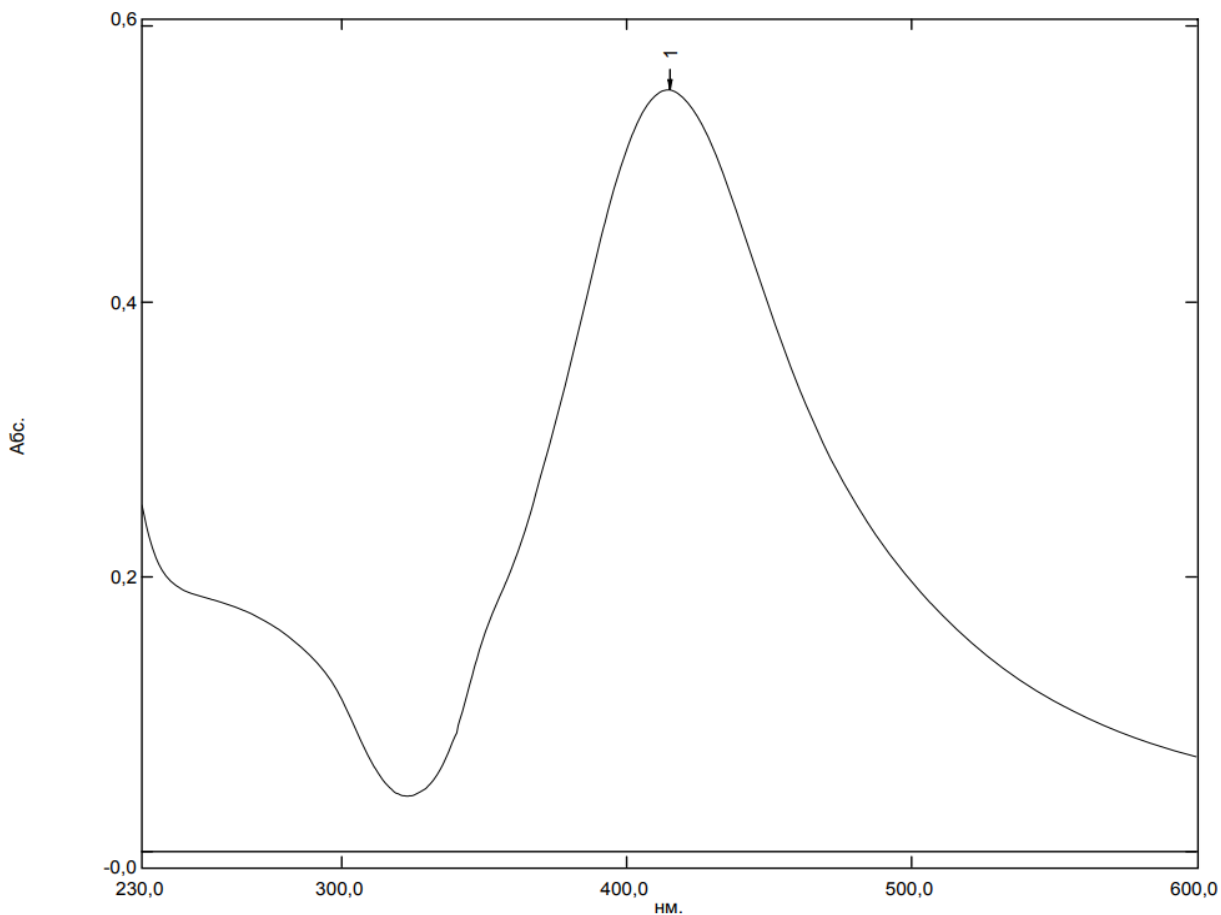


Рисунок 4. Спектр поглощения коллоидного раствора серебра. По оси абсцисс – длина волны в нм, по оси ординат – поглощение в относительных единицах.

Запись SERS-спектров растворов углеводов проводили следующим образом: к аликвоте раствора углевода объемом 10 мкл добавляли 50 мкл коллоидного раствора серебра, тщательно перемешивали и 10 мкл полученной смеси наносили на предметное стекло. Его помещали на предметный столик микроскопа и облучали лазером.

2.2.4.4. Круговой дихроизм

Для получения спектров кругового дихроизма (КД) использовали спектрометр кругового дихроизма Chirscan (Applied Photophysics, Великобритания) с термостатируемым блоком. Спектры анализировались при помощи онлайн сервера Bestsel

[Micsonai A. et al., 2022]. Лиофилизаты HTLP и STP разной концентрации растворяли в воде MiliQ. Измерения проводили в спектральном диапазоне 178–800 нм.

2.2.4.5. Анализ моносахаридного состава

Анализ моносахаридного состава проводили методом ВЭЖХ и ГЖХ после кислотного гидролиза образцов [Генералов Е.А., 2015; 2023]. По методике Усова определяли уроновые кислоты и аминасахара [Usov A.I. et al., 1995].

Для ВЭЖХ навески полисахаридов HTLP и STP предварительно гидролизовали 0,5, 1, 1,5 или 2М трифторуксусной кислотой (ТФУ) 30 мин, 1 час или 2 часа при 117 °С, после чего упаривали на роторном испарителе, добавляли 96% этанол, растворяли и вновь упаривали; процедуру повторяли дважды. К этому образцу добавляли элюент и внутренний стандарт мальтитол, центрифугировали и полученный супернатант вносили в ВЭЖХ флаконы. Хроматографирование проводили на хроматографе Prominence Series HPLC (Shimadzu Corporation, Япония) с фотодиодным детектором и колонкой Shodex Asahipak NH2P-50 4E (с внутренним диаметром 4,6 мм × 250 мм длина).

Для ГЖХ использовали прибор Shimadzu GC-2014 GC-FID (Shimadzu Corporation, Япония) с колонкой ZB5-ms (30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0,25 мкм) (Phenomenex Inc., США) и инжектор Shimadzu Split/Splitless FocusLiner с внутренним диаметром 3,4 мм. Пробоподготовку проводили по методике, разработанной в лаборатории Усова [Усов А.И. и Элашвили М.Я., 1991; Usov A.I., 1993]. Гидролиз проводили при 121 °С в 2 М растворе ТФУ, в которой содержался инозит в качестве внутреннего стандарта. ТФУ удаляли путем упаривания на роторном испарителе при 40 °С вместе с метанолом. К остатку добавляли 1 М раствор аммиака, содержащего боргидрид натрия. Избыток боргидрида натрия переводили в борную кислоту добавлением уксусной кислоты, добавляли раствор метанола и упаривали досуха [Калмыкова Е.Н. и др. 1988]. К остатку добавляли пиридин и уксусный ангидрид, выдерживали на кипящей водяной бане, после охлаждения добавляли толуол и упаривали досуха. Полученную смесь разводили водой и проводили хлороформную экстракцию [Zumbo P., 1979].

Параллельно готовили образцы стандартных моносахаридов разной концентрации с добавлением мальтитола (для ВЭЖХ) или инозитола (для ГЖХ) в качестве внутреннего стандарта.

2.2.4.6. Гель-электрофорез

Для осуществления гель-электрофореза использовался полиакридный гелевый блок (7,5%-ный полиакриламид, содержащий 2,5% бисакриламида) методом [Laemmli U.K., 1970], в присутствии 1%-го додецилсульфата натрия. В качестве молекулярных маркеров использовали смесь маркеров известной ММ: миозин (200,0 кДа), β -галактозидаза (116,2 кДа), фосфоорилаза *b* (97,4 кДа), БСА (66,2 кДа), овальбумин (45 кДа), карбоангидраза (31 кДа), ингибитор трипсина (21,5 кДа) и лизоцим (14,4 кДа). Полиакриламидный гель с полосами, окрашенными на белок и сахар, сканировали на сканнере с использованием системы гель-документирования ChemiDoc MP (Bio-Rad) и оценивали их ММ. Кроме того, гелевый блок удаляли, нарезали на вертикальные сегменты и окрашивали. Для индикации белка и углеводов в сегментах использовался краситель Кумасси бриллиантовый голубой [Weber K. and Osborn M., 1969]. Для обнаружения в геле углевода, связанного с белком, применяли периодный метод Шиффа [Schiff H., 1864; Zacharius, R.M. et al. 1969].

2.2.4.6. Анализ аминокислотного состава

Анализ аминокислотного состава белковой примеси проводили на аминокислотном анализаторе Hitachi LA-8080 (Hitachi, Япония) после гидролиза образцов в 6М HCl в атмосфере азота при 110 °C в течение 48 ч.

2.2.4.7. Атомно-силовая микроскопия

Атомно-силовую микроскопию образцов проводили на атомно-силовом микроскопе NanoWizard4 AFM Bruker JPK Instruments (США). В качестве кантилевера использовались FESP-V2. На поверхность свежесколотой слюды наносили каплю водного раствора разной концентрации (0,01–1,0 мг/мл) изучаемого образца HTLP или STP. После высыхания капли исследуемого раствора проводили сканирование поверхности с помощью атомно-силового микроскопа.

2.2.4.8. Обработка ферментами

Полисахаридные растворы концентраций 0,001–1,0 мг/мл обрабатывали ферментами, специфичными к разным типам гликозидной связи: литиказой из *Arthrobacter Luteus* (Sigma-Aldrich) (гидролиз β -(1→3)-гликозидной связи) и целлюлазой из

Aspergillus niger (гидролиз β -(1→4)- и β -(1→3)-гликозидных связей) по методике [Stone B.A. and Clarke A.E., 1992]. Гидролитическое расщепление осуществляли при весовом отношении полисахарида к ферменту, равном 100:1. Реакцию останавливали, прогревая реакционную смесь при 60 °С в течение 30 мин.

Кроме того, использовали α -амилазу из *Bacillus licheniformis* (гидролиз α -(1→4)-гликозидной связи) в соответствии с протоколом определения активности Бернфельда [Bernfeld P., 1995]. Оптическую плотность раствора определяли спектрофотометрически на длине волны 540 нм. Реакцию останавливали динитросалициловой кислотой. Калибровочную кривую зависимости оптической плотности раствора от концентрации строили с использованием стандартных навесок мальтозы.

Обработанные ферментами растворы тестировали на наличие биологической активности по методу Ерне.

2.2.5. Метод Ерне и Нордин

Для оценки биологической активности по методике Ерне и Нордина [Jerne N.K., Nordin A.A., 1963; Генералов Е.А., 2013; Генералов Е.А. и Яковенко Л.В., 2023] использовали линию мышей F₁(СВАхС₅₇В1/6) по 5 особей в группе. Количество антителобразующих клеток (АОК) селезенки у иммунизированных эритроцитами баранов (ЭБ) мышей, определяли по количеству зон локального гемолиза на агарозном геле в чашке Петри на 5 сутки после иммунизации. Мышам внутрибрюшинно вводили ЭБ 2×10^6 (контрольная группа) или ЭБ 2×10^6 совместно с экспериментальными образцами (выделяемых фракций, гидролизатов, STP или HTLP) разной концентрации (0,001-1,0 мг/мышь). В каждой чашке Петри подсчитывали только зоны локального гемолиза и рассчитывали удельное содержание АОК (одна зона лизиса соответствует одной АОК) на селезенку. После этого вычисляли индекс стимуляции иммунного ответа (коэффициент стимуляции – $K_{ст}$), как отношение количества АОК в опыте к количеству АОК в контроле.

2.2.6. Биобезопасность

2.2.6.1. RAW 264.7 виталити-тест

Культура клеток макрофагов RAW 264.7 культивировалась в среде DMEM (Sigma-Aldrich, 6D546) с добавлением 2 mM L-глутамин (Sigma-Aldrich, G7513), 10% FBS

(Sigma-Aldrich, F2442) по объему и смеси антибиотиков пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) (PanEco, A065) в пластиковых культуральных колбах (Corning, CLS431080). Клетки инкубировались при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% углекислого газа, с добавлением 35 мл полной среды. Жизнеспособность клеток оценивали через 24 часа после добавления 200 мкг/мл или 500 мкг/мл стерильного раствора HTLP или STP, соответственно, путем окрашивания клеточных культур пропидиум-йодидом (Sigma-Aldrich, 81845) и бис-бензими́дом (Sigma-Aldrich, 14530) для выявления ядер погибших клеток и общего количества клеток в культуре соответственно: $N_m = (N_{propidium\ iodide} + N_{bisbenzimidazole}) \times 100\%$. Визуализацию окрашивания проводили с помощью инвертированного микроскопа Leica DMIL HC (Leica, Германия). Кроме того, осуществляли подсчет клеток размером 15–22 мкм цитометрически с помощью Septer (Millipore).

2.2.6.2. МТТ-тест

В основе МТТ-редуктазного теста лежит биохимический процесс восстановления водорастворимого 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиума бромид (МТТ) до нерастворимого формазана фиолетового цвета. Данная редокс-реакция катализируется митохондриальными дегидрогеназами, преимущественно редуктазами, и является маркером активного клеточного метаболизма, характерного для жизнеспособных клеток.

Клетки высевали на 12-луночные пластиковые планшеты с плоским дном в концентрации 1×10^5 на лунку 24-луночного планшета. К клеточной среде добавляли 200 мкл стерильного раствора STP или HTLP в концентрации 500 и 200 мкг/мл, соответственно. Эксперимент проводили в соответствии со стандартной методикой, описанной в статьях [Präbst K. et al., 2017; Gavanji S. et al., 2023]. Измеряли оптическую плотность с помощью спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu, Токио, Япония) при 570 и 620 нм. Расчет производят по формуле:

$$A_{570} - A_{620} = E, \text{ доля жизнеспособных клеток} = (E_{\text{опыта}}/E_{\text{контроля}}) \times 100\%.$$

Для изучения биобезопасности в доклинических моделях (острая и хроническая токсичность, мутагенность, тератогенность и др.) использовались обоего пола белые беспородные мыши массой 18–22 г, аутбредные мыши линий SHK массой 18–20 г, СВА массой 18–22 г, F₁(СВАхС₅₇Bl/6) массой 18–20 г; крысы линий Август массой 180–210 г и

Wistar массой 210–220 г; морские свинки массой 275–325 г (ИБХ РАН, Пущино; «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России; ГБОУ ВПО НижГМА МЗ РФ, ИТЭБ РАН).

2.2.6.3. Анафилактогенная активность

Для оценки анафилактогенной активности STP и HTLP использовали самцов морских свинок по 6 животных на экспериментальную точку. Исследование проводили в соответствии со стандартной методикой, описанной в национальном руководстве по доклиническим исследованиям [Миронов А.Н. и др. 2012]. Сенсибилизирующую дозу вводили в 1-ый день подкожно, а на 3-ий и 5-ый – внутримышечно. На 14-е и 21-е сутки вводили внутривенно растворы STP и HTLP в разрешающей дозе 2,8, 28,0 и 0,56, 5,6 мкг/животное, соответственно. Интенсивность реакции оценивали по индексу Вигле [Weigle W.O., et al., 1960].

Были сформированы следующие группы: 1 – экспериментальная, морским свинкам вводили раствор 0,9% NaCl с HTLP в дозировке 0,56 мкг/мышь через сутки после иммунизации; 2 – экспериментальная, морским свинкам вводили раствор 0,9% NaCl с HTLP в дозировке 5,6 мкг/мышь через сутки после иммунизации; 3 – экспериментальная, морским свинкам вводили раствор 0,9% NaCl с STP в дозировке 2,8 мкг/мышь через сутки после иммунизации; 4 – экспериментальная, морским свинкам вводили раствор 0,9% NaCl с STP в дозировке 28,0 мкг/мышь через сутки после иммунизации; 5 – контрольная, морским свинкам вводили стерильный раствор 0,9% NaCl.

2.2.6.4. Аллергизирующая активность

Для оценки аллергизирующей активности STP и HTLP использовали модель подколенного лимфоузла в соответствии с методикой PLNA («popliteal lymph node assay») [Pieters R. 2001; 2014; Миронов А.Н. и др. 2012; Ajithdoss D.K. et al., 2024]. Для этого использовали самцов мышей линии F₁(CBAxC₅₇Bl/6) по 7 животных на экспериментальную точку. Одна лапа, в которую вводили 50 мкл стерильного раствора 0,9% NaCl, служила контролем. Через неделю после введения мышей гуманно умерщвляли методом перикардиальной дислокации, выделяли подколенные лимфоузлы и изучали их в сравнении с контрольными лимфоузлами.

Были сформированы следующие группы: 1 – экспериментальная, вводили субплантарно 50 мкл раствора 0,9% NaCl с HTLP в концентрации 0,28 мкг/мышь; 2 –

экспериментальная, вводили субплантарно 50 мкл раствора 0,9% NaCl с STP в концентрации 1,4 мкг/мышь.

2.2.6.5. Острая и субхроническая токсичность

В тестах на острую токсичность использовали стерильный раствор 0,9% NaCl с STP и HTLP. Исследование проводили в соответствии с методическими рекомендациями [Миронов А.Н. и др. 2012; Ajithdoss D.K. et al., 2024]. Исследуемые образцы вводили внутривенно лабораторным животным в объеме 0,5 мл на мышь. Тестируемые дозировки: 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 и 12,5 мг/кг по действующему веществу для мышей. Контролем служили животные, которым вводили стерильный физиологический раствор. В группах было по 10 животных.

Были сформированы следующие группы: 1 – контрольная, внутривенное однократное введение раствора 0,9% NaCl самцам мышей; 2 – контрольная, внутривенное однократное введение раствора 0,9% NaCl самкам мышей; 3 – экспериментальная, внутривенное однократное введение раствора 0,9% NaCl с STP в дозах 2,5 мг/кг самцам мышей; 4 – экспериментальная, внутривенное однократное введение раствора 0,9% NaCl с STP в дозах 5,0 мг/кг самцам мышей; 5 – экспериментальная, внутривенное однократное введение раствора 0,9% NaCl с STP в дозах 7,5 мг/кг самцам мышей; 6 – экспериментальная, внутривенное однократное введение раствора 0,9% NaCl с STP в дозах 10,0 мг/кг самцам мышей; 7 – экспериментальная, внутривенное однократное введение раствора 0,9% NaCl с STP в дозах 12,5 мг/кг самцам мышей; 8 – экспериментальная, внутривенное однократное введение раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозах 2,5 мг/кг самцам мышей; 9 – экспериментальная, внутривенное однократное введение раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозах 5,0 мг/кг самцам мышей; 10 – экспериментальная, внутривенное однократное введение раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозах 7,5 мг/кг самцам мышей; 11 – экспериментальная, внутривенное однократное введение раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозах 10,0 мг/кг самцам мышей; 12 – экспериментальная, внутривенное однократное введение раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозах 12,5 мг/кг самцам мышей.

Такие же группы были сформированы для внутримышечного и подкожного введения.

В тестах на субхроническую токсичность использовали стерильный раствор 0,9% NaCl с STP и HTLP. Исследуемые образцы наносили лабораторным животным наружно в объеме 0,2 мл на крысу. На каждую точку использовались по 20 животных. При этом 10 животных выводили из эксперимента через месяц, а еще 10 – через полтора для

гистологической и морфологической оценки, гуманно умерщвляя методом цервикальной дислокации.

Были сформированы следующие группы: 1 – контрольная, через день местное нанесение раствора 0,9% NaCl на самках; 2 – контрольная, через день местное нанесение раствора 0,9% NaCl на самцах; 3 – экспериментальная, через день местное нанесение раствора 0,9% NaCl с STP в дозе 0,043 мг/кг на самках; 4 – экспериментальная, через день местное нанесение раствора 0,9% NaCl с STP в дозе 0,043 мг/кг на самцах; 5 – экспериментальная, через день местное нанесение раствора 0,9% NaCl с STP в дозе 0,43 мг/кг на самках; 6 – экспериментальная, через день местное нанесение раствора 0,9% NaCl с STP в дозе 0,43 мг/кг на самцах; 7 – экспериментальная, через день местное нанесение раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозе 0,1 мг/кг на самках; 8 – экспериментальная, через день местное нанесение раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозе 0,1 мг/кг на самцах; 9 – экспериментальная, через день местное нанесение раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозе 0,5 мг/кг на самках; 10 – экспериментальная, через день местное нанесение раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозе 0,5 мг/кг на самцах.

В ходе эксперимента отслеживали состояние подопытных животных: общее состояние (ежедневно), температура и масса тела (еженедельно); поведение крыс в тесте открытое поле (PanLab, Испания; Stoelting, США); ЧДД и АД (неинвазивно на термостатируемом коврик); ЭКГ (электрокардиограф Полиспектр-12 «Нейрософт»); состояние выводящей системы (удельный вес, pH, белок, глюкоза, кетоновые тела, билирубин, микроскопия осадка: эритроциты, лейкоциты), система гемостаза (время начала и окончания свертывания крови) (анализатор LAURA SMART (Erba Lachema, Чехия), микроскопия – DM1000 (Leica, Германия)); биохимический и общий анализ крови с лейкоцитарной формулой (гематологический анализатор BC-3200 и биохимический анализатор BS-120, Mindray, Китай).

Доступ к пище прекращали за 12 часов до исследования.

Гистологическое исследование проводили на микротомовых (SM 2000R, Leica, Германия) срезах парафиновых блоков.

Для острой и субхронической токсичности в течение двух недель животных взвешивали еженедельно, оценивали общее состояние: внешний вид, шерстяной покров, поведение, аппетит, выделения и др. Макроскопическое исследование проводили у всех животных. После двух недель наблюдение за животными проводили эвтаназию углекислым газом и оценивали массовые коэффициенты органов. Помимо этого, в ходе эксперимента оценивали: летальность, явления интоксикации, местно-раздражающее действие (постмортально). Для оценки местно-раздражающего действия изучали кожный покров в

области введения раствора патоморфологически и макроскопически. Для взвешивания и оценки макроскопического состояния органов извлекались: сердце, легкие, тимус, печень, почки, надпочечники, головной мозг. Кроме этого, макроскопически анализировались дополнительно: лимфатические узлы, щитовидная и поджелудочная железа, селезенка, желудок и пищевод, толстый и тонкий кишечник, сердце и аорта, яичники или семенники, мочевой пузырь, костный мозг.

Массовый коэффициент рассчитывался по формуле:

$$K_m = 1000 \times m/M, \quad (1)$$

где m – масса органа, M – масса животного, в граммах.

Определение ЛД₅₀ STP и HTLP при однократном введении проводили методом Дейхмана и Лебланка [van Noordwijk A.J. and van Noordwijk J., 1988], точных показателей ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄ – методом пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксона [Litchfield J.T. Jr. and Wilcoxon F., 1949].

2.2.6.6. Мутагенность

Оценку мутагенности STP и HTLP проводили методом Эймса [Миронов А.Н. и др., 2012; Vijay U. et al., 2018; Ajithdoss D.K. et al., 2024]. Использовали ауксотрофные по гистидину штаммы *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1537. Мутагенность оценивали по возникновению обратных мутаций, приводящих к прототрофности. Исследуемые вещества изучались в дозировке 0,1–1000 мкг/чашку, в качестве контроля использовали физиологический раствор.

2.2.6.7. Эмбриотоксичность и тератогенность

Исследование эмбриотоксических и тератогенных свойств проводили в соответствии с методическими рекомендациями [Миронов А.Н. и др., 2012; Vladimirovich P.V. 2022; Ajithdoss D.K. et al., 2024]. Внутривентрикулярно ежедневно с первого дня до родов вводили физиологические растворы с STP в дозировке 0,07 мг/кг, а HTLP в дозе 0,5 мг/кг. Контролем служили животные, которым по той же схеме вводили только физиологический раствор. На 20-й день у 15 крыс изучали показатели массы плодов, наличие аномалий, пороков развития, предимплантационной и постимплантационной гибели. После родов у 5 оставшихся крыс в течение первого месяца постнатального периода проводили изучение смертности, динамики массы тела и физического развития крысят.

2.2.7. Статистическая обработка результатов

Анализ данных проводился с использованием Python 3 в среде разработки JupyterNotebook. Все данные проходили проверку на нормальность распределения при помощи графического qq-plot и теста Колмогорова-Смирнова. Для статистической обработки результатов использовались следующие критерии и методы: t -критерий Стьюдента, регрессия Кокса, метод Каплана-Майера, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Шапиро-Уилка, критерий Лиллиефорса, критерий Д'Агостино, критерий Пирсона, U-критерий Манна-Уитни (для данных, имеющих ненормальное распределение), энтропийные методы (Шеннона, Колмогорова, перестановочной энтропии с модификациями) [Адельянов А.М. и др., 2024; Kim J. et al., 2024]. Для всех множественных сравнений применялась поправка Бонферрони.

Классическая энтропия Шеннона–Хинчина (ЭШХ) может быть оценена по формуле:

$$H(p_1, \dots, p_N) = -K \sum_{i=1}^N p_i \ln p_i, \quad (2)$$

где p_i – вероятность наблюдаемого значения интенсивности, N – число членов последовательности, а $K > 0$ – коэффициент, определяющий единицу измерения энтропии. ЭШХ может быть корректно рассчитана только для очень длинных последовательностей, поэтому в обычных ситуациях использоваться не может. В связи с этим были разработаны другие способы оценки энтропии, в частности, так называемая перестановочная энтропия (ПЭ), которая в пределе $N \rightarrow \infty$ совпадает с ЭШХ, а для коротких рядов дает ее приемлемые оценки [Адельянов А.М. и др., 2024]. ПЭ определяется как ЭШХ для распределения упорядоченных по амплитуде коротких отрезков последовательности, которым ставится в соответствие определенный символ перестановки, имеющий определенную вероятность. ПЭ часто используется в задачах классификации сложных систем, таких как последовательности нуклеотидов в ДНК, ЭКГ, шумы корабельных моторов и т.п.

ГЛАВА 3

При подготовке данного раздела диссертации использованы статьи A1, A2, A6-A16, A18, A19 из списка публикаций по теме диссертации.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Физико-химические свойства полисахаридов

3.1.1. Выделение и очистка

Выделение высокомолекулярного полисахарида из клубней топинамбура (HTLP) проводили путем экстракции в горячей деионизированной воде с последующей ультрафильтрацией. Применение ультрафильтрационных мембран с отсечкой по молекулярной массе 300 кДа позволило эффективно отделить высокомолекулярную фракцию полисахарида от низкомолекулярных примесей. Анализ полученных фракций методом гельпроникающей хроматографии показал, что более 95% материала в отобранной фракции имеет молекулярную массу 1–2 МДа, что свидетельствует о высокой эффективности выбранного метода фракционирования.

Выделение полисахарида из клубней картофеля с ростками (STP) проводили с использованием холодной экстракции, что позволило минимизировать активность эндогенных ферментов и предотвратить деградацию целевого соединения. Последующее фракционирование методом ультрафильтрации с использованием мембран 10–100 кДа обеспечило получение обогащенной фракции средномолекулярного полисахарида. Термическая обработка концентрата при температуре кипения с последующим центрифугированием позволила удалить денатурированные белковые примеси, что подтверждается снижением содержания белка в конечном продукте до уровня менее 9% по методу Лоури. Анализ методом ГПХ и ВЭЖХ показал, что полученный препарат STP представляет собой полисахарид с молекулярной массой 70 ± 10 кДа.

Методики обеспечивают получение препаратов с высокой степенью очистки и воспроизводимыми характеристиками, что подтверждается результатами физико-химического анализа серий, полученных в разное время. Выход HTLP составил 0,8–1,2%, а STP - 0,3–0,5% в расчете на сырую массу коркового слоя клубней с ростками, что согласуется с литературными данными для полисахаридов аналогичной структуры из других растительных источников. Важно отметить, что использование различных

температурных режимов при экстракции НТЛР и СТР обусловлено различиями в их молекулярной массе и локализации в растительных тканях, что подтверждается данными микроскопического исследования срезов клубней до и после экстракции. Схематически на Рисунке 5 представлена последовательность этапов экстрагирования, очистки и фракционирования НТЛР и СТР из исходного растительного сырья.

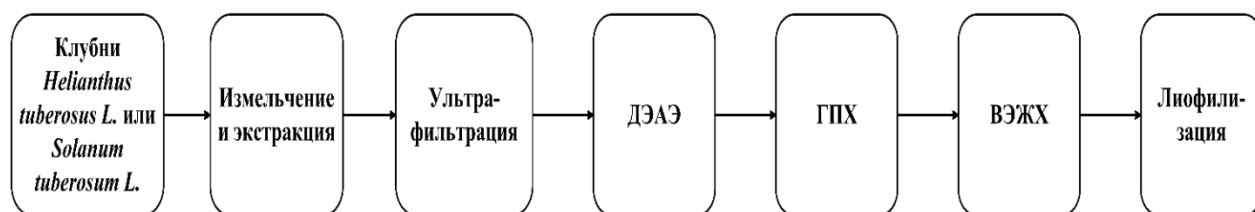


Рисунок 5. Схема этапов получения НТЛР и СТР.

Полученные вещества на ВЭЖХ хроматограммах давали острые симметричные пики, их собирали, концентрировали и анализировали.

У выделенных полисахаридов различаются некоторые физико-химические свойства. Полученный лиофилизат НТЛР представляет собой аморфный порошок беловато-сероватого цвета, без характерного запаха, обладающий хорошей растворимостью (40 г/л) в воде и не растворимый в органических растворителях. При проведении качественных реакций образец показал интенсивное характерное окрашивание фенол-сернокислотным методом, что свидетельствует о высоком содержании углеводных компонентов. Слабое окрашивание в реакции по методу Лоури указывает на наличие минорных белковых примесей в препарате. Водные растворы НТЛР в концентрации 1 мг/мл демонстрируют слабокислую реакцию среды с показателем pH в диапазоне от 4,7 до 5,6.

Ллиофилизат СТР получен в виде аморфного порошка желтовато-белого цвета, без запаха, характеризующегося умеренной растворимостью (9 г/л) в воде и отсутствием растворимости в органических растворителях. Качественные реакции показали интенсивное характерное окрашивание фенол-сернокислотным методом, что подтверждает преимущественно углеводную природу соединения. При этом более выраженная реакция по методу Лоури, по сравнению с НТЛР, указывает на значимое содержание белковых компонентов в структуре. Значения pH водных растворов СТР в концентрации 1 мг/мл находятся в диапазоне от 5,3 до 6,1.

3.1.2. Оптическая спектроскопия

Спектральный анализ в оптической области позволил выявить характерные особенности структуры исследуемых полисахаридов. На спектре (Рисунок 6) образца HTLP в диапазоне длин волн 190–1100 нм обнаружен выраженный максимум поглощения в области 190-210 нм, типичный для полисахаридных соединений. В данной области наблюдаются четыре локальных экстремума, что может свидетельствовать о наличии в структуре молекулы четырех различных группировок, обладающих поглощением в УФ-диапазоне. Наличие слабовыраженного пика поглощения в области 280 нм коррелирует с данными анализа по методу Лоури и подтверждает присутствие минорных белковых примесей в препарате.

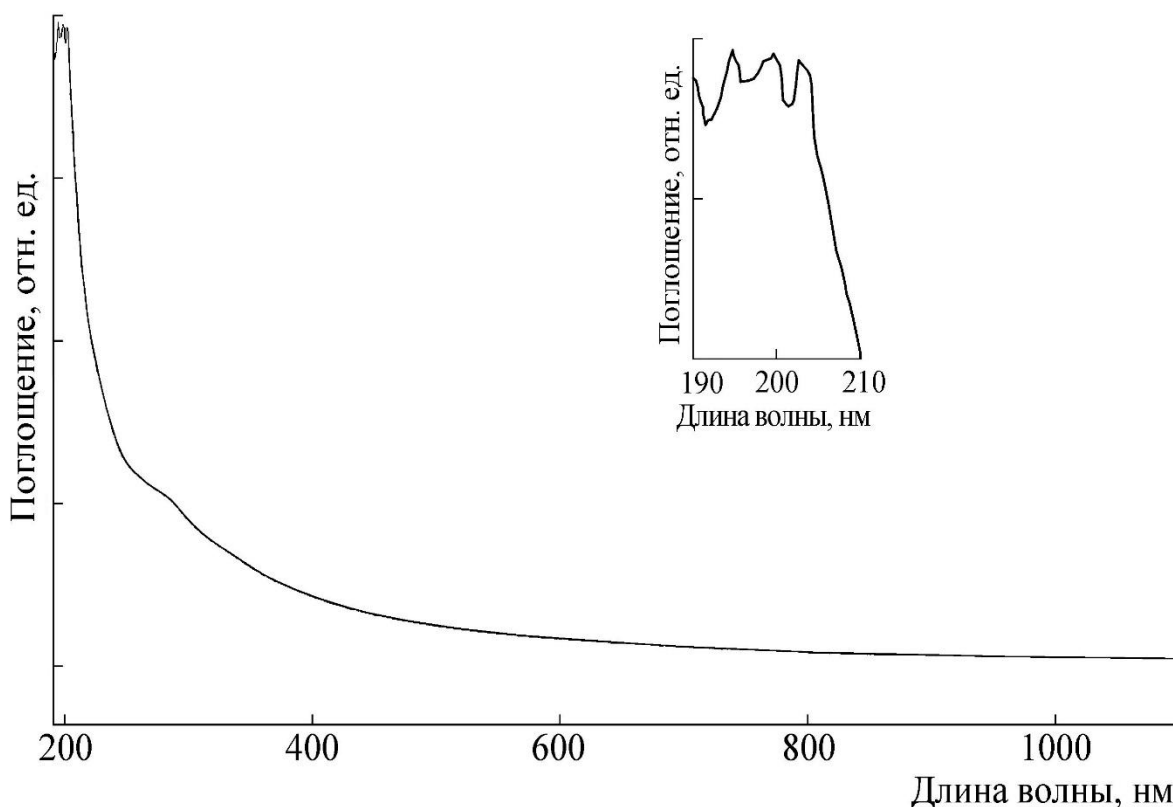


Рисунок 6. Характерный спектр поглощения образца HTLP.

На Рисунке 7 представлен оптический спектр образца STP в интервале длин волн 190–1100 нм. На спектре присутствует пик в области 190 нм, характерный для полисахаридов, и выраженный пик поглощения в области 280 нм, характерный для π – π^* электронных переходов в ароматических и полиароматических соединениях, встречающихся в большинстве сопряженных молекул, например белковой природы, что дополнительно указывает на наличие белка в этом соединении.

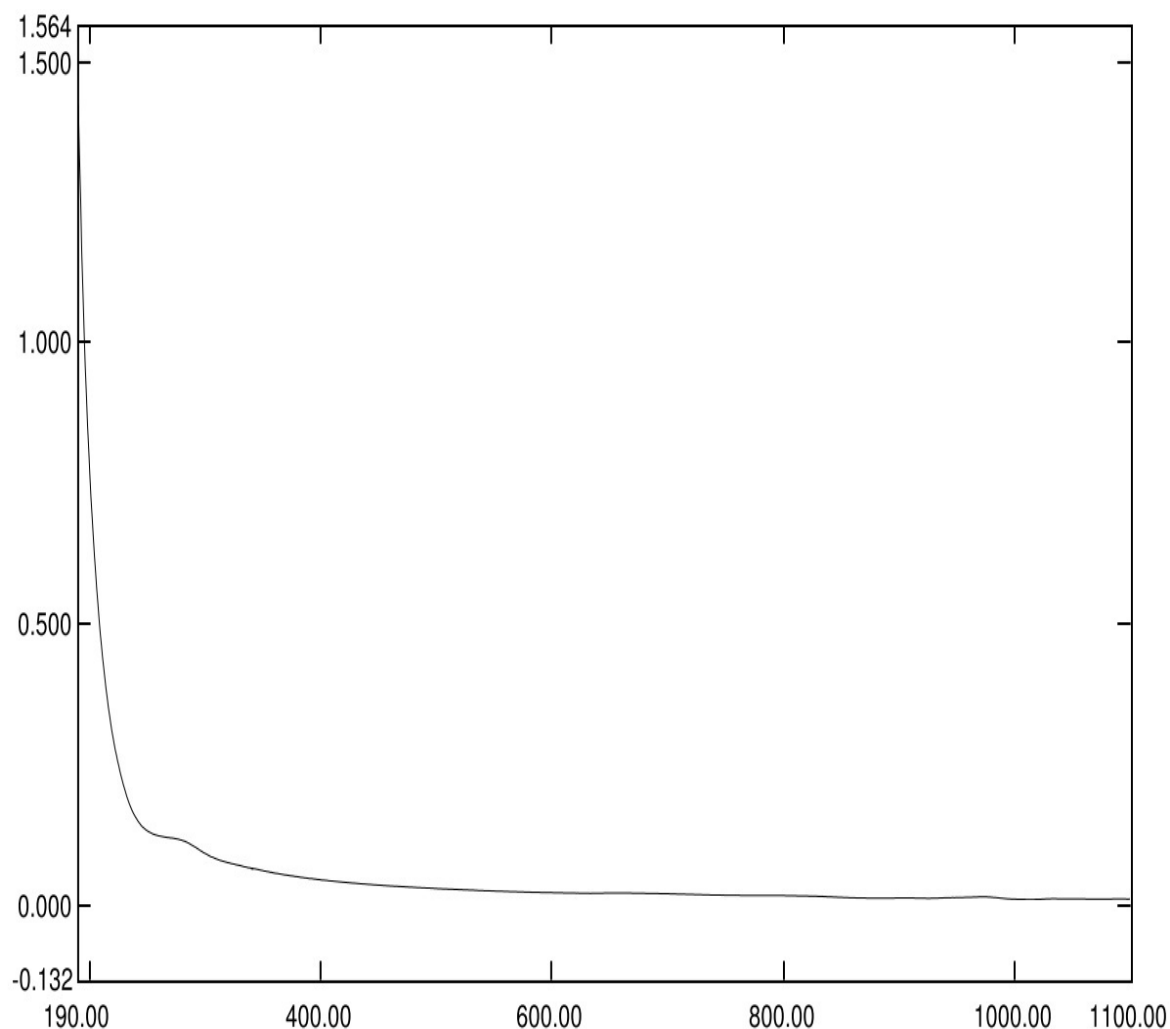


Рисунок 7. Характерный спектр поглощения образца STP. По оси ординат – поглощение в относительных единицах, по оси абсцисс – длина волны в нм.

Эти результаты указывают на то, что HTLP является сложным веществом с крупными молекулами, которое содержит несколько групп, поглощающих в УФ-диапазоне, а STP – вещество полисахаридной, в основном, природы, имеющую белковую часть в своем составе.

3.1.3. Инфракрасная спектроскопия

Характерный ИК-спектр HTLP представлен на Рисунке 8. В инфракрасной области спектра у полисахарида HTLP обнаружены характерные полосы поглощения. Так, например, известно, что широкая полоса в области $3600\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ соответствует валентным колебаниям ОН в полисахариде. Пики в $2922, 2853\text{ см}^{-1}$ могут соответствовать С–Н; а в $2361\text{ и }2342\text{ см}^{-1}$ – $=\text{N}^+\text{H}^-$, $\equiv\text{NH}^+$, $=\text{NH}^{2+}$. Кроме того, хорошо разрешенная группа умеренных полос, расположенных в области $3000\text{--}2500\text{ см}^{-1}$, может быть отнесена к

симметричным и асимметричным валентным колебаниям скелетных СН и СН₂ в полисахаридах [Wang Y.X. et al., 2022].

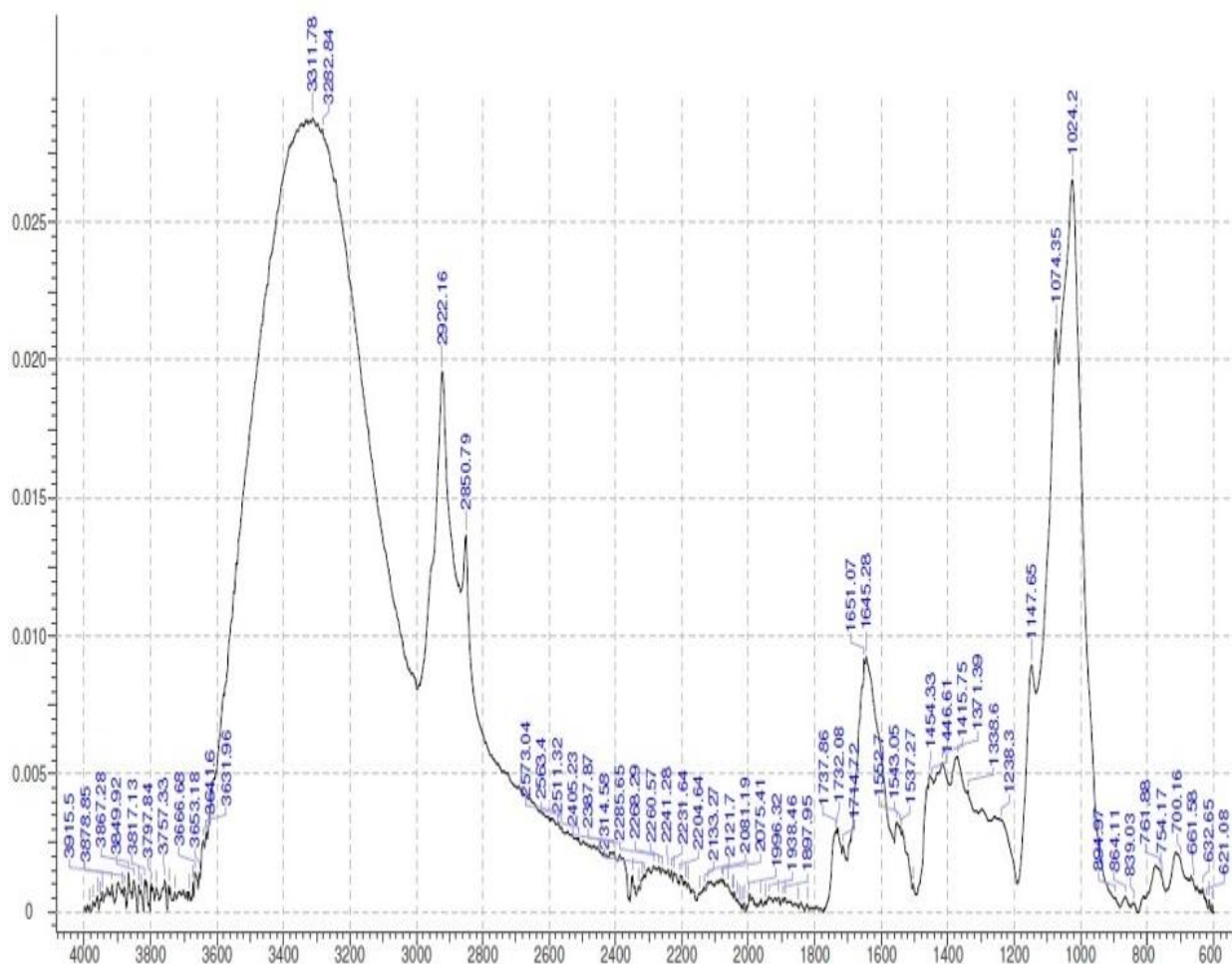


Рисунок 8. Характерный ИК-Фурье спектр HTLP. По оси ординат – поглощение в относительных единицах, по оси абсцисс – волновое число в см⁻¹.

Область поглощения 1800–1500 см⁻¹ называется областью «растяжения двойных связей». Пики поглощения 1651 и 1645 см⁻¹ часто относят к кристаллизованной воде и С=С, а 1028, 1076 и 1150 см⁻¹ к С–О, С–О–С и кольцевым колебаниям пиранозного цикла. Сильная и широкая полоса в области 1000–1200 см⁻¹ характеризует ОН, связанную водородной связью; поглощение около 1740 см⁻¹ соответствует карбоксильной группе, указывающей на существование уроновых кислот в полисахариде [Hong T. et al., 2021], сильные поглощения на 1074 и 1024 см⁻¹, среднее поглощение на 1148 см⁻¹, при наличии колебаний пиранозного кольца, означают структуру, присущую β-гликану. Пик в области 1737 см⁻¹ можно отнести к колебаниям СН₃СО- группы, а 1645 см⁻¹ к -СОО-.

Полосы при 1138, 1124 и 1067 см⁻¹ являются областями поглощения уроновых кислот, но, скорее всего, они возникают из-за наложения 1118 см⁻¹ и 1085 см⁻¹ от С–О–С

валентных колебаний гликозидной связи, а 1138 см^{-1} – растяжения $\text{CH}_2\text{--O}$. В области $1600\text{--}1800\text{ см}^{-1}$ присутствуют пики колебаний, характерные для растяжений C=O , присущие альдегидам, кетонам и карбоксильным кислотам.

ИК-спектр STP представлен на Рисунке 9 и Таблице 2. Поглощения при 3442 , 3377 и 3130 см^{-1} соответствуют колебаниям --C--H групп CH_2 . Растягивающие колебания C--O , C--C и кольцевых структур доминируют в области $1200\text{--}800\text{ см}^{-1}$.

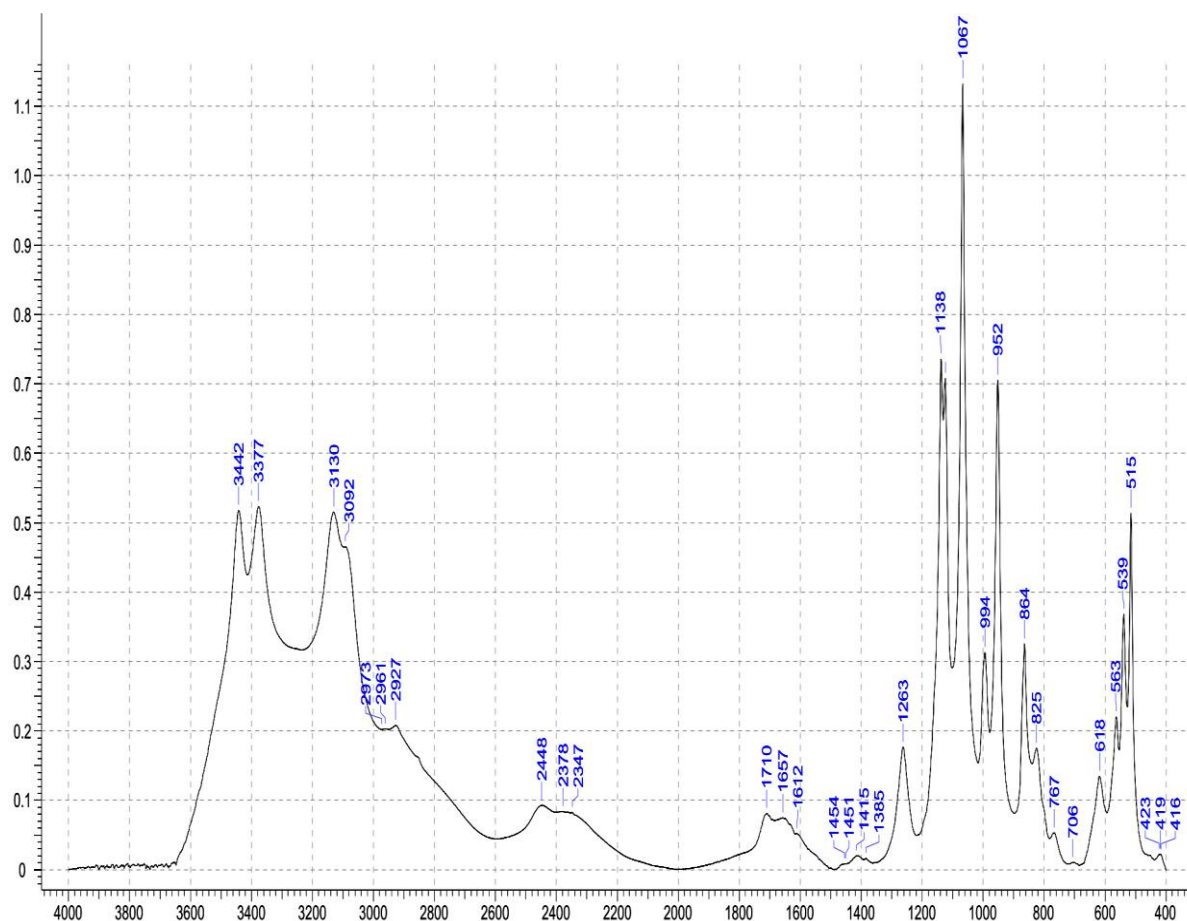


Рисунок 9. Характерный ИК-Фурье спектр STP. По оси ординат – поглощение в относительных единицах, по оси абсцисс – волновое число в см^{-1} .

Кроме того, некоторые авторы показали, что полоса поглощения в диапазоне $1100\text{--}1030\text{ см}^{-1}$ с максимумом при 1067 см^{-1} может соответствовать галактозе [Wiercigroch et al., 2017]. Предполагается, что пик 864 см^{-1} относится к колебаниям растяжения C--O--C ($\beta\text{--}(1\rightarrow4)$ -гликозидной связи). Область $1148\text{--}1041\text{ см}^{-1}$ характерна для колебаний гликозидной связи и углеводного цикла.

Таблица 2. Данные спектроскопии ИК-Фурье STP.

Метод анализа	Пики (см^{-1})
ИК-Фурье	3442, 3377, 3130, 2448, 1710, 1415, 1263, 1138, 1124, 1067, 994, 952, 864, 825, 618, 563, 539, 515, 419

В ИК-спектрах HTLP и STP представлены, в том числе, общие для всех углеводов пики [Muthana S.M. and Campbell C.T., 2012; van Kooyk V. and Rabinovich G.A., 2008; Silva T.H., 2012].

3.1.4. Рамановская спектроскопия

Результаты анализа спектров SERS с помощью ПЭ по формуле (2) показали, что перестановочная энтропия растворов стандартов моносахаридов составила для D-Ara – $3,14 \pm 0,01$, D-Gal – $3,21 \pm 0,01$, D-Glc – $3,06 \pm 0,01$ и L-Ara – $3,15 \pm 0,01$. Эти данные позволяют утверждать, что энтропийный метод обсчета дает возможность различать характерные спектральные полосы у разных моносахаридов в растворах.

С помощью рамановской спектроскопии были получены спектры HTLP и STP на длинах волн 532, 638 и 785 нм. При этом, само по себе комбинационное рассеяние ни на одной длине волны не позволило сделать значимых выводов о структуре вещества. Для этого дополнительно проводили SERS-исследование образцов в концентрации 1 мг/мл. Характерные спектры представлены на Рисунках 10 и 11 для HTLP и STP, соответственно.

Были выявлены значимые линии: 513 см^{-1} – относят к колебаниям серы, 733 и 1470 см^{-1} – характерные пики связи C–O. В остальных случаях наблюдалась область аморфного углерода – $1127\text{--}1682 \text{ см}^{-1}$. Колебания, характерные для растяжения связи C=C, соответствуют линиям спектра при 1604 см^{-1} , а C=O – при 1676 см^{-1} . Кроме того, для STP характерно наличие CONH колебаний в районе 1600 см^{-1} , что свидетельствует о наличии белковой части молекулы [Vandanjon L. et al., 2023].

Характерные выраженные колебания для углеводов обнаруживаются в области 3421 см^{-1} для группы OH, а в районе 1085 и 1020 см^{-1} – C–O кольцевой структуры полисахарида C–OH/C–O–C. Характерные полосы для CH_2 и CH обнаружены между 2930 и 2820 см^{-1} и CH_2 при 1460 см^{-1} . Полоса при 1378 см^{-1} соответствует изгибным колебаниям групп OH и CH_2 . Полоса при 930 см^{-1} , предположительно, может быть отнесена к растяжению CN связи, а в области 2934 см^{-1} , наблюдаемая, в том числе, у хитозана, представляет собой растяжение CH_3 . Пики в области $1300\text{--}1370 \text{ см}^{-1}$ характерны для различных колебаний CCH, OCH, HCH и CONH, включая изгибы [Gieroba B. et al., 2023].

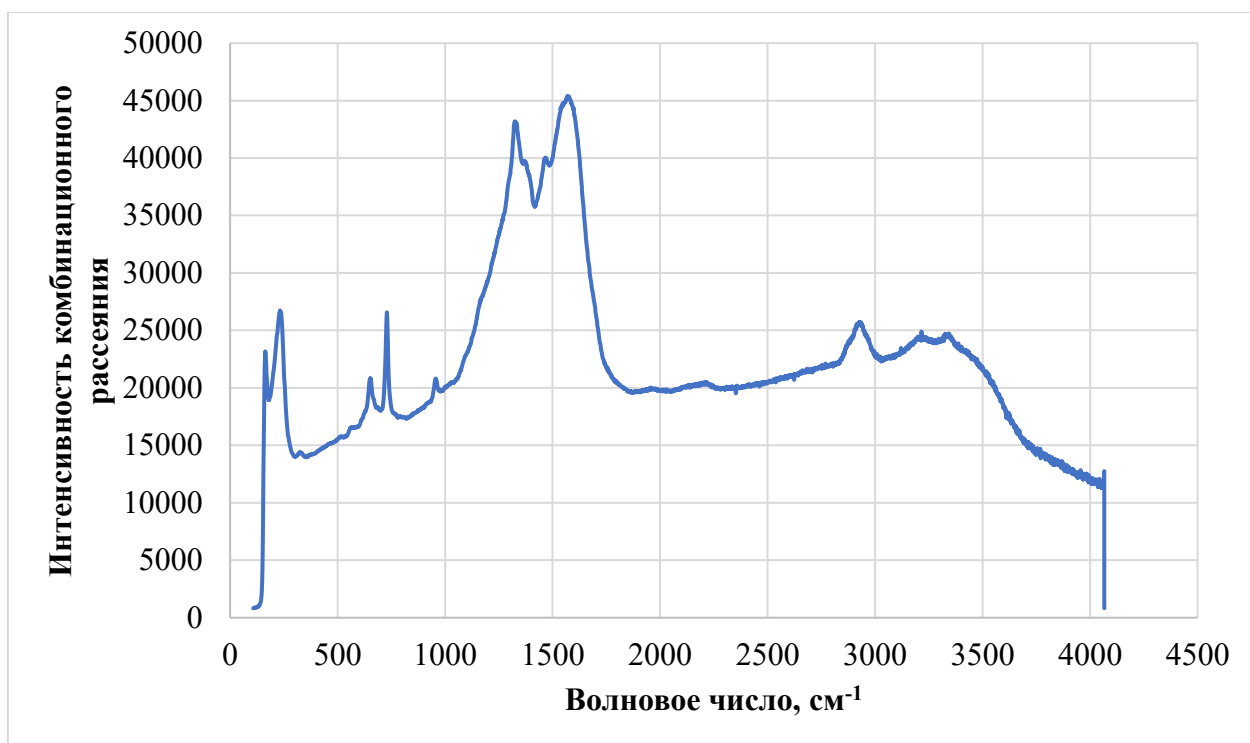


Рисунок 10. Характерный SERS-спектр HTLP.

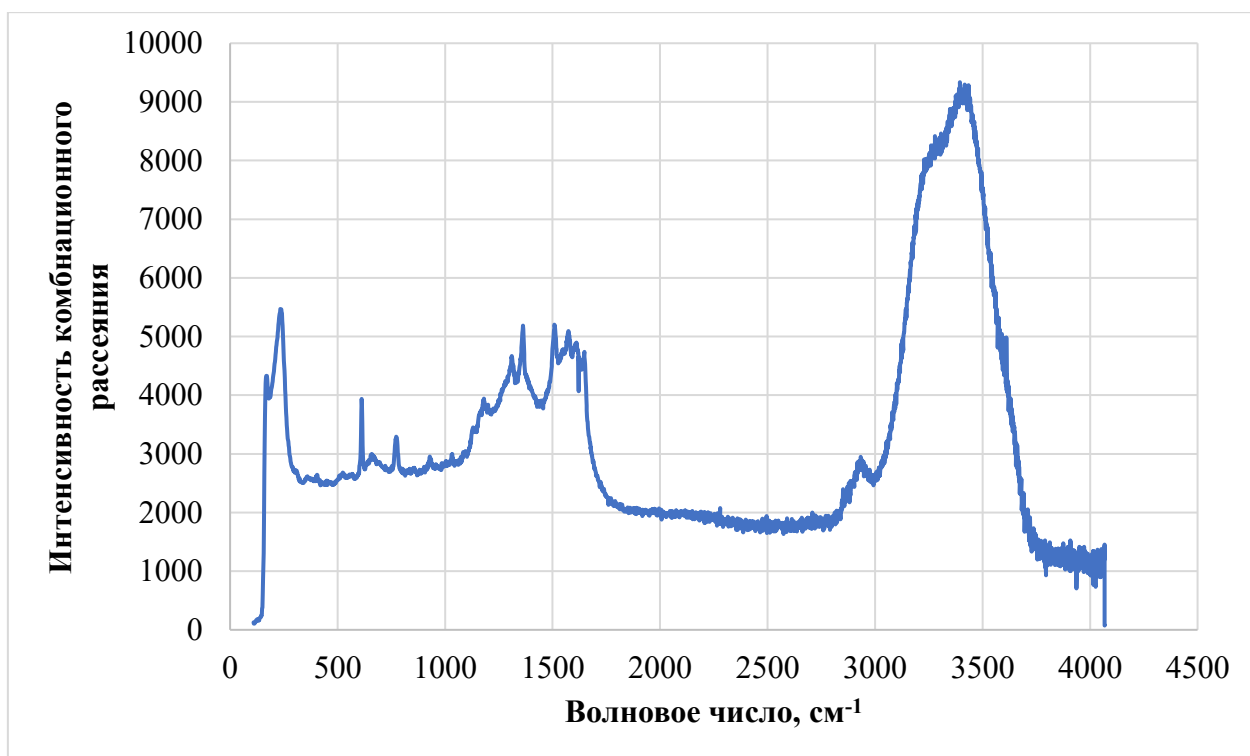


Рисунок 11. Характерный SERS-спектр STP.

На Рисунках 12 и 13 представлены спектры комбинационного рассеяния STP и HTLP после проведения реакции в кислой среде с последующим исследованием на коллоидном растворе серебра.

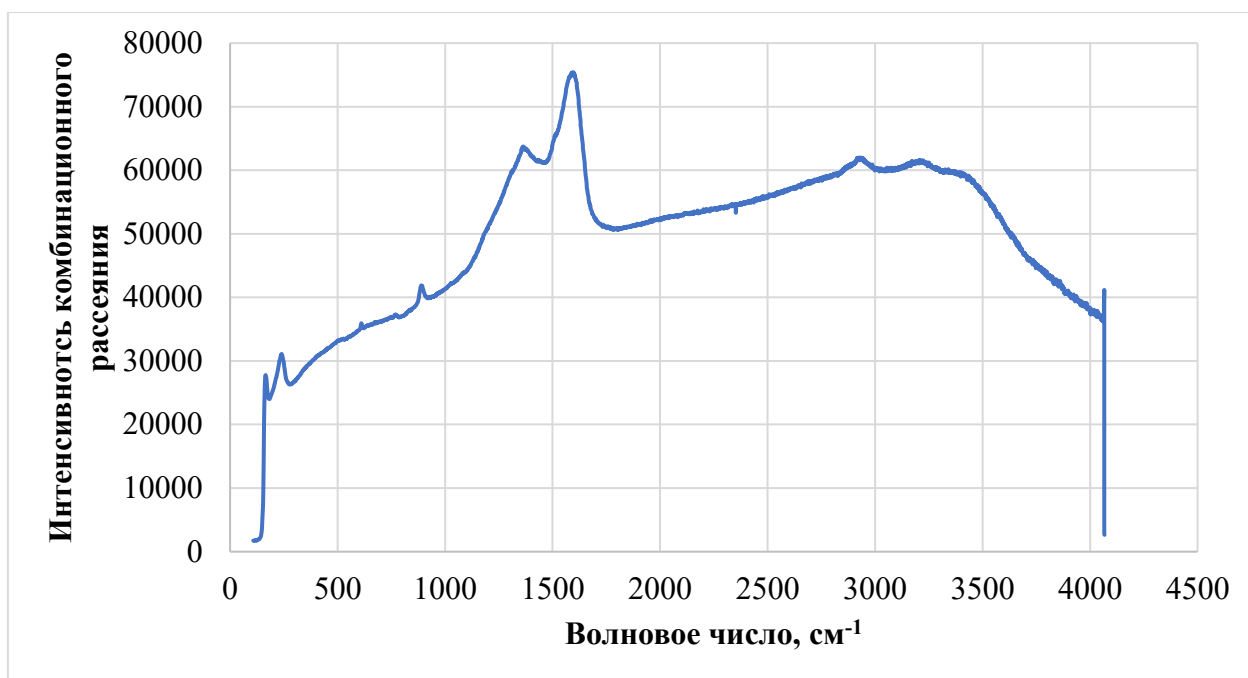


Рисунок 12. Характерный рамановский спектр для коллоидного раствора STP.

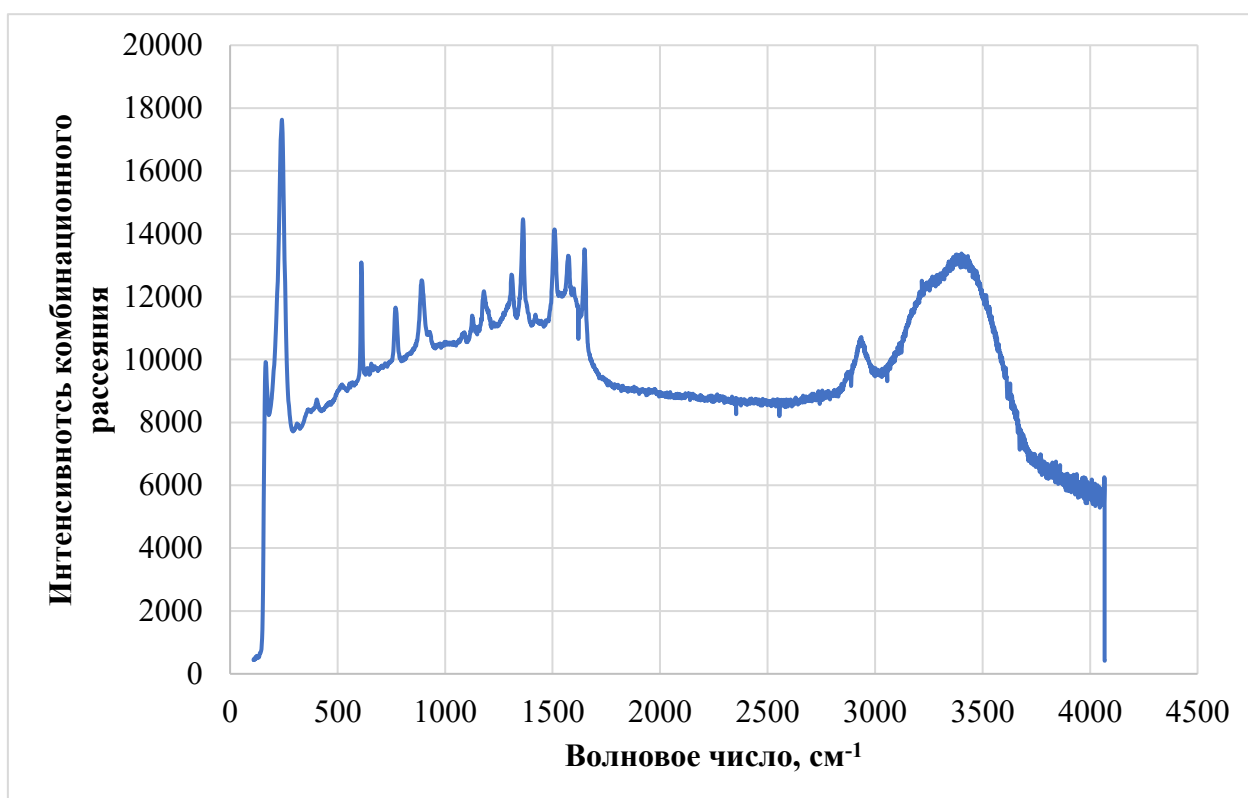


Рисунок 13. Характерный рамановский спектр для коллоидного раствора HTLP

Были обнаружены следующие характерные для углеводов линии спектра: 307, 364, 966 и 1128 см^{-1} , которые встречаются у декстринов и других сахаридов; колебания при 644, 659 и 733 см^{-1} относят к связи C–O; область 1127–1682 см^{-1} соответствует аморфному

углероду. Также наблюдаются пики характерные для продуктов окисления сахаридов – производных фурана и фурфурола: 1030, 1064, 1209, 1401, 1410 см^{-1} . Полоса в 1461 см^{-1} свидетельствует о наличии связи $\text{C}=\text{O}$, а в области 350–600 – пиранозного кольца [Ting-jian J. et al., 2008; Wan F. et al., 2022]. Стоит отметить, что применение и рамановской спектроскопии, и SERS-метода еще требует более глубокой проработки с точки зрения анализа именно полисахаридных молекул.

3.1.5. Круговой дихроизм

Анализ спектров кругового дихроизма (КД) используется для изучения оптической анизотропии различных веществ. Чаще всего этот метод используется для анализа вторичной и третичной структуры белков. Для крупных молекул, имеющих разветвленную структуру, особенно углеводной природы, анализ спектров кругового дихроизма сопряжен с большими трудностями.

Характерные графики STP и HTLP для эффекта Коттона представлены на Рисунках 14 и 15.

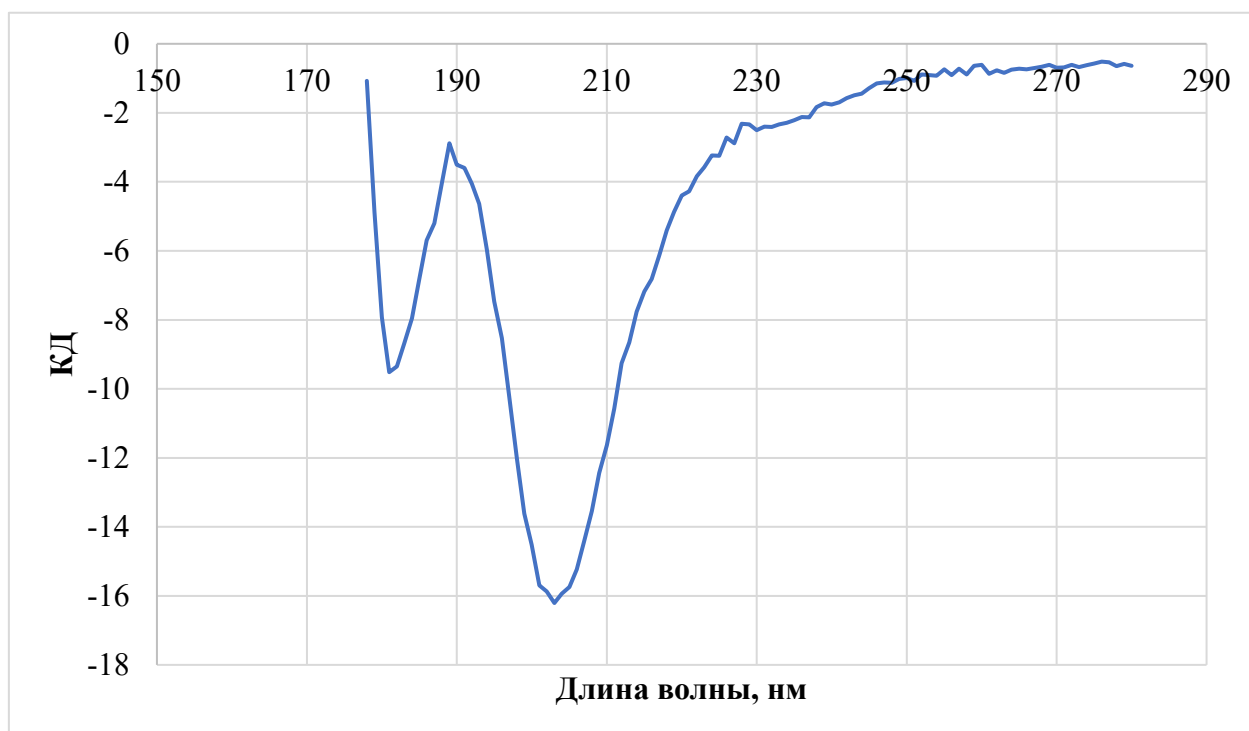


Рисунок 14. Характерный КД-спектр STP.



Рисунок 15. Характерный КД-спектр HTLP.

Показано, что полисахариды могут обладать определенными конформационными особенностями в растворах. Например, они могут принимать конформацию спирали, полугибких, жестких или спиральных цепей (одинарных, двойных или тройных) [Guo Q. et al., 2021], червеобразную форму, стержнеобразную форму и агрегат [Wang Q. et al., 2017; Yang L.Q. and Zhang L.M., 2009]. Пока не удалось найти прямую аналогию с белками (по первичной, вторичной, третичной и четвертичной структурам), поскольку у полисахаридов имеются неопределенности в их иерархической организации [Diener M. et al., 2019].

Исходя из данных литературы [Sun Y. et al., 2018; Liu J. et al., 2020; Du B. et al., 2022] и на основании полученных КД-спектров можно предположить, что HTLP, который имеет положительные (при 195 нм) и отрицательные (при 225 нм) эффекты Коттона, содержит – спиралеподобные структуры и складчатоподобные, а STP (только отрицательный эффект Коттона) – складчатоподобные структуры. С другой стороны, в спектре STP обнаруживается несколько локальных экстремумов, что может свидетельствовать о наличии нескольких крупных аномерных центров [Miles A.J., et al., 2018]. Однако для более точного описания структурных особенностей по КД-спектрам исследуемых полисахаридов требуется проводить анализ в условиях глубокого вакуума, что позволит расширить спектральный диапазон в область короткого ультрафиолета (120 нм). Необходимо также проводить отдельное изучение влияния различных гидролизующих, температурных, pH и других условий на конформационное состояние молекул полисахаридов.

3.1.6. Анализ моносахаридного состава

Анализ моносахаридного состава проводили методами ВЭЖХ и ГЖХ после процедуры кислотного гидролиза. На Рисунке 16 представлен моносахаридный состав кислотного гидролизата полисахарида HTLP, полученный методом ВЭЖХ, а на Рисунке 17 – методом ГЖХ.

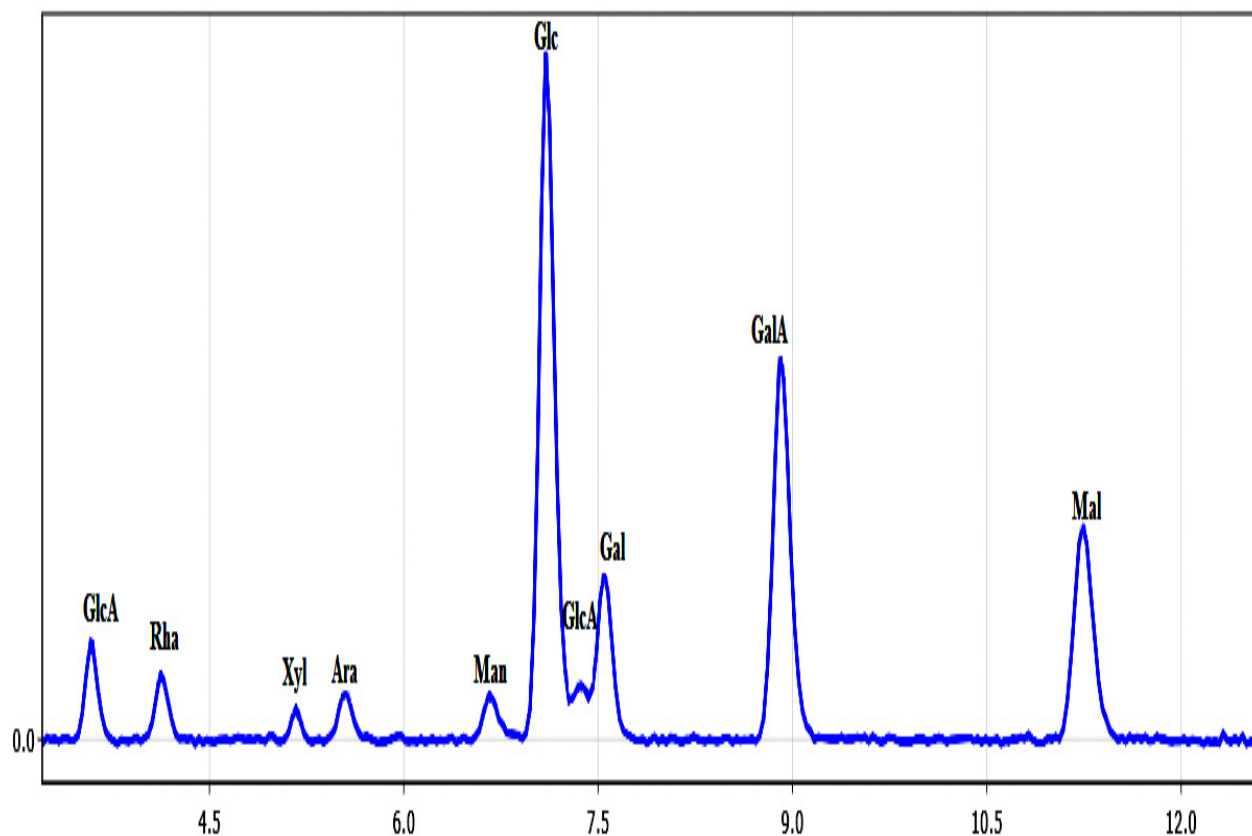


Рисунок 16. Характерная ВЭЖХ-хроматограмма HTLP. По оси ординат – сигнал детектора в относительных оптических единицах, по оси абсцисс – времена удерживания в минутах.

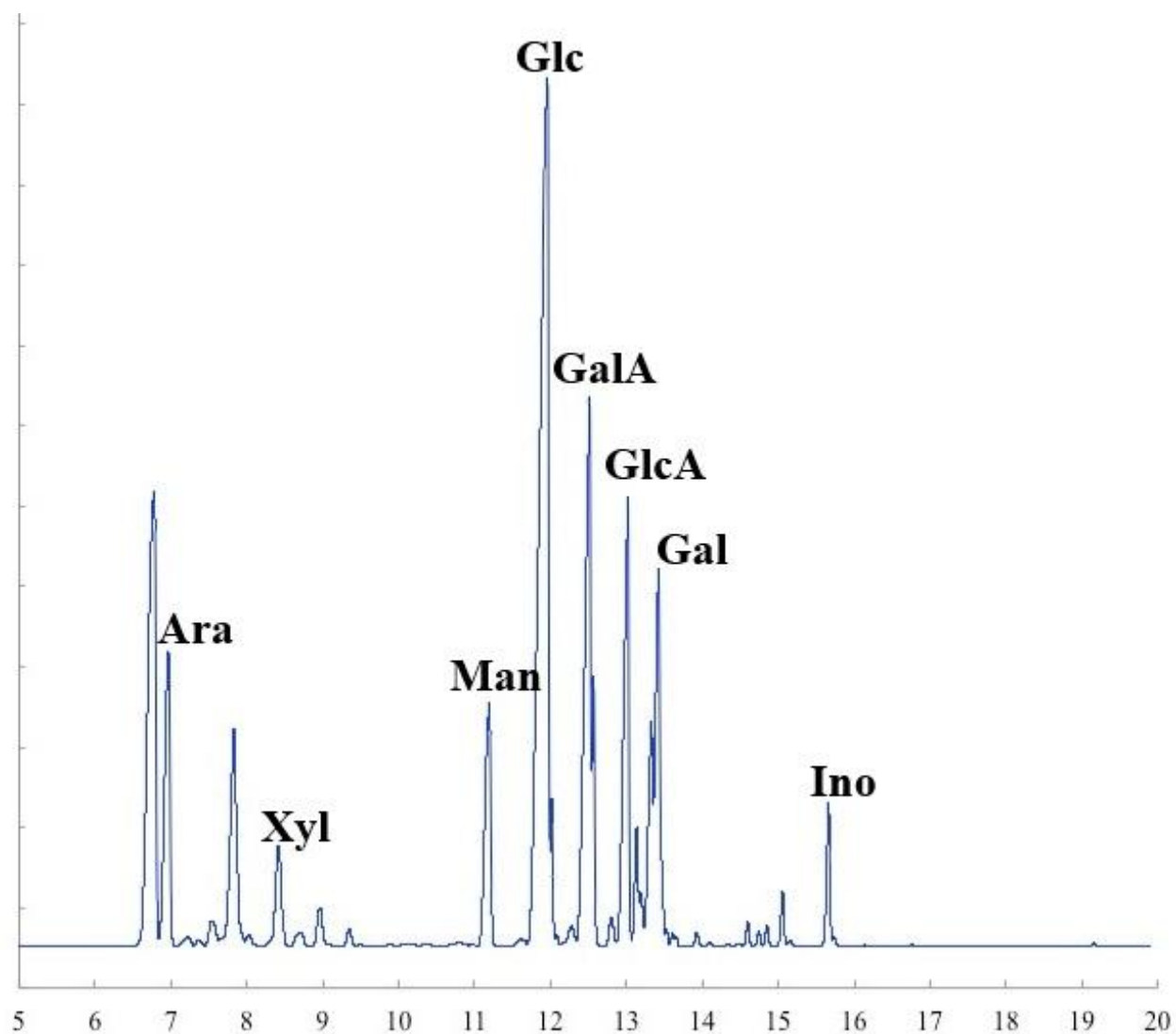


Рисунок 17. Характерная ГЖХ-хроматограмма HTLP. По оси абсцисс – времена удержания в минутах, по оси ординат – поглощение в относительных единицах.

Хроматографический анализ показал, что полисахарид HTLP имеет следующий моносахаридный состав: Glc – 25–34%, GalA – 21–26%, GlcA – 11–17%, Gal – 9–18%, Rha – 2–9%, Ara – 3–7%, Man – 1–5%, Xyl – 1–3%. Основными элементами являются глюкоза, галактоза и уроновые кислоты.

Анализ моносахаридного состава STP проводили методами ВЭЖХ и ГЖХ. Хроматограмма ВЭЖХ на Рисунке 18 показывает присутствие галактозы (Gal) и арабинозы (Ara), 36,5–48,7% и 23,5–27,6% соответственно, а также остатков моносахаридов глюкозы (Glc).

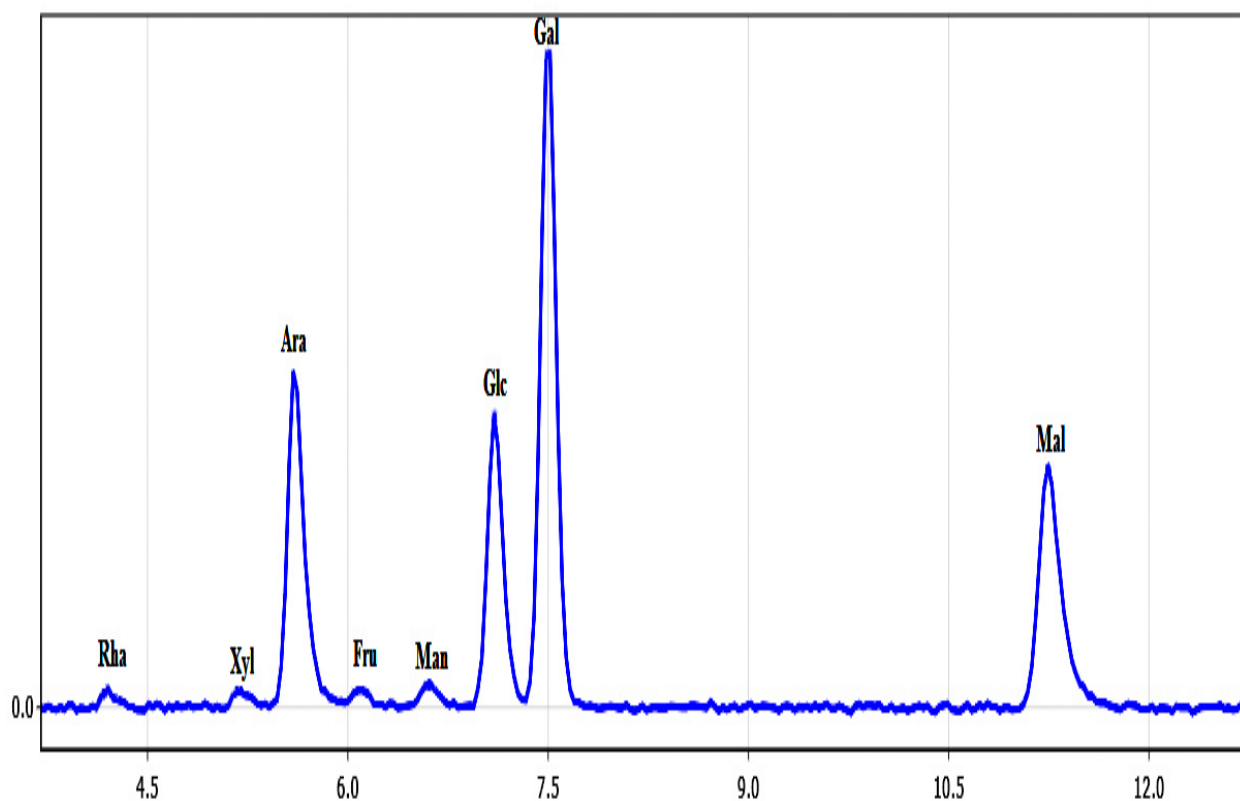


Рисунок 18. Характерная ВЭЖХ-хроматограмма гидролизата STP. По оси ординат — сигнал детектора в относительных оптических единицах, по оси абсцисс — времена удерживания в минутах.

Схожие результаты получены методом ГЖХ. Хроматограмма ГЖХ приведена на Рисунке 19. Хроматографически установлено, что STP в основном состоит из галактозы (Gal) и арабинозы (Ara), 36–49% и 22–29% соответственно, а также остатков моносахаридов глюкозы (Glc) (8–20%). Тем не менее, в небольших количествах (<2%) могут обнаруживаться ксилоза, манноза, фукоза и рамноза.

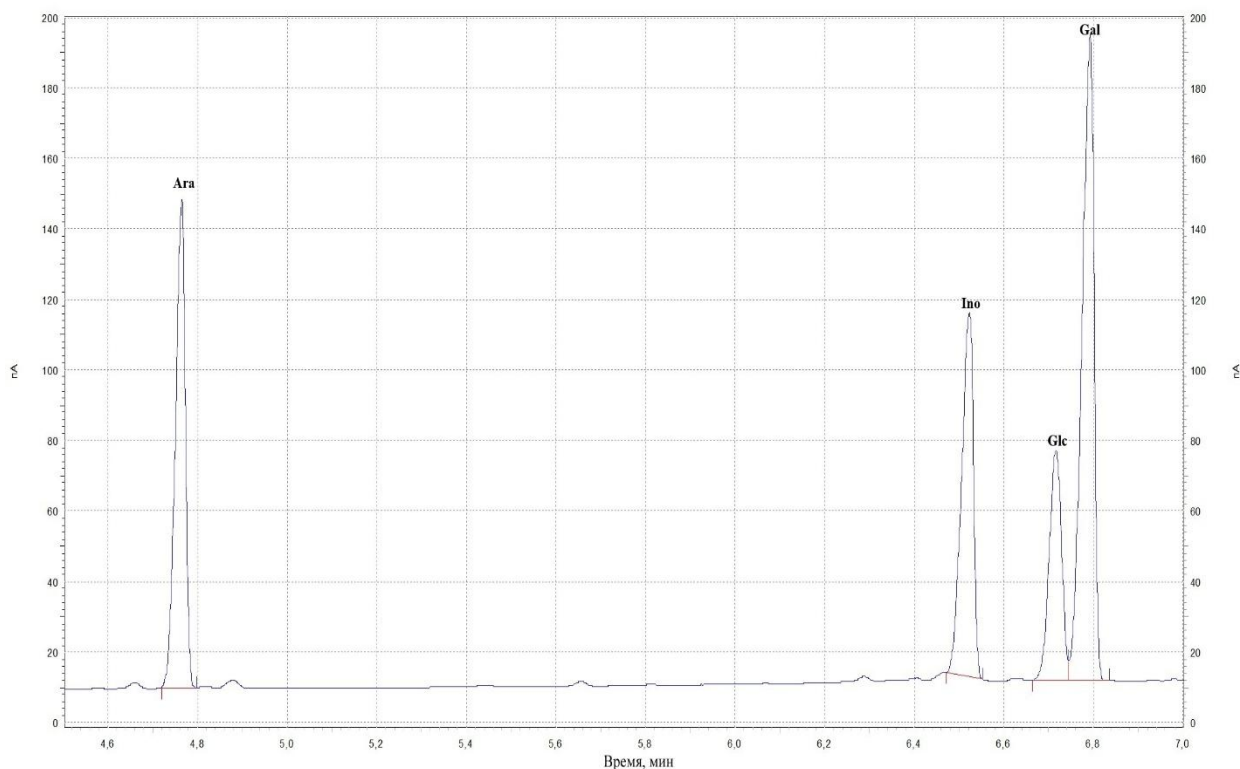


Рисунок 19. Характерная ГЖХ-хроматограмма STP. По оси абсцисс – времена удерживания в минутах, по оси ординат – поглощение в относительных единицах.

Определение количества белка методом Лоури и сахара методом Дюбуа в полисахариде HTLP показало 0,5% белка и 98% карбогидратов, для STP – 9% и 90%, соответственно.

3.1.7. Гель-электрофорез

Был проведен электрофорез STP и определена ММ изучаемого вещества по калибровочной прямой, которую строили по интенсивности полос молекулярных маркеров (на Рисунке 20).

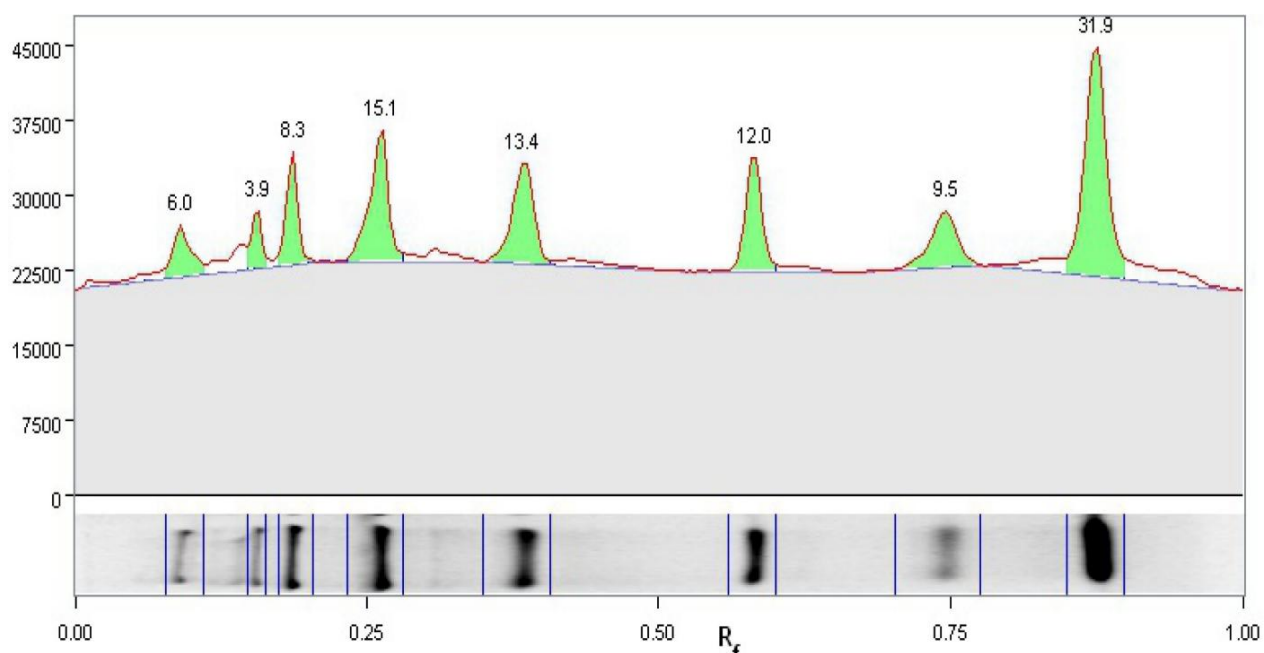


Рисунок 20. Электрофореграмма молекулярных маркеров. По оси ординат – интенсивность сигнала, по оси абсцисс – коэффициент замедления.

Как показано на Рисунке 21, электрофорез показывает наличие одиночной полосы, соответствующей веществу с молекулярной массой около 70,0 кДа.

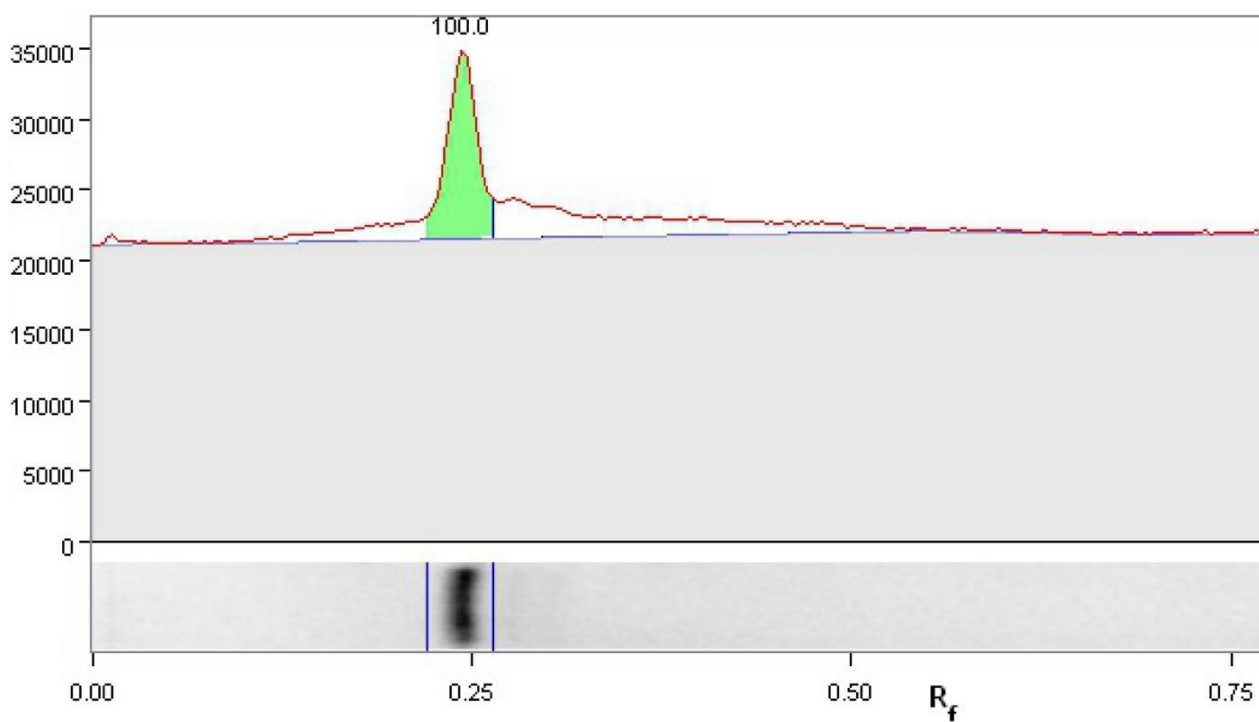


Рисунок 21. Характерная электрофореграмма STP. По оси ординат – интенсивность сигнала, по оси абсцисс – коэффициент замедления (R_f).

Обнаружено, что полученное соединение окрашивается красителем Кумасси и реагентом Шиффа, что может свидетельствовать о наличии в двух частей – углеводной и белковой. Анализ этого вещества фенол-сернокислотным методом и по реакции с реагентом Шиффа, позволяет предположить, что эта полоса с массой около 70 кДа представлена веществом, которое является гликопротеином. Учитывая, что содержание белка в молекуле составляет около 9%, ММ белка должна быть около 6,3 кДа.

Для HTLP проведение гель-электрофореза не дало возможности определить присутствующую примесь белка, что может быть объяснено несколькими причинами. Во-первых, низким содержанием белка в образце (всего 0,5%); во-вторых, белок может попадать «внутри» полисахаридной молекулы, что будет препятствовать его детектированию; в-третьих, в электрофоретических условиях слабо связанный с углеводной частью белок может деградировать.

3.1.7. Анализ аминокислотного состава

На Рисунке 22 представлен характерный профиль аминокраммы STP.

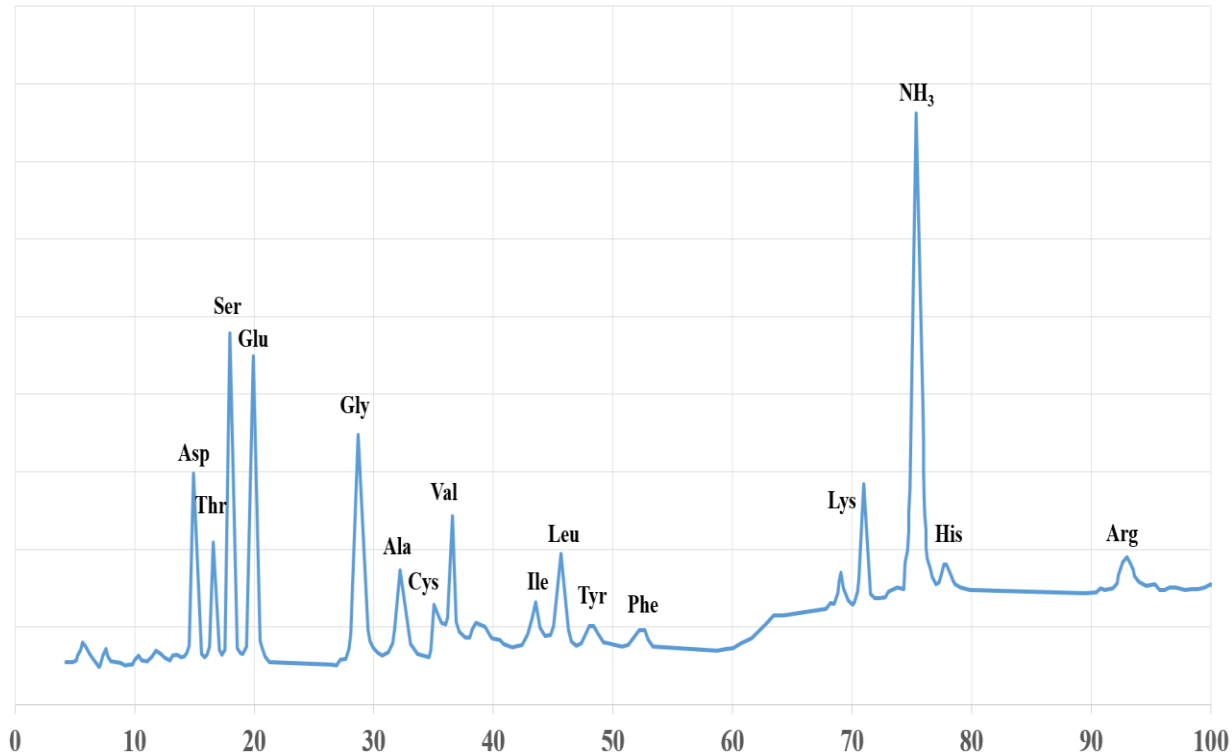


Рисунок 22. Характерная аминокрамма STP. По оси ординат – поглощение в относительных единицах, по оси абсцисс – время в минутах.

В результате анализа аминокислотного состава установлено, что в процентном соотношении в белке содержатся в основном: глутаминовая кислота (17–20%), серин (10–13%), аспарагиновая кислота (8–10%) и глицин (11–12%), а в минорных количествах: треонин (4–6%), аланин (7–9%), цистеин (2–3%), валин (5–7%), лейцин (6–7%) и изолейцин (2–3%), тирозин (2–4%), фенилаланин (3–4%), лизин (5–6%), гистидин (1–2%), аргинин (2–3%).

Для молекулы HTLP получить воспроизводимых результатов аминокислотного состава белковой части не удалось, что косвенно свидетельствует о ее примесной природе.

3.1.8. Атомно-силовая микроскопия

Полисахариды, гликопротеины, и другие высокомолекулярные вещества могут образовывать агрегаты в водных растворах. Для визуализации этих агрегатов, оценки их геометрических и адсорбционных свойств может применяться метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) [Abu-Lail N.I. and Camesano T.A., 2003; Nia H.T. et al., 2015]. Установлено, что адсорбция STP и HTLP на поверхность слюды хорошо проходит в водном и физиологическом растворе во всех концентрациях. Видно, что в обоих случаях поверхность слюды покрыта однородно (Рисунки 23 и 24).

Покрывтие имело зернистую структуру, для HTLP размер зерен колебался в интервале 210–350 нм по ширине и 220–280 нм по высоте. В некоторых местах однородного покрытия были обнаружены «дырки» глубиной примерно 150 нм.

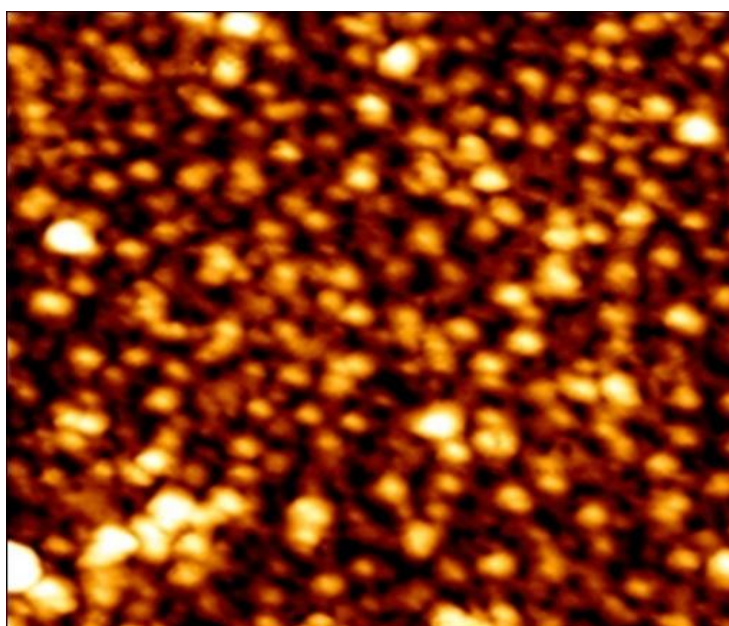


Рисунок 23. Характерный снимок АСМ для HTLP.

В случае с STP покрытие также имело зернистую структуру. В автоматическом режиме анализа в поле зрения обнаруживается 516 частиц со средним размером $17,7 \pm 8,5$ нм ($28,2 \pm 12,7$ по длине и $1,5 \pm 0,7$ нм по высоте). Вероятно, в водных растворах полисахариды и гликопротеины адсорбируются на подложку в виде глобулярных структур.

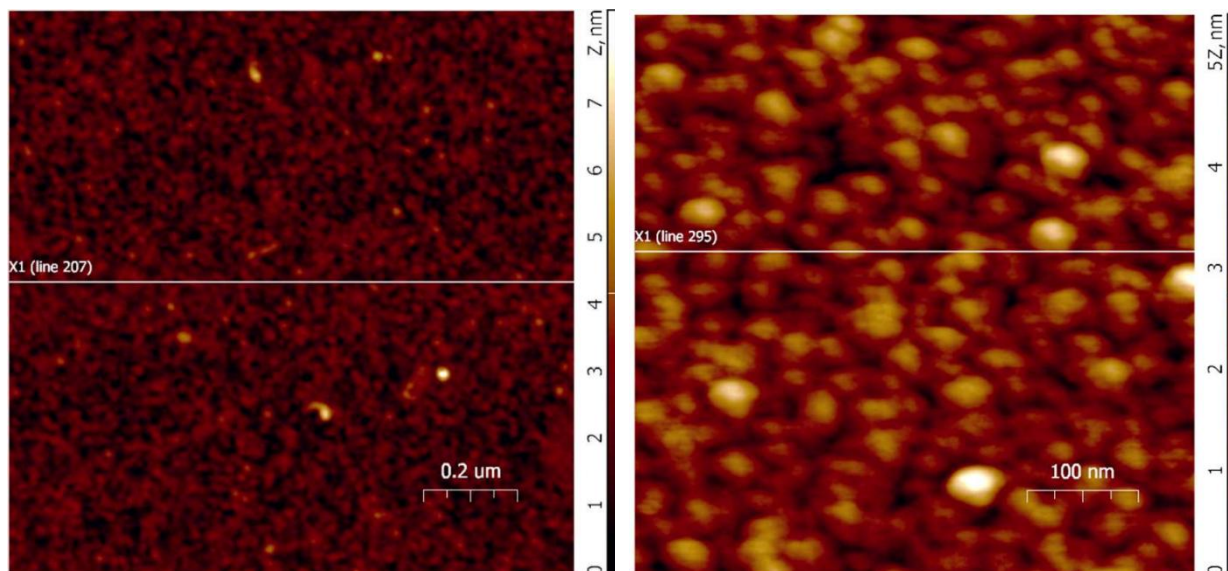


Рисунок 24. Характерный снимок АСМ для STP.

С учетом хроматографических, колориметрических и электрофоретических данных допустимо предположить, что НТЛР является высокомолекулярным (1–2 МДа) полисахаридом, а STP представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 70 кДа.

3.1.9. Обработка ферментами

После инактивации ферментов гидролизаты НТЛР тестировали методом Эрне. Обработка α -амилазой не приводила к изменению в биологической активности НТЛР, что свидетельствует об отсутствии в образце α -(1→4)-гликозидной связи. При обработке литиказой биологическая активность колебалась в интервале 53–83 АОК, при контрольном значении 65 ± 7 АОК. При обработке целлюлазой – 74–127 АОК и 83 ± 9 АОК в контроле. Эти данные подтверждают наличие в образце β -(1→4)- и β -(1→3)-гликозидных связей, необходимых для реализации биологической активности.

После инактивации ферментов гидролизаты STP тестировали методом Эрне. Обработка амилазой не приводила к изменению в биологической активности STP, что свидетельствует об отсутствии примесей крахмала в образце и α -(1→4)-гликозидной связи.

При обработке литиказой биологическая активность колебалась в интервале 89–171 АОК, при контрольном значении 65 ± 7 АОК. При обработке целлюлазой – 90–98 АОК и 83 ± 9 АОК в контроле. Эти данные подтверждают наличие в образце именно β -(1→4)-гликозидных связей, необходимых для реализации биологической активности. Остаточная биологическая активность может присутствовать в силу распознавания фрагментов гидролизатов иммунокомпетентными клетками мышей, которое приводит к активации спленоцитов.

3.2 Биологическая активность

3.2.1. Метод Ерне

После совместного введения мышам линии F₁(СВА×С₅₇В1/6) полисахарида НТЛР и ЭБ 2×10^6 была выявлена стимуляция выработки антител к ЭБ в клетках селезенок мышей. Результаты эксперимента представлены на Рисунках 25 и 26.

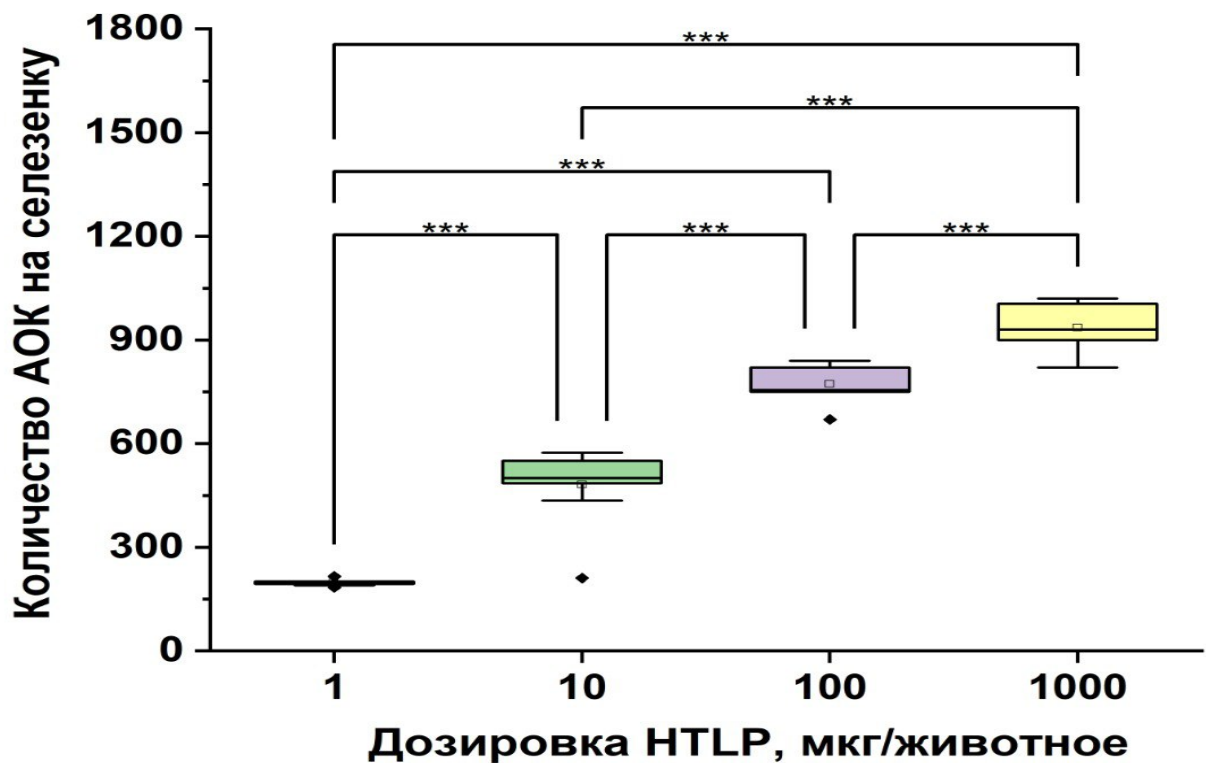


Рисунок 25. Влияние разных доз НТЛР на количество АОК в селезенке мышей, (***) $p < 0,001$).

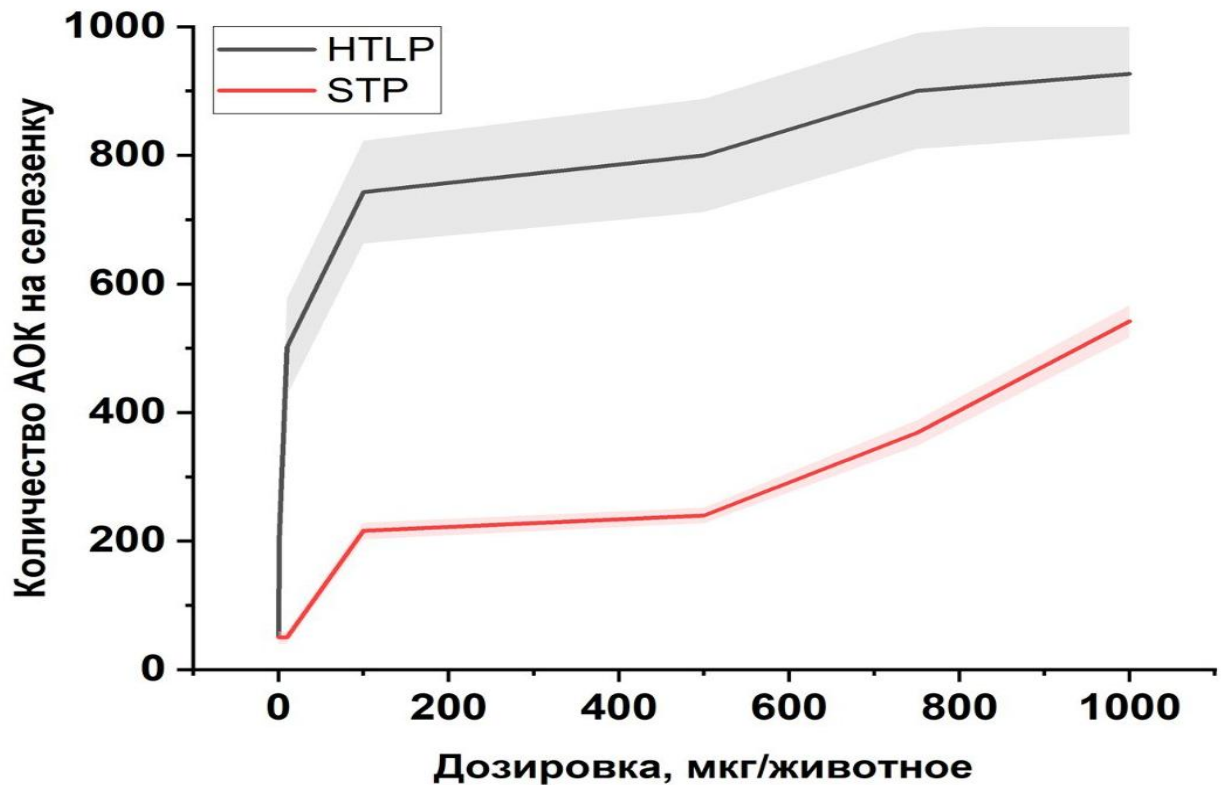


Рисунок 26. Сравнение влияния HTLP и STP на количество АОК в селезенке мышей. Полупрозрачной областью обозначен разброс значений. Контрольные значения представлены в точке 0.

HTLP и STP статистически значимо стимулируют и АОК, и клеточность селезенки. Как видно из рисунков, HTLP стимулировал колониюобразование сильнее, чем STP во всех дозировках. При этом, LPS стимулировал клеточность селезенки в 2,2 раза. Коэффициент стимуляции антителообразования в селезенке колебался для STP в интервале 2,1–5,3, а HTLP - 4,3–19,7. Таким образом, можно сделать вывод, что оба исследуемых вещества проявляют митогенную активность, которая может быть использована при их экстракции в качестве маркера.

В результате исследования иммуномодулирующих свойств полисахаридов HTLP и STP на мышях линии $F_1(\text{CBA} \times \text{C}_{57}\text{Bl}/6)$ было установлено их дозозависимое стимулирующее влияние на антителогенез. При совместном введении полисахарида HTLP с ЭБ в концентрации 2×10^6 клеток наблюдалось значимое увеличение количества АОК в селезенке экспериментальных животных. Как показано на Рисунке 26, увеличение дозировки HTLP от 1 до 1000 мкг/животное приводило к прогрессивному возрастанию количества АОК с высокой статистической значимостью различий между группами ($p < 0,001$).

Сравнительный анализ эффективности исследуемых полисахаридов (Рисунок 26) продемонстрировал, что НТЛР обладает более выраженным стимулирующим действием на образование АОК по сравнению с СТР во всем диапазоне исследованных доз. График показывает резкое увеличение активности НТЛР уже при низких дозах (до 200 мкг/животное) с последующим более плавным ростом эффекта, в то время как СТР демонстрирует более линейную зависимость доза-эффект с меньшей амплитудой ответа. При максимальной дозе 1000 мкг/животное количество АОК под действием НТЛР достигало примерно 900 клеток на селезенку, тогда как для СТР этот показатель составлял около 550 клеток.

При использовании LPS в качестве положительного контроля наблюдалось увеличение клеточности селезенки в 2,2 раза относительно контрольной группы. Количественная оценка стимулирующего эффекта показала, что коэффициент стимуляции антителообразования в селезенке для СТР варьировал в диапазоне от 2,1 до 5,3, в то время как для НТЛР этот показатель был значительно выше и составлял от 4,3 до 19,7, что наглядно отражено в различии наклона кривых на графике.

3.2.2. Противовоспалительная активность

СТР и НТЛР тестировали в противовоспалительных моделях каррагинанового и формалинового отеков лапы и карманной гранулемы крыс.

Для этого использовались белые инбредные крысы Wistar (ИБХ РАН, Пущино) массой 200–240 г обоего пола. Индекс ингибирования (угнетения) рассчитывали по формуле:

$$II = \frac{V_k - V_o}{V_k}, \quad (2)$$

где V_k – объем отека контрольной лапы, V_o – объем отека опытной лапы.

3.2.2.1. Противовоспалительная активность – каррагинановый отек

Животным вводили 0,1 мл 1% геля каррагинана субплантарно [Solanki H.K. et al., 2015]. Для оценки воспаления оценивали объем места введения (лапы) до и после введения с использованием цифрового плетизмометра. Другая лапа служила контролем. На точку использовали по 8 крыс. Растворы НТЛР и СТР вводили в межлопаточную область за 1 ч до введения геля каррагинана. Измерение интенсивности отека проводили через 4, 6 и 8 ч после индукции отека и подсчитывали индекс ингибирования.

Были сформированы следующие группы (по 8 животных в каждой): 1 – контрольная, животным вводили стерильный раствор 0,9% NaCl; 2 – экспериментальная, животным вводили стерильный раствор 0,9% NaCl с HTLP в дозировке 100 мкг/крысу; 3 – экспериментальная, животным вводили стерильный раствор 0,9% NaCl с STP в дозировке 500 мкг/крысу; 4 - контрольная, животным вводили глицирам в дозировке 50 мкг/крысу.

В ответ на введение геля каррагинана у крыс в лапе развивалось острое воспаление. Данные по влиянию тестируемых растворов STP и HTLP на каррагинановый отек представлены на Рисунке 27. Оба вещества продемонстрировали противовоспалительные свойства, которые оценивались по изменению показателей прироста объема стопы и расчётному коэффициенту ингибирования отека.

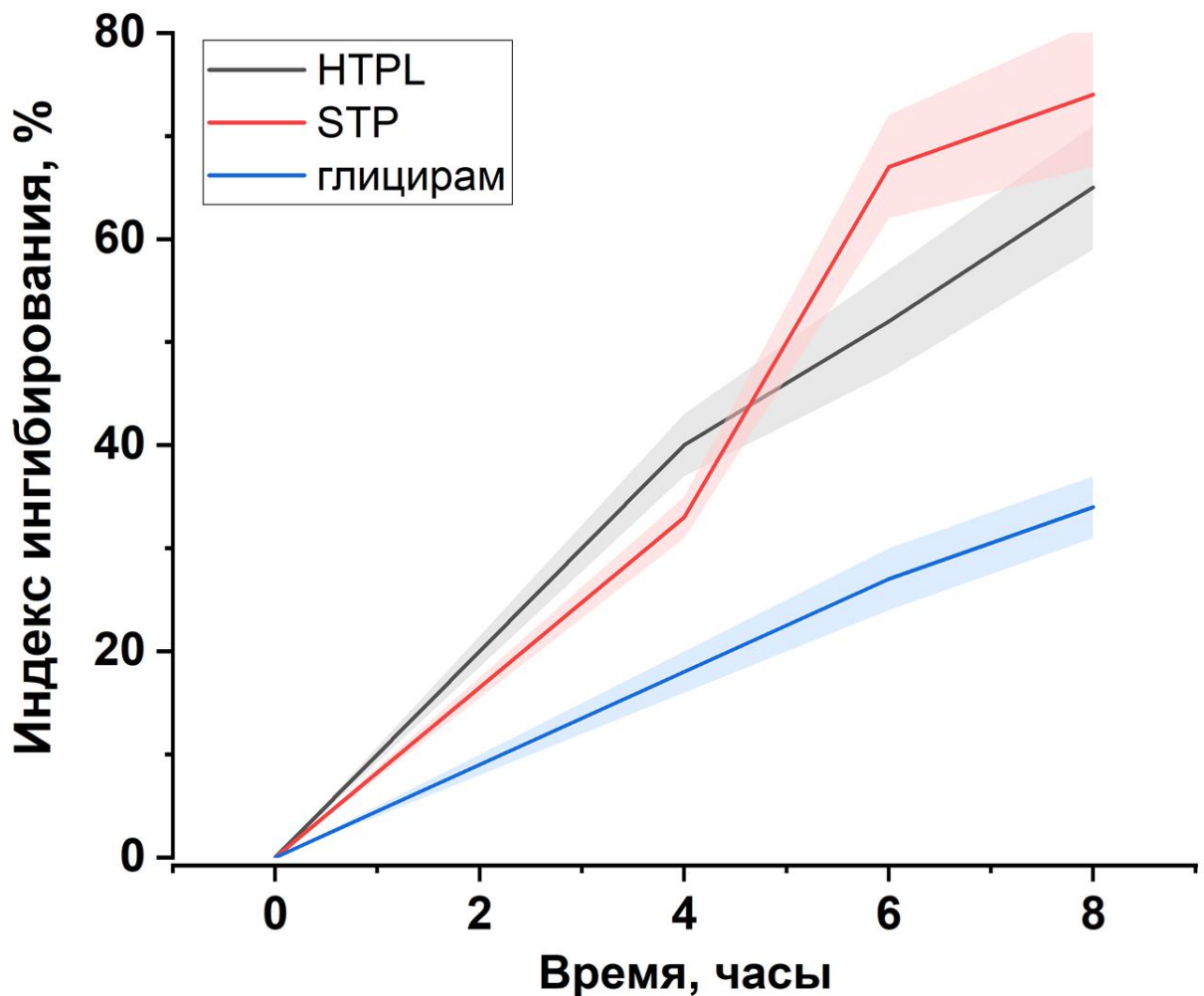


Рисунок 27. Индекс ингибирования каррагинан-индуцированного отека при введении глицирама, STP и HTLP крысам, ($p < 0,05$). Полупрозрачной областью обозначен разброс значений.

Как видно из приведенных выше данных и STP, и HTLP проявляли противовоспалительную активность в модели каррагинанового отека. При этом у HTLP активность была выше в 2,2 раза в сравнении с глицирамом через 4 часа после иммунизации, в 1,9 раза – через 6 часов и 1,9 раза – через 8 часов, а у STP в 1,8, 2,5, и 2,2 раза, соответственно).

Таким образом, оба исследуемых полисахарида демонстрируют дозозависимый противовоспалительный эффект, превосходящий действие глицирама на протяжении всего периода наблюдения. HTLP проявлял наиболее выраженное противовоспалительное действие в первые 4 часа после индукции воспаления, превышая эффективность глицирама в 2,2 раза ($p < 0,05$). В последующие временные точки (6 и 8 часов) его активность сохранялась на стабильно высоком уровне, превосходя контрольный препарат в 1,9 раза.

STP характеризовался несколько иной динамикой развития противовоспалительного эффекта. Через 4 часа после индукции воспаления его активность превышала действие глицирама в 1,8 раза, достигая максимума к 6 часу наблюдения (превышение в 2,5 раза, $p < 0,05$). К 8 часу эксперимента STP сохранял высокую противовоспалительную активность, превосходящую эффект глицирама в 2,2 раза.

Наблюдаемые различия в динамике развития противовоспалительного эффекта между HTLP и STP могут быть обусловлены особенностями их молекулярной структуры и механизмами взаимодействия с компонентами воспалительного каскада. При этом оба соединения продемонстрировали значительное преимущество по сравнению с референсным препаратом глицирам.

3.2.2.2. Противовоспалительная активность – формалиновый отек

Животным вводили 0,1 мл 2% водного раствора формалина субплантарно [Wheeler-Aceto H. and Cowan, A., 1991]. Для оценки воспаления оценивали объем отека в месте введения до и после введения с использованием цифрового плетизмометра. Другая лапа служила контролем. На точку использовали по 8 крыс. Были сформированы следующие группы: 1 – контрольная, животным вводили стерильный 0,9% раствор NaCl; 2 – экспериментальная, животным вводили стерильный 0,9% NaCl раствор HTLP в дозировке 100 мкг/крысу; 3 – экспериментальная, животным вводили стерильный 0,9% NaCl раствор STP в дозировке 500 мкг/крысу; 4 – контрольная, животным вводили глицирам в дозировке 50 мкг/крысу. Растворы HTLP и STP по 1 мл вводили в межлопаточную область за 1 час до введения формалина. Через 4, 6 и 8 часов после индукции отека проводили подсчет индекса ингибирования.

Введение формалина приводило к развитию острого отека в лапе крысы. Данные по влиянию на отек тестируемых растворов STP и HTLP представлены на Рисунке 28. Из двух веществ противовоспалительные свойства продемонстрировал только HTLP, что оценивалось по изменению показателей прироста объема стопы и расчётному коэффициенту ингибирования отека по формуле аналогичной (2).

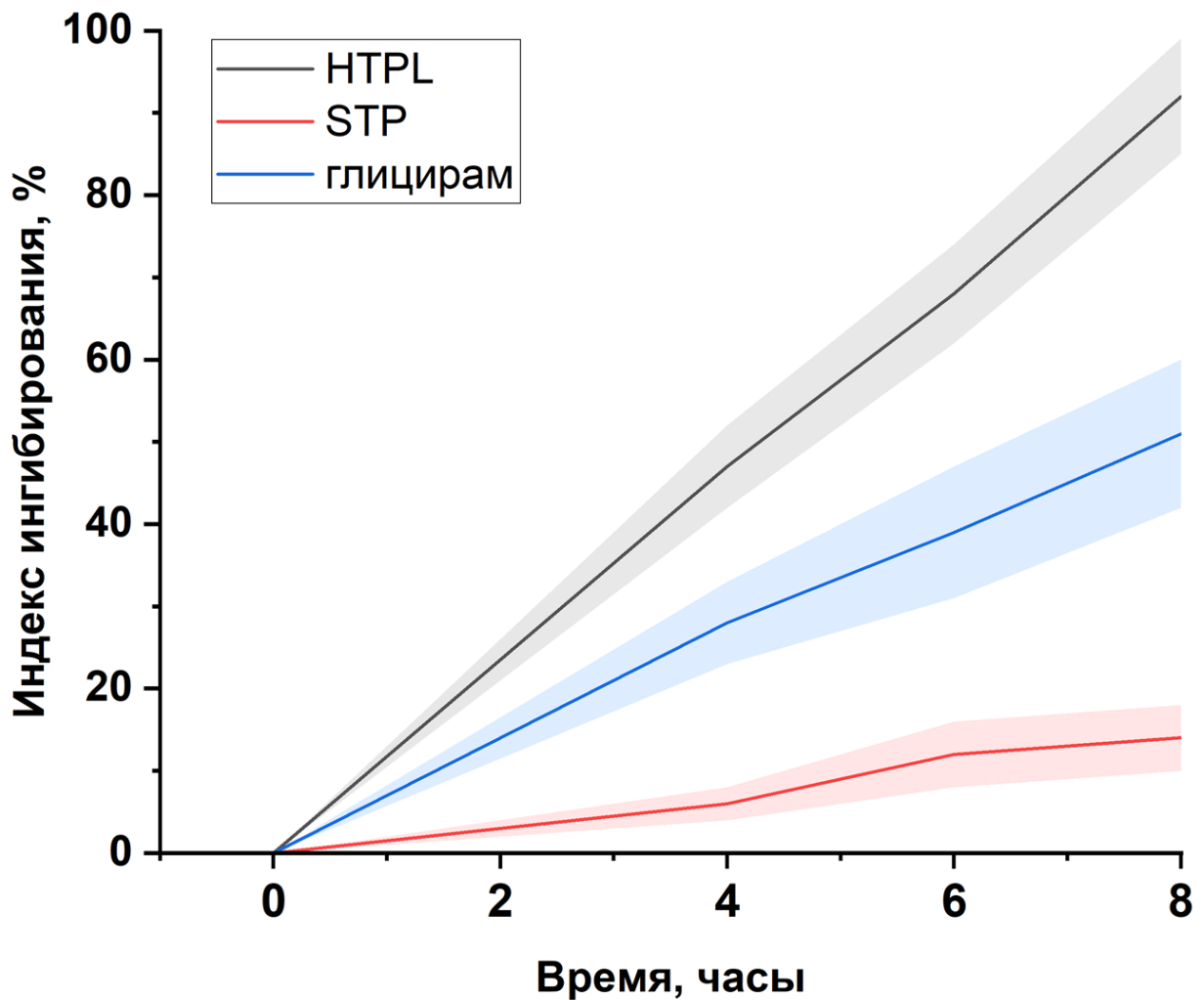


Рисунок 28. Индекс ингибирования формалинового отека при введении глицирама, STP и HTLP крысам. Полупрозрачной областью обозначен разброс значений.

В результате проведенного исследования были выявлены существенные различия в противовоспалительной активности изучаемых полисахаридов. HTLP продемонстрировал выраженное и прогрессирующее противовоспалительное действие, которое практически линейно нарастало на протяжении всего периода наблюдения. График индекса ингибирования отека показывает, что эффективность HTLP достоверно превосходила действие препарата сравнения глицирама в 1,68, 1,76 и 1,80 раза через 4, 6 и 8 ч

соответственно. К концу эксперимента (8 ч) индекс ингибирования для HTLP достигал 90%, в то время как для глицирама этот показатель составлял около 50%.

Характер противовоспалительного действия HTLP заслуживает особого внимания: отсутствие выхода кривой на плато к 8 часу наблюдения может указывать на потенциально более длительное действие препарата. Узкий доверительный интервал, отмеченный на графике серой областью, свидетельствует о высокой воспроизводимости противовоспалительного эффекта HTLP. Исходя из различных механизмов возникновения отека на введение каррагинана (высвобождение провоспалительных медиаторов – гистамина, серотонина, простагландинов, лейкотриенов и цитокинов, которые повышают проницаемость сосудов, экссудации плазмы в ткани и вызывают воспалительный ответ) и формалина (раздражает нервные окончания, вызывая немедленную ноцицептивную реакцию, которая проявляется в виде боли), можно сделать вывод, что STP не обладает аллергизирующими свойствами, а HTLP - обладает.

В противоположность этому, STP, несмотря на использование более высокой дозировки (500 мкг/крысу), продемонстрировал минимальную противовоспалительную активность. Индекс ингибирования для STP не превышал 15% на протяжении всего эксперимента, что существенно уступало как HTLP, так и препарату сравнения. После 6 часов наблюдения кривая индекса ингибирования для STP выходила на плато, указывая на отсутствие дальнейшего нарастания противовоспалительного эффекта.

Наблюдаемые различия в активности исследуемых полисахаридов в модели формалинового отека свидетельствуют о различных механизмах их противовоспалительного действия. HTLP, вероятно, обладает более широким спектром противовоспалительной активности, в то время как действие STP может быть более селективным и зависеть от типа индуктора воспалительной реакции.

3.2.2.3. Противовоспалительная активность – карманная гранулема

В рамках исследования противовоспалительной активности соединений была использована модель карманной гранулемы. Животным вводили 20 см³ воздуха в межлопаточную область с последующим введением в сформированный «карман» 0,5 мл 50% масляного раствора скипидара. Оценку степени воспаления проводили путем измерения объема места введения до и после манипуляции. Для каждой экспериментальной точки использовали группу из 8 крыс. Растворы HTLP и STP вводили подкожно за 1 час до введения геля каррагинана. Изменение отека проводили через 4, 6 и 8 ч после индукции отека. Проводили подсчет индекса ингибирования аналогично формуле (2).

Были сформированы следующие группы: 1 – контрольная, животным вводили стерильный 0,9% раствор NaCl; 2 – экспериментальная, животным вводили стерильный 0,9% NaCl раствор HTLP в дозировке 100 мкг/крысу; 3 – экспериментальная, животным вводили стерильный 0,9% NaCl раствор STP в дозировке 500 мкг/крысу; 4 – контрольная, животным вводили глицирам в дозировке 50 мкг/крысу.

В результате исследования противовоспалительной активности в модели карманной гранулемы было установлено, что и HTLP, и STP проявляют противовоспалительные свойства, при этом у STP более выраженные противовоспалительные свойства, чем у HTLP и глицирама, данные представлены на Рисунке 29.

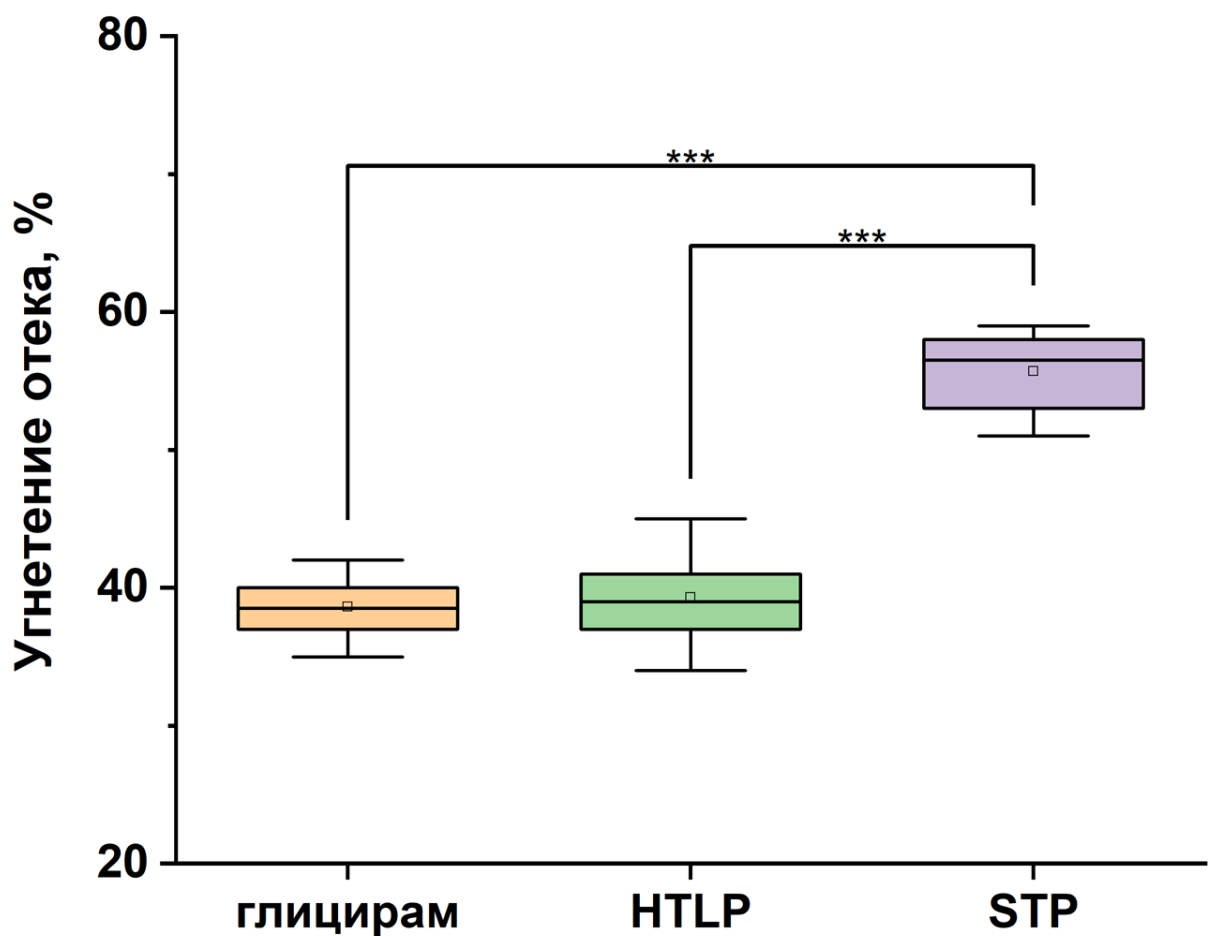


Рисунок 29. Угнетение отека в модели карманной гранулемы, (***) $p < 0.001$).

STP проявляет ярко выраженное антиэкссудативное действие, превосходящее и глицирам, и HTLP в 1,4 раза ($p < 0,001$). Действие HTLP в дозировке 100 мкг/мышь на воспаление при этом сравнимо с действием глицирама в дозировке в 50 мг/кг. Полученные

результаты продемонстрировали наличие противовоспалительной активности у обоих исследуемых соединений, однако их эффективность существенно различалась.

Комплексный анализ противовоспалительной активности выявил различия в механизмах действия исследуемых соединений. НТЛР продемонстрировал широкий спектр противовоспалительной активности, что подтверждается его эффективностью в различных экспериментальных моделях: формалиновый отек (характеризующий анальгетическую активность), каррагинановый отек и карманная гранулема. В свою очередь, STP показал более селективное действие на воспалительный процесс при отсутствии анальгезирующего эффекта, что подтверждается отсутствием значимого влияния на формалиновый отек. Примечательно, что противовоспалительный эффект STP развивался быстрее по сравнению с глицирамом и НТЛР, достигая значимых различий уже к 6 часу наблюдения.

На основании полученных данных можно заключить, что STP обладает специфической противовоспалительной активностью, в то время как НТЛР характеризуется менее избирательным воздействием на иммунологические каскады воспалительного процесса.

Результаты оценки противовоспалительной активности демонстрируют, что и STP, и НТЛР обладают противовоспалительной активностью. При этом НТЛР влияет на воспалительные процессы, вызванные разными механизмами, что проявляется в его активности в моделях: формалиновый отек (характерен для анальгетической активности), каррагинановый отек и карманная гранулема. Для STP характерно более избирательное действие на воспаление при отсутствии анальгезирующей активности, поскольку в модели формалинового отека введение практически не приводило к снижению объема отека.

3.2.3. Противовирусная активность

STP тестировали в противовирусной модели коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, вызывающей болезнь COVID-19 у людей [Генералов Е.А. и Генералова Л.В., 2020; Generalova L.V. et al., 2024]. Предварительно было показано, что ацидоз – патологическое состояние, при котором нарушается метаболизм углеводов, играет одну из решающих ролей в патогенезе COVID-19 [Nechipurenko, Y.D. et al., 2021]. В связи с этим и тем фактом, что полисахариды играют одну из ключевых ролей в регуляции иммунной системы была проведена оценка STP в качестве противовирусного препарата. Было проведено две независимые серии экспериментов. В первой серии экспериментов терапевтическую активность STP изучали путем оценки влияния лечения на титр вируса в легочной ткани.

Использовали самок золотистых сирийских хомячков весом 50–80 г (*Mesocricetus auratus*), полученных из Питомника лабораторных животных (ИБХ РАН, Пущино, Россия). Доступ к пище и воде был свободным, и было обеспечено обогащение среды.

Клетки Vero (American Type Culture Collection: CCL-81) использовались для культивирования и изучения противовирусной активности против вируса SARS-CoV-2. Клеточные линии выращивали при 37 °C, с 5% CO₂, в среде DMEM (Pan Eko, Москва, Россия) с добавлением 5% инаktivированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США), 4,5 г/л глюкозы (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США), 300 мкг/мл L-глутамина (Pan Eko, Москва, Россия) и 40 мкг/мл гентамицина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США).

Вирус SARS-CoV-2 (штамм «Дубровка», Ухань-подобный штамм, идентификационный номер в GenBank: MW161041.1) был выделен из аспирата носоглотки и мазка из горла пациентов с подтвержденным COVID-19, культивировался в клетках Vero CCL-81. Вирусные стоки (22,4 lgTCID₅₀/мл) были приготовлены после серийных пассажей в клетках Vero CCL-81 с использованием описанной «инфекционной среды». Для всех вирусов стоки хранились в виде аликвот при температуре –80 °C.

Вирус SARS-CoV-2 (штамм «LIA», GenBank: ON032858.1), выделенный от пациента 27 января 2022 года (классификация по Pango BA.1.15, филогенетически схож со штаммом Омикрон). В эксперименте использовалась доза 4,5 lgTCID₅₀/мл.

Животных инфицировали вирусом SARS-CoV-2 интраназально под эфирным наркозом в объеме 100 мкл в обе ноздри. В обоих экспериментах использовалась доза заражения 0,1 мл 3,5 lgTCID₅₀/мл. Эффективность препарата в модели заражения оценивали по титру вируса в легких животных на 5-й день эксперимента и снижению потери веса в группах леченых животных в сравнении с контрольной группой. Животным, включенным в группы сравнения, интраназально вводили фосфатно-солевой буфер (PBS) тем же способом и в том же объеме. Дополнительно в первом эксперименте эффективность оценивали по улучшению состояния легких в патоморфологических исследованиях, во втором эксперименте дополнительно проводили реакцию нейтрализации в конце эксперимента. Уменьшение или увеличение веса животных рассчитывалось отдельно для каждого хомяка и выражалось в процентах. При этом за 100% принимался вес животного до заражения. Для всех хомячков одной группы определяли средний процент потери или увеличения веса.

СТР вводили в составе стерильного раствора 0,9% NaCl. Были сформированы следующие группы (по 5 животных): 1 – вирусная контрольная группа получала 0,5 мл

физиологического раствора внутрибрюшинно через 1 ч после заражения и четыре дня ежедневно; 2 – опытная группа: вводили одну инъекцию внутрибрюшинно по 0,5 мл STP (250 мкг/кг) за 24 ч до заражения; 3 – опытная группа: вводили одну инъекцию внутрибрюшинно по 0,5 мл 500 мкг/кг STP за 24 ч до заражения; 4 – опытная группа: вводили одну инъекцию внутрибрюшинно по 0,5 мл 250 мкг/кг STP через 1 ч после заражения и четыре дня один раз в день через день; 5 – опытная группа: вводили одну инъекцию внутрибрюшинно по 0,5 мл 500 мкг/кг STP через 1 ч после заражения и четыре дня один раз в день через день; 6 группа – вводили препарат сравнения «Фавипиравир» перорально 1200 мг/кг за 1 ч до заражения, затем 500 мг/кг два раза в день в течение четырех дней.

Через пять дней животных гуманно умерщвляли после анестезии путем цервикальной дислокации, а легкие группировали для оценки титра вируса и гистологического исследования.

Во второй серии экспериментов оценивали эффективную дозу и режим лечения. Группы (по 8 животных) были сформированы следующим образом: 1 – вирусный контроль: вводили по 0,5 мл физиологического раствора внутрибрюшинно через 1 ч после заражения и четыре дня ежедневно; 2 – опытная группа: вводили одну инъекцию внутрибрюшинно по 0,5 мл 1000 мкг/кг STP за 24 ч до заражения; 3 – опытная группа: вводили одну инъекцию внутрибрюшинно по 0,5 мл 500 мкг/кг STP через 1 ч после заражения и четыре дня ежедневно; 4 – опытная группа: вводили одну инъекцию внутрибрюшинно по 0,5 мл 500 мкг/кг STP через 1 ч после заражения и четыре дня один раз через день; 5 – опытная группа: вводили одну инъекцию внутрибрюшинно по 0,5 мл 1000 мкг/кг STP через 1 ч после заражения и четыре дня один раз в день через день; 6 - неинфицированная контрольная группа: вводили одну инъекцию внутрибрюшинно по 0,5 мл физиологического раствора через 1 ч после заражения и четыре дня ежедневно.

Далее по пять животных из каждой группы использовали для реакции нейтрализации и три для оценки титра вируса в легких. Образцы крови для реакции нейтрализации были собраны на 21-й день после заражения. В это же время хомяков взвешивали и оценивали динамику массы животных. Анализ титра вируса, реакцию нейтрализации и гистологическое исследование проводили, как описано в статье [Gruber A.D. et al., 2020].

В первой серии экспериментов титр вируса в легких хомяков контрольной группы на 5-е сутки после заражения был высоким и составил $6,50 \pm 0,84 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$. Однократное профилактическое применение препарата животным, начатое за 24 ч до заражения в обеих дозах 250 и 500 мкг/кг, не снижало титр вируса в легких, он практически не отличался от

такового в группе вирусного контроля. Лечебное применение препарата, начатое через 1 ч после заражения и продолжавшееся в течение 4 суток в однократной дозе 250 мкг/кг, снижало титр вируса, однако это снижение было статистически недостоверным ($5,80 \pm 1,48 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$). В то же время повышенная доза препарата — 500 мкг/кг (группа 5) — привела к практически полному подавлению репликации вируса в легких (Рисунок 30).

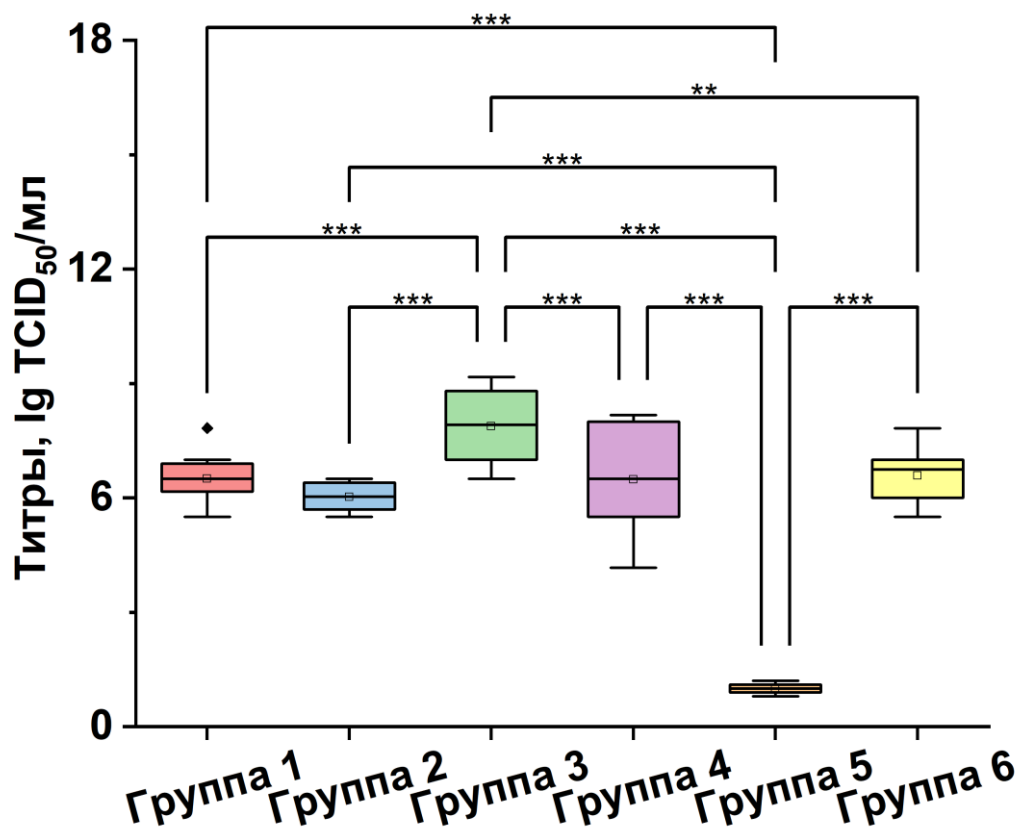


Рисунок 30. Титры вируса в легочной ткани через 5 дней после лечения у мышей, инфицированных вирусом, (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Титры вируса были значительно снижены в группах лечения STP по сравнению с вирусной контрольной группой, при этом наибольший эффект наблюдался при дозе 500 мкг/кг, вводимой через 1 ч после заражения и в течение 4 дней ($p < 0,05$, Краскел-Уоллис). Анализ был выполнен с использованием поправки Бонферрони для множественных сравнений.

Применение фавипиравира (группа 6) оказалось неэффективным и не повлияло на титр вируса в легких животных ($6,60 \pm 1,09 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$).

В течение эксперимента, вплоть до эвтаназии животных, в группах STP и вирусного контроля не наблюдалось потери веса. В то же время в группе животных, леченных фавипиравиром, наблюдалась потеря веса, достигавшая 5% на вторые сутки после заражения (Рисунок 31).

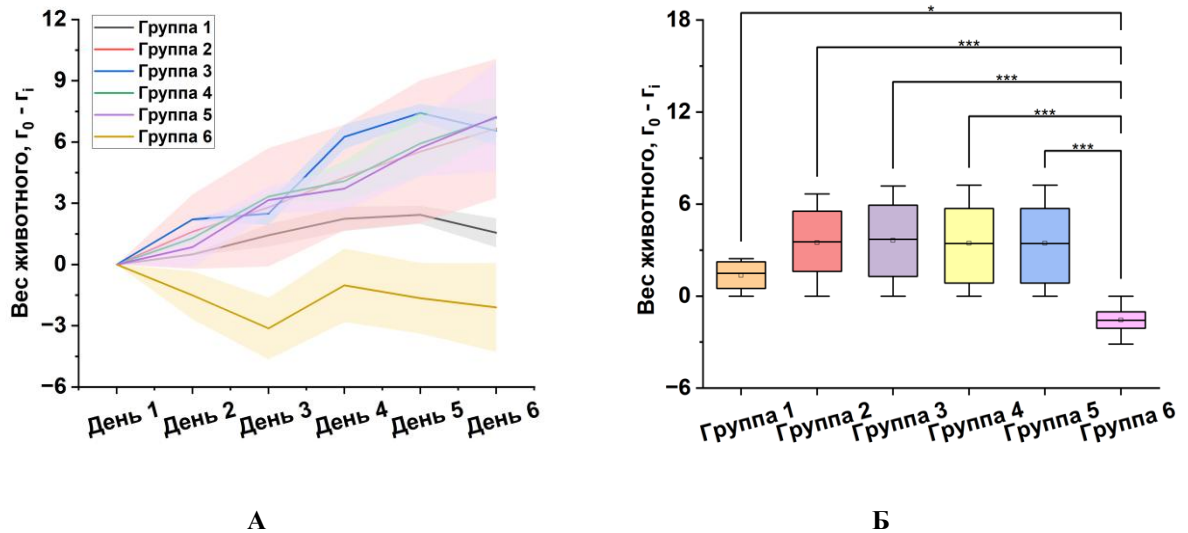


Рисунок 31. Изменения массы тела у мышей в 6 группах лечения через 6 дней после заражения. (А) Изменения массы тела сирийских хомячков, инфицированных SARS-CoV-2, в зависимости от схемы лечения в первой серии экспериментов. (Б) Ежедневные измерения массы тела животных нормализовали, при этом исходный вес (W_1) вычитали из веса, измеряемого ежедневно (W_n). Статистические сравнения между группами проводились с использованием непарного t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$, $n = 35$) с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Планки погрешностей обозначают 95% доверительные интервалы, рассчитанные с использованием t-распределения Стьюдента, указывающего вероятный диапазон истинного среднего изменения веса, (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

В обеих сериях экспериментов у всех животных группы 1 морфологическая картина воспалительных изменений в легких соответствовала крупозной вирусной пневмонии (Рисунок 32).

Гистологическое исследование легких золотистых хомячков из группы вирусного контроля (группа 1) показало, что на 4-е сутки после заражения у всех животных в воздухоносных путях и респираторном тракте развивались выраженные альтеративно-воспалительные изменения, морфологическая картина которых соответствовала интерстициальной бронхопневмонии. В долях правого легкого выявлялись обширные сливные безвоздушные очаги пневмонии (Рисунок 32А).

По сравнению с вирусной (группа 1) и контрольной группой «Фавипиравир» (группа 6) различные схемы введения STP в группах 2, 3, 4 и 5 привели к прогрессивному уменьшению площади и выраженности воспалительных изменений в дыхательных путях и респираторном отделе легких (Рисунок 32В–Е).

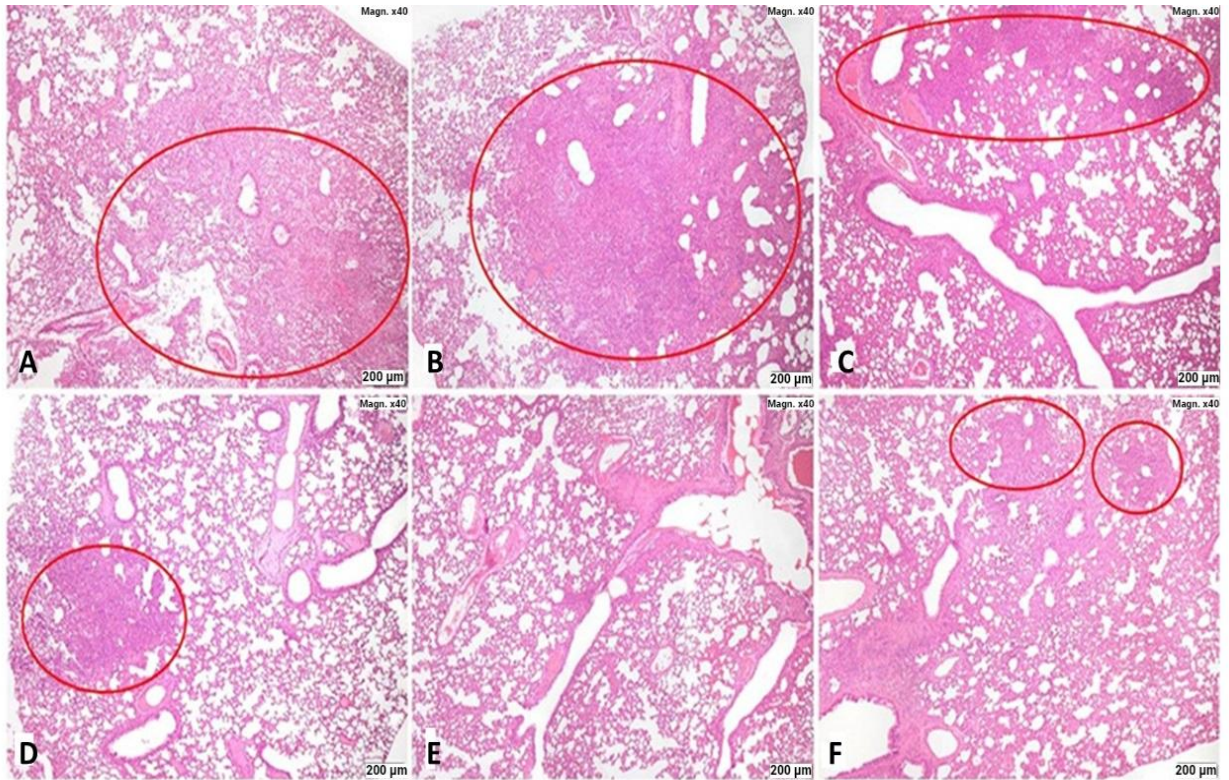


Рисунок 32. Гистопатология легких хомяков на 4-й день после заражения SARS-CoV-2. (А) — группа 1 (группа вирусного контроля), (В) — группа 2, (С) — группа 3, (D) — группа 4, (Е) — группа 5, (F) — группа 6 (контроль фавипиравиром). Очаги интерстициальной пневмонии в респираторной доле правого легкого (красные овалы). Увеличение $\times 40$. Окраска гематоксилином и эозином.

Результаты статистической обработки морфологического анализа интерстициальной пневмонии, ассоциированной с SARS-CoV-2, у золотистых хомяков представлены на Рисунке 33.

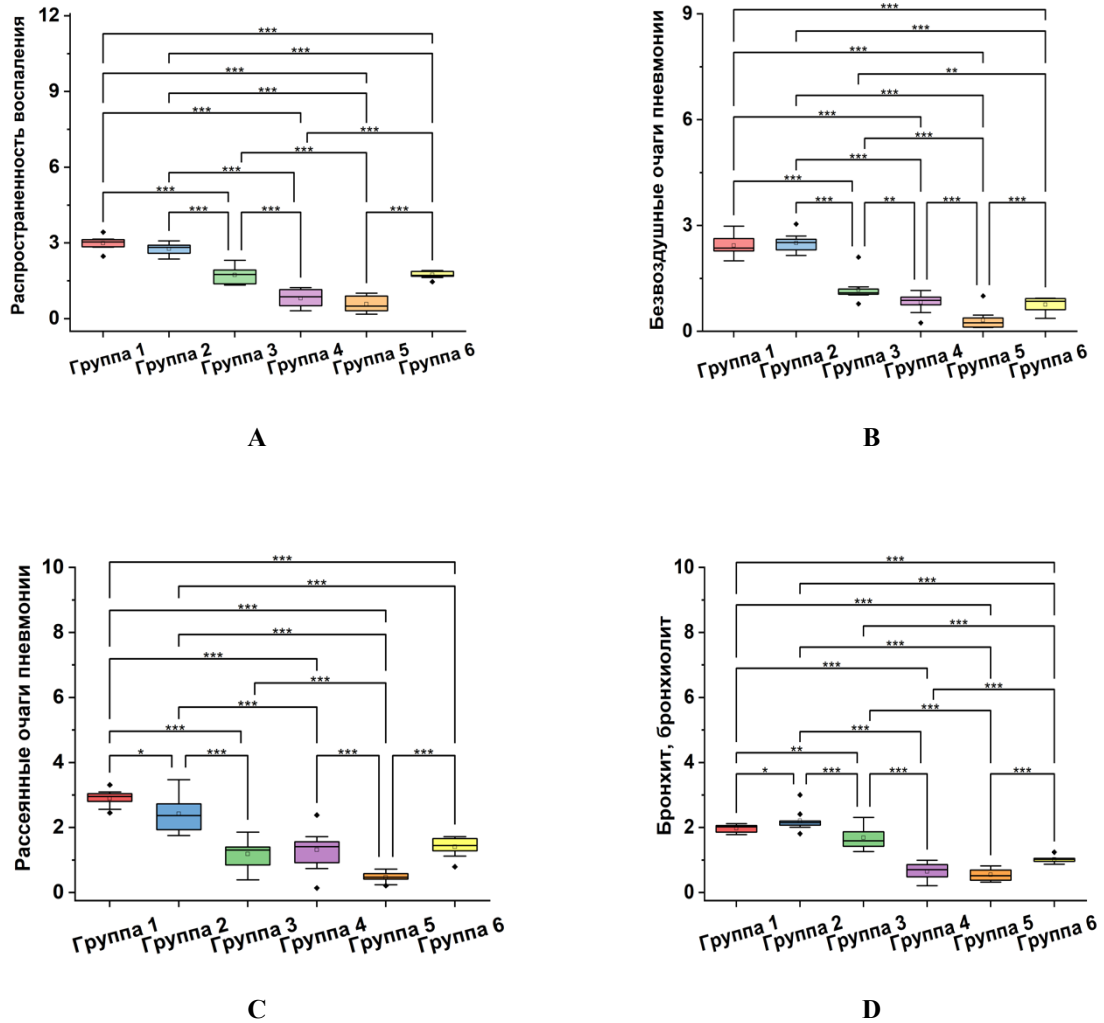


Рисунок 33. Статистический анализ данных патоморфологического исследования поражения паренхимы легких экспериментальных животных с SARS-CoV-2: **А)** Распространенность воспаления; **Б)** Безвоздушные очаги пневмонии; **В)** Рассеянные очаги пневмонии; **Г)** Бронхит. Группы (по 5 животных): 1 – контрольная группа получала физиологический раствор в/б через 1 ч после заражения и четыре дня ежедневно; 2 – одну инъекцию в/б 250 мкг/кг STP за 24 ч до заражения; 3 – одну инъекцию в/б 500 мкг/кг STP за 24 ч до заражения; 4 – одну инъекцию в/б 250 мкг/кг STP через 1 ч после заражения и четыре дня один раз в день через день; 5 – одну инъекцию в/б 500 мкг/кг STP через 1 ч после заражения и четыре дня один раз в день через день; 6 группа – Фавипиравир перорально 1200 мг/кг за 1 ч до заражения, затем 500 мг/кг два раза в день в течение четырех дней. Статистические сравнения между группами проводились с использованием непарного t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$, $n = 30$). * $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

В группах 2–4 морфологическая картина соответствовала вирусной пневмонии. Характер воспалительных изменений в легких животных не отличался от такового у

животных вирусного контроля. В группе 3 у 4 животных из 5 отмечены мелкие рассеянные безвоздушные очаги и прилегающие к ним участки со сниженной воздушностью, площадь которых в сумме составила от 1–5% до 20% (до 10 раз меньше, чем в контрольной группе); в легких хомячка № 2 воспалительных изменений не выявлено. В группе 4 площадь легочной паренхимы с воспалительными изменениями у этих животных была небольшой, не более 25% от общей площади среза (<1% легкого). У животных № 1 и 4 гистоструктура легких была нормальной. В группе 5 только у 2 из 5 животных имелись признаки вирусной пневмонии. У № 3, 4 и 5 отклонений от нормы не выявлено. В группе 6 с лечением фавипиравиром, морфологическая картина которой у животных № 2 и 3 соответствовала очаговой вирусной пневмонии в сочетании с аспирационной бронхопневмонией, очаги которой были множественными и часто граничили с очагами вирусной пневмонии. У хомяков № 1, 4 и 5 отмечались очаги альвеолита (1 и 4), а также мелкие сливные очаги вирусной пневмонии, расположенные во всех долях легкого. Следует подчеркнуть, что в гистологическом препарате легкого хомяка № 5 в просвете ветвей легочной артерии, сопровождающих долевого бронх и бронхи 2–3-й генерации, были выявлены обструктивно-организующиеся тромбы. При морфологическом исследовании легких сирийских хомяков, умерщвленных на 5-й день после заражения, были определены альтеративно-воспалительные изменения, соответствующие вирусной пневмонии, тяжесть которой прогрессивно уменьшалась в группах 3, 4 и 5 по сравнению с вирусной контрольной группой (группа 1) и контролем Фавипиравира (группа 6).

Титр вируса в легких хомяков во втором эксперименте определяли также на 5-й день после вирусной инфекции. В контрольной группе нелеченых животных (группа 1) титр вируса составил $7,70 \pm 0,50 \text{ lgTCID}_{50}/\text{мл}$. По сравнению с первым экспериментом в профилактическом режиме дозу препарата увеличили до 1000 мкг/кг массы тела (группа 2); это привело к снижению титра вируса в легких животных, ниже, чем в группе вирусного контроля ($5,83 \pm 0,88 \text{ lgTCID}_{50}/\text{мл}$). В группах 4 и 5 отмечено снижение титра вируса более чем на 2 $\text{lgTCID}_{50}/\text{мл}$ ($5,50 \pm 1,24 \text{ lgTCID}_{50}/\text{мл}$ — группа 4 и $5,00 \pm 0,69 \text{ lgTCID}_{50}/\text{мл}$ — группа 5).

Во второй серии экспериментов потеря веса в группе вирусного контроля (группа 1) была наибольшей на 7-е сутки после заражения, достигая до 5%. С 5-х суток животные начинали устойчиво набирать вес. Потеря веса в первые сутки и прибавка веса в последующие сутки у хомяков, леченных препаратом по профилактической схеме (группа 2) и схеме лечения при введении через день в дозе 500 мкг/мл (группа 4), была аналогична таковой в группе вирусного контроля. В то же время в группе 3, в которой

подавление вируса в легких было наиболее выраженным, потеря веса у животных не выявлена. Данные были получены для групп 4 и 5 (Рисунок 34).

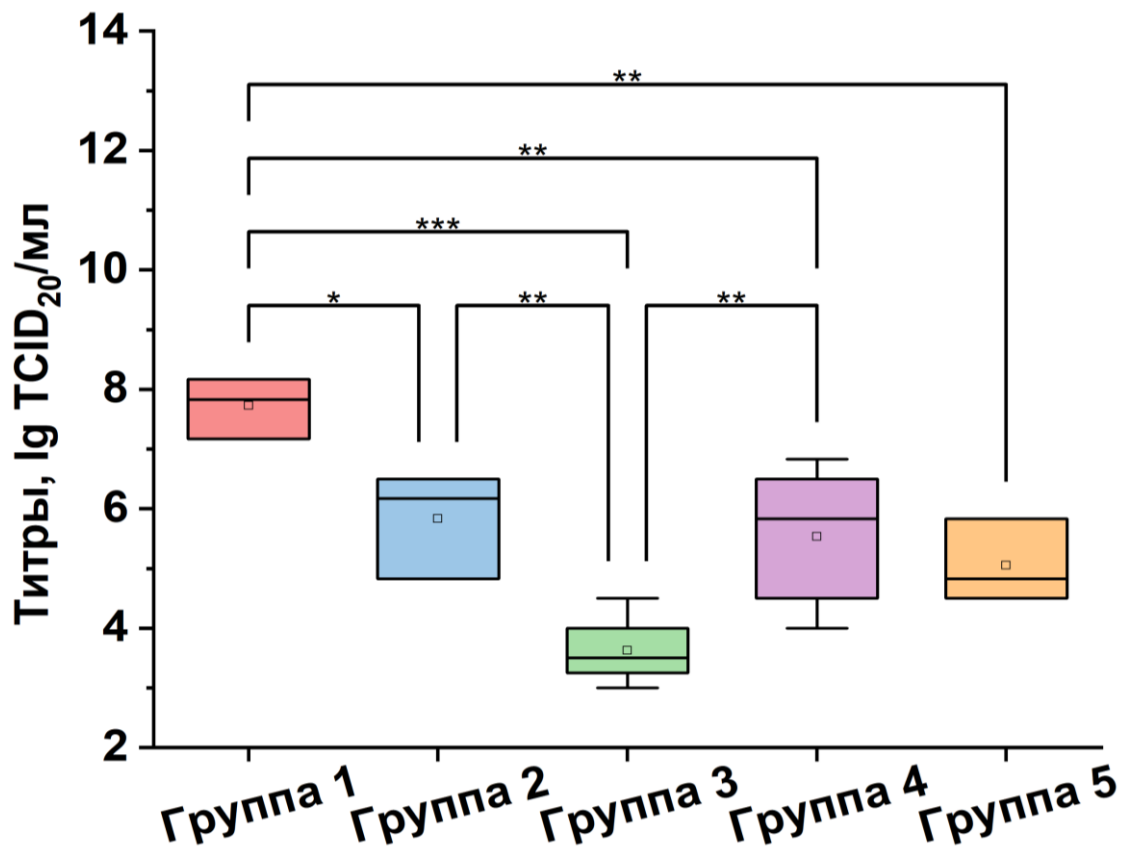


Рисунок 34. Титры вируса в легочной ткани через 5 дней после лечения у мышей, инфицированных вирусом SARS-CoV-2. Было включено пять групп. Группа 1 — вирусный контроль — мыши получали внутрибрюшинную инъекцию физиологического раствора через 1 час после заражения и ежедневно в течение 4 дней. Группа 2 — мыши получали одну внутрибрюшинную инъекцию 1000 мкг/кг STP за 24 часа до заражения. Группа 3 — мыши получали одну внутрибрюшинную инъекцию 500 мкг/кг STP через 1 час после заражения и ежедневно в течение 4 дней. Группа 4 - мыши получали одну внутрибрюшинную инъекцию 500 мкг/кг STP через 1 час после заражения и один раз через день в течение 4 дней. Группа 5 — мыши получали одну внутрибрюшинную инъекцию 1000 мкг/кг STP через 1 час после заражения и один раз через день в течение 4 дней. Титры вируса были значительно снижены в группах лечения STP по сравнению с вирусным контролем. Наибольшее снижение наблюдалось в группе 5, получавшей 1000 мкг/кг STP через 1 ч после заражения и через день ($p < 0,05$, тест Краскела–Уоллиса, $n = 35$), ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$).

Лечение в дозе 500 мкг/кг (группа 3) значительно подавило размножение вируса в легких животных (3,20 lgTCID₅₀/мл) и защитило их от потери веса (Рисунок 35).

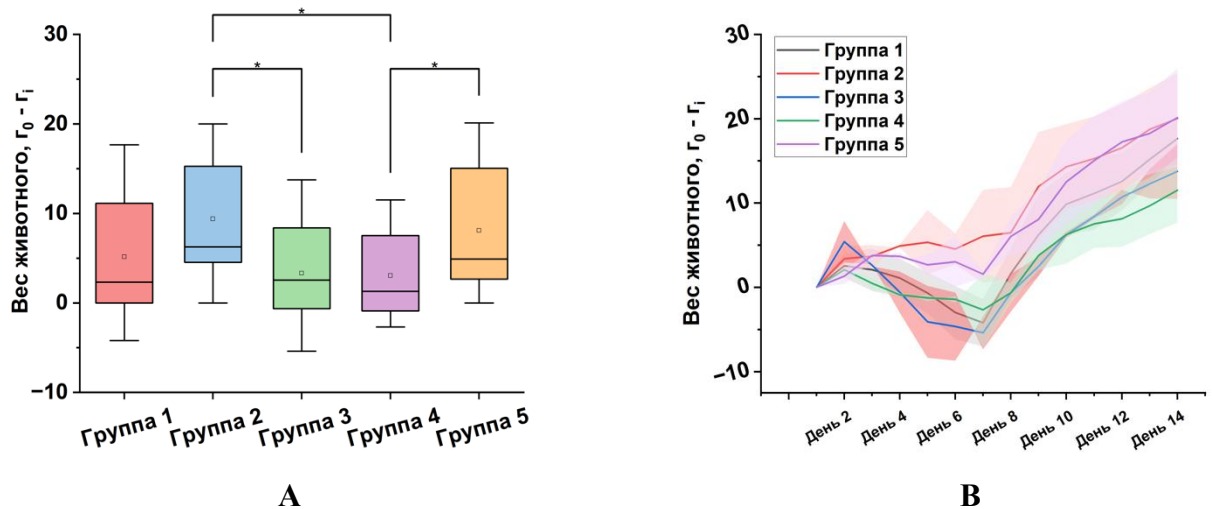


Рисунок 35. Динамика массы тела животных. (А) Изменения массы тела сирийских хомячков, инфицированных SARS-CoV-2, в зависимости от схемы лечения во второй серии экспериментов. Вес животного до заражения принимали за 100%. (В) Ежедневные измерения массы животного нормализовали, при этом исходный вес (W_0) вычитали из веса, измеряемого ежедневно (W_n). Статистические сравнения между группами проводились с использованием непарного t-критерия Стьюдента (* $p < 0,05$, $n = 35$) с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Планки погрешностей обозначают 95% доверительные интервалы, рассчитанные с использованием t-распределения Стьюдента, указывающего вероятный диапазон истинного среднего изменения веса.

Исследования выявили наличие антител в значительном титре (выше 1:10) к обоим штаммам вируса у всех инфицированных животных. Не было получено данных о том, что титр антител у леченных животных был ниже титра антител у нелеченых животных, что свидетельствует о том, что STP не подавляет образование антител. При этом важно отметить, что во всех леченных группах титр антител к штамму «Дубровка» (Ухань-подобного), которым были инфицированы животные, был выше, чем в группе вирусного контроля. Результаты показывают, что STP обладает иммуноадьювантными свойствами, что подтверждает данные метода Ерне. При этом самые высокие титры вируснейтрализующих антител образовались у животных в группе 3 (до 5 раз по сравнению с контролем), лечение в которой, по результатам двух экспериментов, было наиболее эффективным, значительно подавив репликацию вируса в легких и полностью предотвратив потерю веса. В группе 6 (неинфицированные животные) антител не обнаружено. Результаты представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Влияние медикаментозного лечения на экспрессию вируснейтрализующих антител у сирийских хомяков, инфицированных SARS-CoV-2.

		Титр в реакции нейтрализации SARS-CoV-2	
		Штамм «Дубровка»	Штамм «Омикрон»
Группа 1 вирусный контроль 0,5 мл физиологического раствора вводят внутривенно через 1 ч после заражения и четыре дня ежедневно	A	1:80	1:160
	B	1:40	1:320
	C	1:40	1:160
	Среднее	1:53	1:213
Группа 2 1000 мкг/кг STP за 24 ч до заражения	A	1:160	1:320
	B	1:80	1:160
	C	1:80	1:160
	Среднее	1:106	1:213
Группа 3 500 мкг/кг STP через 1 ч после заражения и четыре дня ежедневно	A	1:320	1:640
	B	1:320	1:320
	C	1:160	1:320
	Среднее	1:267	1:426
Группа 4 500 мкг/кг STP через 1 ч после заражения и четыре дня один раз через день	A	1:80	1:160
	B	1:80	1:320
	C	1:80	1:160
	Среднее	1:80	1:213
Группа 5 1000 мкг/кг STP через 1 ч после заражения и четыре дня один раз через день	A	1:160	1:320
	B	1:80	1:160
	C	1:160	1:320
	Среднее	1:133	1:266
Группа 6 0,5 мл физиологического раствора вводят внутривенно через 1 ч после заражения и далее ежедневно в течение четырех дней	A	<1:10	<1:10
	B	<1:10	<1:10
	C	<1:10	<1:10
	Среднее	<1:10	<1:10

По данным второго эксперимента лечение препаратом внутрибрюшинно в дозах 500 и 1000 мкг/кг (введение через час, далее 1 раз в сутки через день, всего 3 введения) было эффективным, достоверно подавляло репликацию вируса в легких и в дозе 1000 мкг/кг предотвращало потерю веса у животных.

Однократное профилактическое применение препарата в дозах 500 и 1000 мкг/кг на модели сирийских хомячков, инфицированных SARS-CoV-2, было неэффективным, титр вируса в легких животных был практически таким же, как в группе вирусного контроля.

Применение STP во всех дозировках и схемах, включая профилактическую, приводило к уменьшению площади поражения легочной ткани по сравнению с контролем, вплоть до нормального состояния легочной ткани. Во всех случаях применение препарата не оказало подавляющего действия на образование вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2. Напротив, во всех случаях лечение стимулировало образование антител, что, дает возможность предположить наличие адъювантных свойств препарата.

В группах, леченных STP, как гистологические, так и данные титра вируса подтверждают угнетение репликации вируса в легочной ткани. По результатам обоих экспериментов (использовались штаммы «Дубровка» и Омикрон) наиболее эффективным оказалось лечение с применением препарата внутрибрюшинно в дозе 500 мкг/кг (введение через час после заражения, далее один раз в день в течение 4 дней), что значительно подавляло репликацию вируса в легких, предотвращало потерю веса у животных и, по данным гистологических исследований, значительно улучшало состояние легких.

При ежедневном клиническом осмотре животных аллергических и патологических реакций на введение STP не выявлено. Гиперемии, отека кожи и подкожной клетчатки не наблюдалось, шерсть оставалась гладкой, блестящей, целостность ее не нарушалась. Усиления болезненности при введении препарата также не выявлено.

Полученные данные свидетельствуют о том, что STP потенциально обладает противовирусными свойствами, а его репаративные свойства могут быть полезны при поражении легочной ткани. При этом выявлена способность этого полисахарида увеличивать количество вируснейтрализующих антител. Наиболее высокие титры вируснейтрализующих антител были выявлены у животных 3-й группы; лечение оказалось наиболее эффективным, значительно подавив репликацию вируса в легких и полностью предотвратив потерю веса.

STP не обладает прямой противовирусной активностью в отношении SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero. Таким образом, при коронавирусной инфекции STP способен на нескольких стадиях патологического процесса стимулировать регенерацию легочной паренхимы и активировать противовирусный иммунный ответ. Установлено, что STP

значительно подавлял репликацию вируса в легких, предотвращал потерю веса у животных и значительно улучшал состояние паренхимы легких.

3.2.4. Противоязвенная активность

3.2.4.1. Противоязвенная активность в модели Окабэ

Для изучения регенераторно-репараторной активности STP была выбрана классическая модель Окабэ «хронической» «ацетатной» язвенной болезни [Okabe S. and Amagase K., 2005; Генералова Л.В. и др., 2024]. Индукцию язвенного дефекта проводили у крыс линии Wistar обоего пола (ИБХ РАН, Пушкино), массой 190–210 г, по 10 животных в каждой группе.

Были сформированы следующие группы: 1 – экспериментальная, внутривенное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с STP на 1, 4 и 7 сутки в дозе 0,1 мг/200 г; 2 – экспериментальная, внутривенное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с STP на 1, 4 и 7 сутки в дозе 0,5 мг/200 г; 3 – экспериментальная, внутривенное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с STP на 1, 4 и 7 сутки в дозе 1,0 мг/200 г; 4 – контрольная, введение Омепразола 60 мкг/200 г в соответствии с инструкцией; 5 – контрольная, введение Ранитидина 200 мкг/200 г в соответствии с инструкцией; 6 – контрольная, животным внутривенно вводили стерильный физиологический раствор на 1, 4 и 7 день в том же объеме, что и STP.

Влияние STP на динамику концентрации цитокинов IL-1 β , IL-4 и IFN- γ (LS-F5627, LsBio, США; ER0041, FineTest, Китай; ab239425, Abcam, Великобритания) проводили на 4 и 10 день методом ИФА. Для этого использовали кровь из хвостовой вены у животных с «хронической» язвой и анализировали по стандартному протоколу.

За 18 часов до хирургического вмешательства экспериментальным животным ограничивали доступ к пище при сохранении свободного доступа к воде. Постоперационный период характеризовался возвращением к стандартному режиму кормления. Наблюдение за животными с индуцированной «хронической» язвой продолжалось на протяжении 9 суток, после чего на 10-е сутки осуществлялась гуманная эвтаназия посредством дислокации шейных позвонков.

Исследование включало первичную макроскопическую оценку состояния слизистой оболочки с использованием оптического увеличения. Количественная оценка язвенного индекса производилась посредством специализированного программного обеспечения

ImageJ (Bethesda, MD, USA) с последующим выражением результатов через суммарную площадь язвенных поражений.

По завершении макроскопического анализа слизистой желудка проводилось микроскопическое исследование. Фрагменты ventральной стенки желудка фиксировались в 10% формалине, приготовленном по методу Лилли (pH 7,2–7,4). После стандартной гистологической обработки изготавливались срезы с последующим окрашиванием гематоксилин-эозином по методике Ван Гизона и альциановым синим для световой микроскопии.

Одной из задач исследования являлась оценка дозозависимого эффекта STP на язвенный индекс у крыс линии Wistar в экспериментальной модели хронической язвы. Принимая во внимание фазность развития язвенного дефекта с контрольными точками на 1, 4, 7 и 10-е сутки после индукции, а также предварительно полученные данные о противовоспалительном действии гликопротеина, была разработана схема введения STP, коррелирующая с критическими точками развития патологического процесса. Введение препарата осуществлялось в дозировках 0,1, 0,5 и 1,0 мг/кг массы тела в указанные временные интервалы после индукции язвы. Данная методология позволила провести комплексную оценку как дозозависимого эффекта STP, так и его воздействия на различные стадии патологического процесса (Рисунки 36 и 37). Введение препарата в периоды прогнозируемых обострений предоставило возможность оценить его профилактический и терапевтический потенциал в отношении структурных изменений слизистой оболочки, что имеет существенное значение для перспективного клинического применения STP, в качестве регенераторно-репараторного средства при язвенной болезни.

Статистический анализ проводился с использованием непараметрического теста Краскела-Уоллиса с последующей поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Значительное снижение индекса язвы наблюдалось в группах, получавших полисахарид, особенно максимальные дозы, и стандартные противоязвенные препараты (Омепразол и Ранитидин) по сравнению с контрольной группой (физиологический раствор).

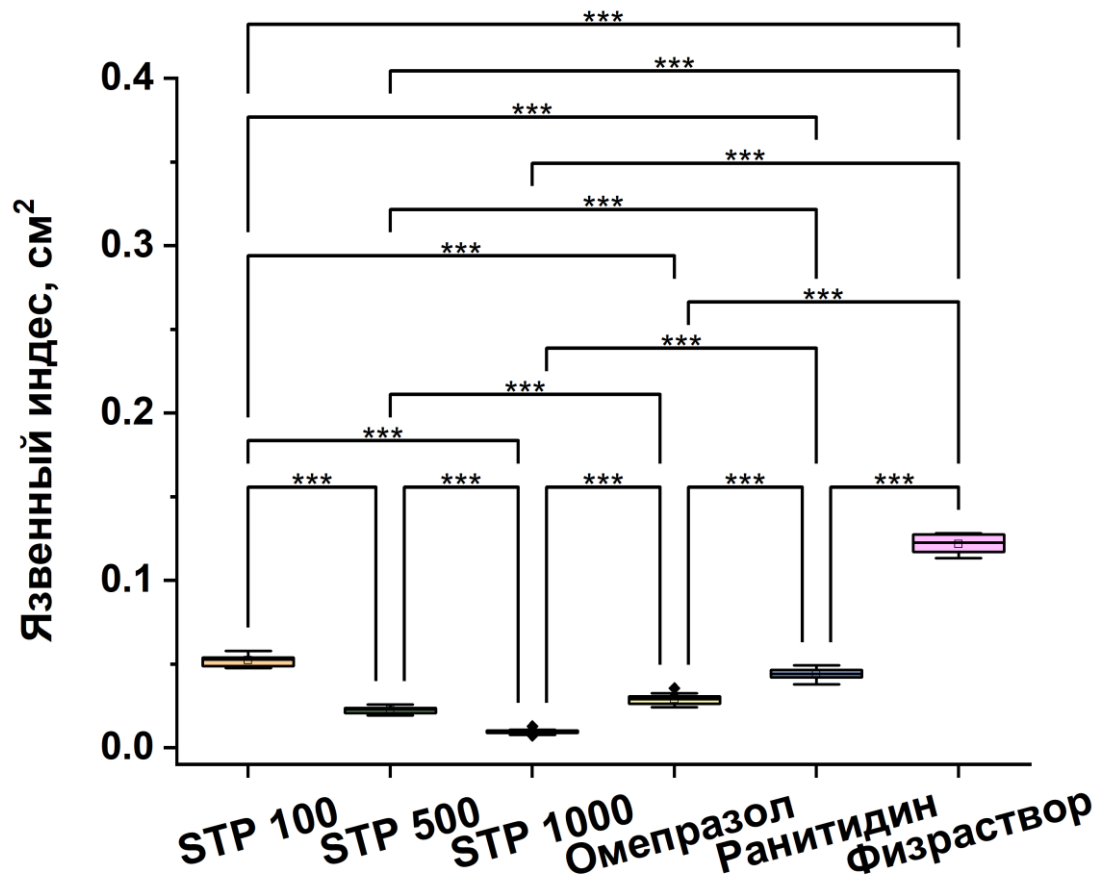


Рисунок 36. Влияние различных доз STP (0,1, 0,5 и 1,0 мг/кг), Омепразола, Ранитидина и физиологического раствора (физиологический раствор) на индекс язвы у экспериментальных животных. Данные представлены в виде диаграмм с ящичками, где центральная линия указывает на медиану, а верхняя и нижняя границы указывают на 25-й и 75-й процентиля. Статистически значимые различия обозначены звездочками, (***) $p < 0,001$) [Generalov E. et al., 2025c].

Как показано на Рисунке 36, введение полисахарида STP в дозах 0,1, 0,5 и 1,0 мг/кг привело к статистически значимому снижению язвенного индекса по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о его выраженной противоязвенной эффективности. Кроме того, было обнаружено, что эффективность STP в дозе 0,1 мг/кг сопоставима с эффективностью обычных противоязвенных препаратов, а именно Омепразола и Ранитидина, при этом в более высоких дозировках превосходит их. Примечательно, что наблюдался дозозависимый ответ; в частности, при увеличении дозы STP с 0,1 до 1,0 мг/кг язвенный индекс неуклонно снижался. Самый низкий язвенный индекс был зарегистрирован в группе 1 (0,02 см²), следом – в группе 2 (0,03 см²) и группе 3 (0,05 см²). Все эти показатели значительно ниже, чем в контрольной группе.

Была построена кривая зависимости доза-эффект для оценки терапевтической эффективности препарата при различных дозировках.

На Рисунке 37 показана отчетливая положительная корреляция между дозировкой STP и процентом животных, у которых наблюдается выздоровление. По мере увеличения доз STP от нуля (инъекция солевого раствора) до 1,0 мг/200 г наблюдалось заметное и последовательное увеличение доли животных, у которых наблюдалась полная эпителизация язвенного поражения. Эта зависимость хорошо характеризуется линейной тенденцией, подтверждаемой высоким коэффициентом детерминации $R^2 = 0,97$. Статистическая значимость этой корреляции дополнительно подтверждается чрезвычайно низким значением p ($p < 0,001$), что подчеркивает достоверность наблюдаемых результатов.

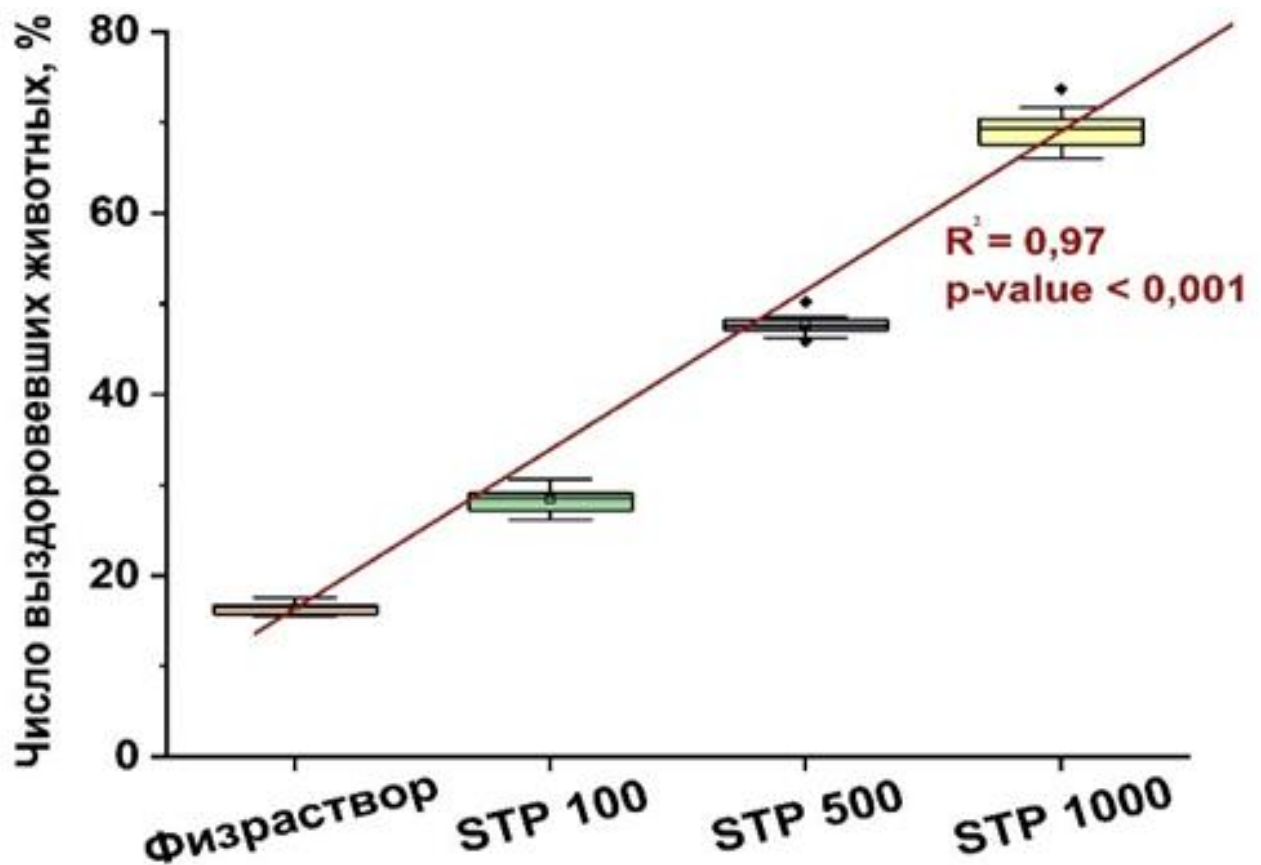


Рисунок 37. Анализ «доза-реакция» для STP. На графике приведен процент выздоровевших животных в зависимости от дозы препарата. Красная линия представляет собой линейный тренд. Прямоугольники показывают распределение данных для каждой дозы, где горизонтальная линия внутри прямоугольника является медианой, границы прямоугольника являются первым и третьим квартилями, а вертикальные линии являются минимальным и максимальным значениями [Generalov E. et al., 2025c].

Рисунок 38 иллюстрирует динамику изменения уровней ключевых цитокинов в сыворотке крови экспериментальных животных после введения STP в дозе 0,5 мг/200 г по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор. На Рисунке 38А показаны уровни цитокинов на четвертые сутки эксперимента, на Рисунке 38В — на десятые сутки.

При введении STP в обе временные точки наблюдается выраженное и статистически значимое ($p < 0,001$) изменение концентраций как про-, так и противовоспалительных цитокинов. На четвертые сутки (рис. 3А) в группе STP по сравнению с контрольной группой отмечено достоверное снижение уровней провоспалительных цитокинов IL-1b и IFN-g, тогда как уровень противовоспалительного цитокина IL-4 достоверно возрос.

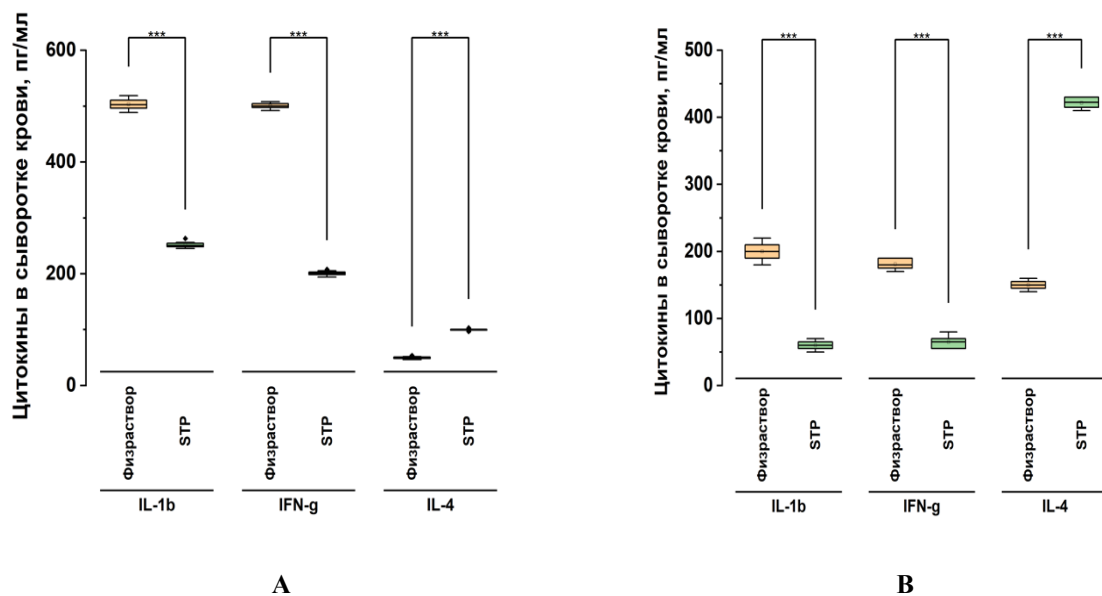


Рисунок 38. Влияние STP на уровень цитокинов в сыворотке крови у подопытных животных. (А) – уровень цитокинов на 4-й день и (В) – уровень цитокинов на 10-й день эксперимента. Показаны концентрации IL-1b, IFN- γ и IL-4 (пг/мл) в основных группах, получавших физиологический раствор и STP. Диаграммы ящиков показывают распределение данных: горизонтальная линия внутри – медиана, границы прямоугольника – первый и третий квартили, а вертикальные линии – минимальное и максимальное значения. Анализ проводился с использованием непараметрического теста Краскела-Уоллиса. Статистическая значимость различий между группами $*p < 0,001$ для всех сравнений [Generalov E. et al., 2025c].

Подобная тенденция сохранялась и на десятые сутки эксперимента (Рисунок 38В), что свидетельствует о стойком противовоспалительном эффекте STP. Полученные

результаты свидетельствуют о способности STP модулировать иммунный ответ, снижая выраженность воспалительной реакции и стимулируя противовоспалительные механизмы в течение длительного периода времени.

При осмотре поверхности слизистой оболочки желудка *ad oculus* участки некроза слизистой не были обнаружены ни у одного животного в опытной группе STP. Гистологический анализ образцов стенки желудка подтвердил (Рисунок 39), что в группах животных, получавших STP (особенно в группах 1 и 2), участков изъязвления слизистой оболочки желудка не было. В тех местах, где удавалось визуализировать дно язвенного дефекта, некротических масс не было. Формирующиеся грануляции содержат большее количество новообразованных сосудов и более зрелых фибробластов, чем в группах физиологического раствора, Омепразола и Ранитидина. Кроме того, в контрольной группе при введении физиологического раствора наблюдалось множество участков повреждения слизистой оболочки с признаками фибриноидного некроза.

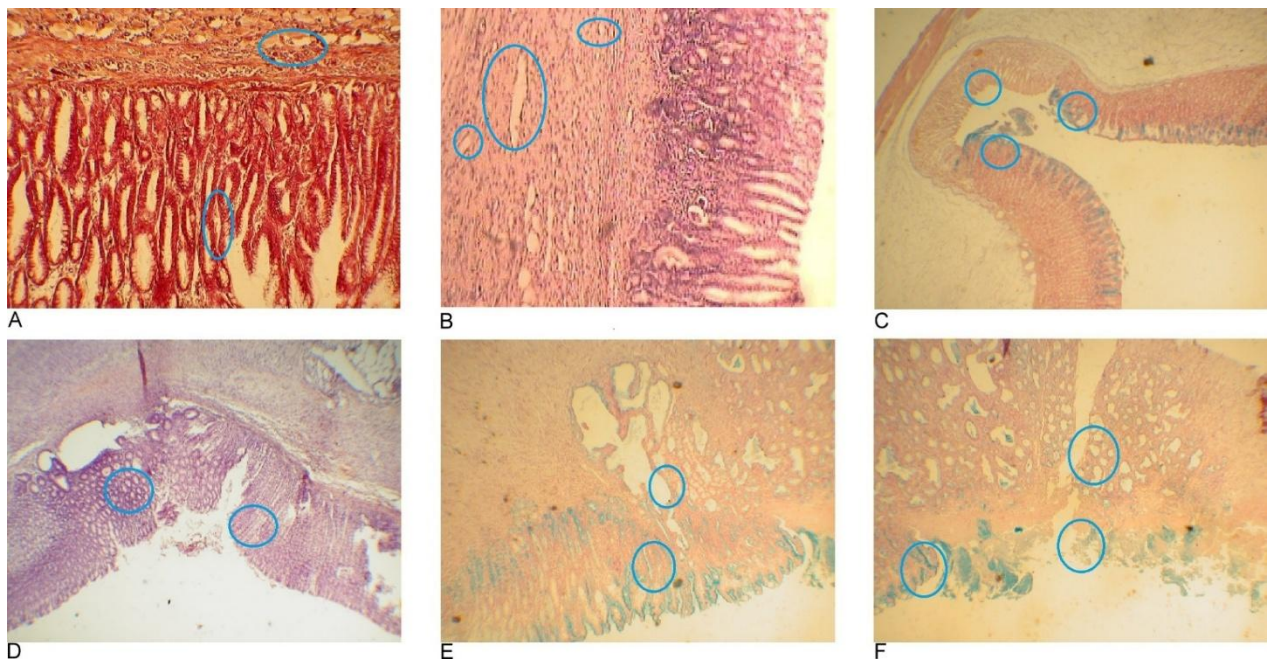


Рисунок 39. Гистология желудка крыс на 10-е сутки после язвообразования по методу Окабе. Окраска по Ван-Гизону (А), гематоксилином и эозином (В, С), альциановым синим (D, Е, F). А) Группа 1, окраска по Ван-Гизону, x200. В) Группа 2, окраска гематоксилином и эозином, x180. С) Группа 3, окраска альциановым синим x140. D) Группа 4, окраска гематоксилином и эозином x140. Е) Группа 5, окраска альциановым синим, x200. F) Группа 6, окраска альциановым синим, x200. Синими кружками обозначены описанные зоны интереса [Generalov E. et al., 2025c].

На Рисунке 39 приводятся результаты гистологических исследований желудка крыс на 10-е сутки после язвообразования по методу Окабе. На Рисунке 39А (группа 1 с введением STP 1 мг/200 г) наблюдается полная регенерация хронической язвы, восстановленная слизистая желудка, без деструкции эпителия, с глубокими желудочными ямками; подслизистые фибробласты расположены параллельно поверхности слизистой. На Рисунке 39В (группа 2 с введением STP 0,5 мг/200 г) видно, что имеется зажившая язва с дифференцировкой формирующейся слизистой оболочки тела желудка, восстановленная слизистая желудка, без деструкции эпителия. На рисунке 39С (группа 3 с введением STP 0,1 мг/200 г, видно полностью зарубцевавшуюся язву, новообразованную слизистую оболочку желудка с восстановленным однослойным призматическим эпителием; по краям язвы умеренная десквамация эпителия; желудочные железы трубчатые с хорошо разветвленными концевыми отделами, без кистозных расширений; подслизистая основа умеренно васкуляризирована, с высоким содержанием эластических волокон. На Рисунке 39D представлены данные по группе 4 с введением Омепразола в дозировке 60 мкг/200 г, наблюдается хроническая «ацетатная» язва в стадии эпителизации с фиброзом и умеренной лейкоцитарной инфильтрацией дна язвы, по краям новообразованной слизистой оболочки желудка отмечается кистозная трансформация желудочных желез. На Рисунке 39Е представлена гистологическая картина группы 5 с введением Ранитидина в дозе 200 мкг/200 г, наблюдается зажившая язва с многочисленными кистозно-расширенными железами, проникающими в дно язвы, с признаками атрофии, а также фиброз собственной пластинки слизистой и подслизистой основы. Данные гистологического анализа для группы 6 (физиологического раствора) представлены на Рисунке 39F, где наблюдается изъязвление на поверхности слизистой и подслизистой основы, отек слизистой оболочки, дистрофия эпителия желез, трансформация желез в кисты, особенно в области дна язвы, подслизистая основа утолщена, с признаками фиброза и участками некроза.

В опытных группах в пределах собственной пластинки слизистой оболочки фибробласты были ориентированы перпендикулярно, в подслизистой основе — параллельно поверхности слизистой оболочки. Положительная реакция с альциановым синим свидетельствует о наличии муцинов и кислых гликозаминогликанов по краям язвы, что наглядно демонстрирует явления заживления, проявляющиеся в виде «наползания» уплощенного эпителия, насыщенного РНК, на поверхность дна язвы и формирования слизистой оболочки пилорического типа несмотря на то, что язва расположена в фундальном отделе. У всех животных, которым вводили STP, желудочные ямки были глубокими, выстланными эпителием с признаками базофилии. Дистально эпителий

принимал вид высокопризматического, содержащего много кислых и нейтральных глюкозаминогликанов. То есть у крыс опытных групп регенерация внутренней оболочки желудка наблюдалась по типу формирования фундальной слизистой оболочки: появляются главные и париетальные клетки.

В подслизистой оболочке животных основных групп обнаружены многочисленные нежные, тонкие коллагеновые волокна и фибробласты. Все эти признаки свидетельствуют об активной регенерации поврежденной оболочки желудка и более быстром, надежном заживлении.

Схожая морфологическая картина в биоптатах желудка наблюдалась в группе с введением Омепразола: при макроскопическом и микроскопическом исследовании слизистой оболочки также не выявлено участков некроза слизистой оболочки желудка. Во всех случаях обнаружены признаки заживления язв, но менее активно, что подтверждается дистрофией эпителиальных клеток, кистозной трансформацией желез, умеренной лейкоцитарной инфильтрацией, отсутствием признаков формирования главных желез, фиброзом собственной пластинки слизистой и подслизистой основы вплоть до образования локальных рубцов.

В контрольной группе (с введением физиологического раствора) слизистая оболочка желудка имела множество язв. Язвы имели обширное дно, покрытое некротическими массами, под которыми были слабо выражены грануляционная ткань, коллагеновые волокна и сосудистые петли. По краям язвы наблюдалось множество кист и расширенных желез, при этом признаков формирования основных желез на фоне формирования грубой рубцовой ткани не наблюдалось.

Сходной гистологической картины в группе с введением Ранитидина не наблюдалось. Ни в одной из опытных групп 1–5 не наблюдалось отрицательных побочных эффектов.

Все эти данные свидетельствуют о том, что STP вызывает значительное ускорение заживления экспериментальных «хронических ацетатных» пептических язв у крыс по сравнению с ингибитором протонной помпы (Омепразолом), блокатором гистаминовых H₂-рецепторов париетальных клеток слизистой оболочки желудка (Ранитидином) и физиологическим раствором.

Заживление язвы подразумевает полную эпителизацию ее поверхности, формирование высокодифференцированной, полноценной пилорической слизистой оболочки, восстановление подслизистой и мышечной оболочек на глубину всего язвенного дефекта. Проведенное нами исследование показало, что через 9 дней лечения в группах STP заживление язвы наблюдается в 60–80% случаев, в группе Омепразола – в 50%, а в группе

Ранитидина – в 25%. Столь существенную положительную разницу в регенерации «хронической» «ацетатной» язвы на фоне применения STP мы связываем с удовлетворительной эпителизацией слизистой оболочки при отсутствии фиброза в собственной пластинке слизистой оболочки и подслизистой основе, что способствует образованию новых сосудов на месте язвенного дефекта и улучшает трофику тканей.

В этом исследовании продемонстрирован терапевтический эффект инъекций STP при лечении пептических язв. Результаты показывают, что STP эффективно снижает язвенный индекс и превосходит стандартные препараты, такие как Омепразол и Ранитидин, особенно при использовании в более высоких дозах 0,5 и 1,0 мг/мл. Эти данные согласуются с предыдущими исследованиями, описывающими противовоспалительные и регенеративные свойства полисахаридов, оказывающих защитное действие на слизистую оболочку желудка [Huang Z. et al., 2023; Wang H. et al., 2024]. Наблюдаемый дозозависимый эффект STP указывает на возможность его использования в различных клинических сценариях, поскольку даже самая низкая доза STP (0,1 мг/кг) продемонстрировала эффективность, сопоставимую с традиционными препаратами, тогда как более высокие дозы (0,5 и 1,0 мг/кг) превосходили их. Эти результаты подчеркивают гибкость в выборе дозировок STP, что может быть полезно для адаптации терапии к тяжести заболевания и индивидуальным потребностям пациентов. Анализ «доза-реакция» ($R^2 = 0,97$, $p < 0,001$) подтвердил положительную корреляцию между дозировкой STP и процентом выздоровевших животных, что указывает на предсказуемость терапевтического эффекта при изменении дозировки. Это важный фактор при разработке индивидуальных терапевтических протоколов, где изменения дозы могут применяться для достижения оптимального клинического результата.

Влияние STP на баланс про- и противовоспалительных цитокинов было значительным. Снижение уровней IL-1 β и IFN- γ в сочетании с повышением уровней IL-4 указывает на его мощный противовоспалительный эффект, который, вероятно, играет ключевую роль в профилактике рецидивов язвенной болезни. Этот эффект сохранялся в течение всего периода наблюдения, подтверждая долгосрочное влияние STP на регуляцию иммунного ответа, что может быть полезно для профилактики хронических воспалительных заболеваний желудка.

Гистологический анализ показал, что применение STP привело к значительному улучшению регенерации тканей по сравнению с контрольными группами. В частности, наблюдалось увеличение количества новообразованных сосудов и зрелых фибробластов, что свидетельствует о качественной регенерации. Кроме того, отсутствие некротических масс и кистозных образований при лечении STP свидетельствует о его преимуществе перед

Омепразолом и Ранитидином, что может снижать риск рецидивов и развития рака, связанного с патологическими изменениями тканей [Hansson L.E., 2000]. Мы предполагаем, что механизм действия STP включает несколько факторов.

Помимо прямого противовоспалительного эффекта через модуляцию цитокинового профиля, STP, вероятно, стимулирует процессы регенерации тканей, о чем свидетельствует активное образование сосудов и дифференцировка фибробластов. Кроме того, положительная реакция на окрашивание альциановым синим свидетельствует об увеличении продукции муцинов и кислых гликозаминогликанов, что укрепляет защитный барьер слизистой оболочки желудка и способствует ее восстановлению. Эти данные согласуются с современными представлениями о роли внеклеточного матрикса в процессах заживления тканей [Diller R.B. and Tabor A.J., 2022]. Формирование слизистой пилорического типа в фундальном отделе желудка также наблюдалось при применении STP, что может указывать на его способность влиять на клеточную дифференцировку и архитектуру тканей. Эти результаты представляют интерес для дальнейших исследований, поскольку способность модулировать структуры тканей может найти применение в регенеративной медицине.

3.2.4.2. Противоязвенная активность в модели Селье

В исследовании использовали крыс линии Август массой 110–130 г, полученных из питомника Пушино. Животных содержали в стандартных условиях вивария с режимом освещения 12/12 ч и свободным доступом к пище и воде.

Для изучения специфической активности STP [Генералова Л.В. и др., 2024] по методу Селье использовали крыс, по 10 животных в каждой группе. Животных фиксировали на спине на протяжении 22 ч. STP вводили однократно в хвостовую вену за 1 час до начала иммобилизации в дозах 0,1 мг, 0,25 мг, 0,5 мг и 1,0 мг на животное в стерильном растворе 0,9% NaCl. Контрольная группа получала физиологический раствор, а экспериментальные группы — STP в указанных дозах.

Через 22 ч, после гуманной эвтаназии животных под эфирным наркозом с последующей цервикальной дислокацией, выполняли биторакотомию, рассекали брюшную стенку, извлекали желудок. Желудок через пищевод наполняли 1% нейтральным формалином, перевязывали с обоих концов и погружали на 5 мин. в 1% формалин. Вскрытие желудка проводили по большой кривизне и изучали макроскопическую картину слизистой оболочки. Измерение площади повреждения проводили с использованием пакета программ ImageJ, определяли «язвенный индекс» (ЯИ), который выражали в см².

Воспаление оценивалось визуально и с использованием пакета программ ImageJ, как процент «красного» по нормировке от контрольной ткани желудка без воспаления по методу Йо [Schneider C.A. et al., 2012].

Для оценки воспалительных изменений в слизистой были определены такие параметры, как гиперемия, отек и внутреннее кровотечение. На Рисунке 40 представлены пирамидальные графики (А, Б, В) и таблицы значений (А', Б', В'), демонстрирующие влияние различных доз STP на три показателя: гиперемия (А, А'), отек (Б, Б') и внутреннее кровотечение (В, В') у экспериментальных животных по сравнению с контрольной группой. Как видно из Рисунка 40, при применении STP частота всех трех патологических состояний заметно снижалась вне зависимости от дозы введения, что подтверждается статистической значимостью $p \leq 0,05$. Это позволяет сделать вывод о том, что STP эффективно предотвращает развитие язвенных изменений у крыс линии Август в модели язвы по методу Селье.

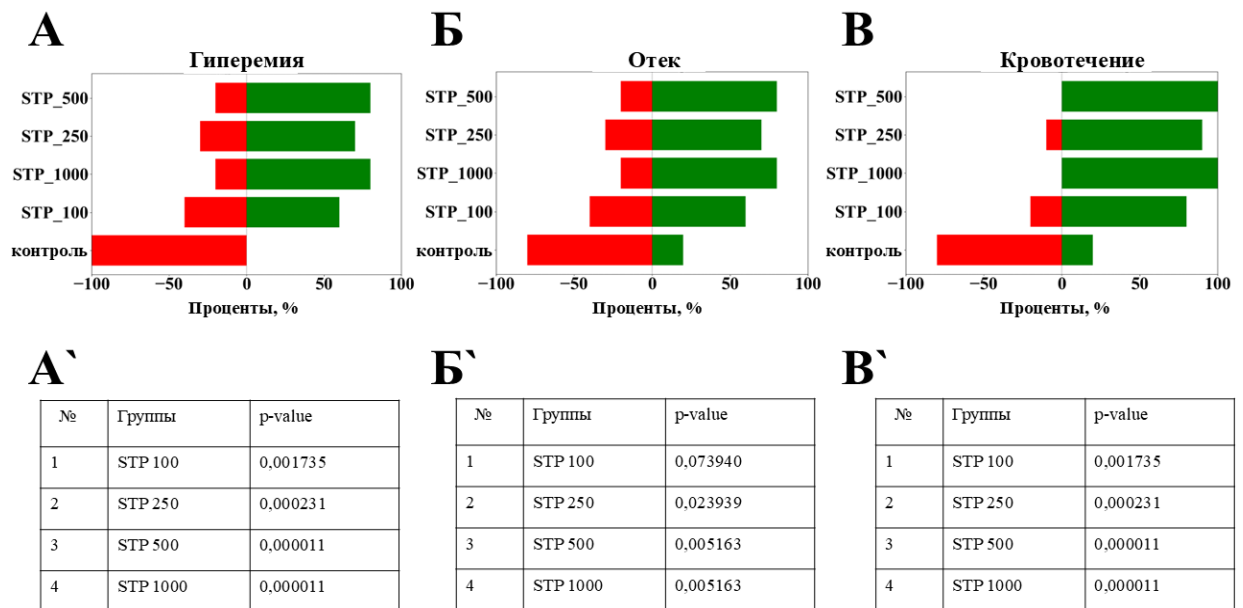


Рисунок 40. Влияние STP на гиперемию (А, А'), отек (Б, Б') и внутреннее кровотечение (В, В') у экспериментальных животных. Зеленые графики показывают процент животных без патологических изменений, а красные — с патологическими изменениями. Таблицы А', Б', В' демонстрируют статистическую значимость изменений по каждому показателю по сравнению с контрольной группой с использованием χ^2 -статистики и уровня значимости $p \leq 0,05$ [Генералова Л.В. и др., 2024].

Таким образом STP не только предотвращает развитие язвы в модели Селье, но и может быть эффективным в качестве лекарственного средства в моделях язвы как острого, так и хронического типа, в достаточно широком диапазоне применяемых дозировок.

Одним из ключевых факторов, объясняющих эффективность полисахаридов в данных моделях, является их способность снижать оксидативный стресс. В условиях язвенных поражений, вызванных стрессом или агрессивными химическими агентами, как в случае с резерпином, оксидативное повреждение клеток слизистой оболочки желудка играет важную роль в патогенезе заболевания. Полисахариды, благодаря своим антиоксидантным свойствам, способны нейтрализовать свободные радикалы и снижать уровень окислительного стресса, что способствует уменьшению повреждения клеток и ускоряет процессы регенерации.

Помимо этого, полисахариды могут оказывать влияние на микробиоту кишечника, что имеет существенное значение для поддержания здоровья желудочно-кишечного тракта. Они способствуют росту полезных бактерий, таких как *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, которые укрепляют барьерную функцию слизистой оболочки желудка и защищают ее от агрессивного воздействия внешних факторов.

STP может усиливать продукцию защитных факторов слизистой оболочки желудка, таких как муцин, который формирует барьер, защищающий ткани от повреждающего действия желудочного сока и других агентов.

Таким образом, результаты настоящего исследования могут свидетельствовать о том, что STP может проявлять свое защитное действие за счет комплексного воздействия на механизмы воспаления, оксидативного стресса, регуляции микробиоты и барьерной функции слизистой оболочки желудка.

3.2.5. Противоопухолевая активность

Для изучения противоопухолевой активности использовались опухолевые линии с селективной органотропией и повышенной клоногенностью *in vivo* – модели карциносаркомы Уокера и карциномы легких Льюиса (LLC). Данные по изучению противоопухолевой активности HTLP представлены на Рисунках 41–45 и Таблицах 4–6. Как видно из экспериментальных данных HTLP проявляет антиметастатическую активность почти до 50%, что является интересным результатом для скринингового теста.

3.2.5.1. Модель карциносаркомы Уокера

В этом исследовании были использованы крысы крыс обоего пола линии Август (ИБХ РАН, Пущино) массой 100–130 г, которым перевивали опухоль Уокера в объеме 0,2 мл и разведении 1:1 в среде 199. HTLP вводили подкожно в дозе 0,015, 0,1 и 1,0 мг/кг ежедневно по разным схемам [Миронов А.Н. и др., 2012; Generalov E.A., 2015]. Метастазы энуклеировали из легких крыс после декапитации. На каждую экспериментальную точку приходилось по 20 мышей.

Были сформированы следующие группы: 1 – контрольная: внутривенное введение стерильного физиологического раствора, забой производился на пятые сутки после перевивки.; 2 – контрольная: внутривенное введение стерильного физиологического раствора; 3 – экспериментальная: внутривенное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с 0,015 мг/кг HTLP; 4 – экспериментальная: внутривенное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с 0,015 мг/кг HTLP; 5 – экспериментальная: внутривенное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с 0,1 мг/кг HTLP; 6 – экспериментальная: внутривенное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с 0,1 мг/кг HTLP; 7 – экспериментальная: внутривенное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с 1,0 мг/кг HTLP; 8 – экспериментальная: внутривенное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с 1,0 мг/кг HTLP;

В группах 1, 3, 5 и 7 животные подвергались гуманной эвтаназии на 5-е сутки методом цервикальной дислокации, а в группах 2, 4, 6 и 8 – на десятые.

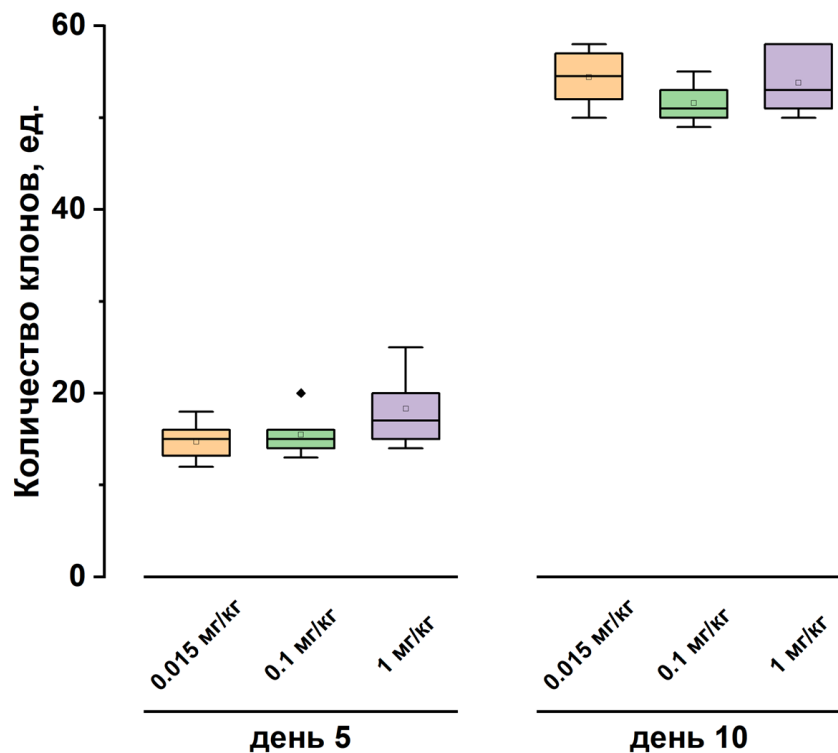


Рисунок 41. Изменение числа метастазов при ежедневном введении 0,015, 0,1 и 1,0 мг/кг полисахарида HTLP в модели карциносаркомы Уокера *in vivo* на 5-й и 10-й дни.

С одной стороны, обращает на себя внимание увеличение антиметастатической активности с течением времени: к 10-му дню процент торможения образования метастазов во всех группах был выше, чем к 5-му дню. Такое явление можно объяснить непрямым иммуноопосредованным действием HTLP и для проявления его максимального терапевтического эффекта требуется время на активацию пула противоопухолевых иммунокомпетентных клеток. С целью подтверждения этой гипотезы был проведен тест на модели карциномы легких Льюиса с более длительным наблюдением. С другой стороны, следует отметить отсутствие зависимости биологического эффекта от дозы, что, предположительно, связано с пределом возможности стимуляции противоопухолевого иммунного ответа полисахаридом.

Таким образом, HTLP проявляет антиметастатическую активность в модели карциносаркомы Уокера. Данная биологическая активность, скорее всего, обусловлена взаимодействием с иммунокомпетентными клетками и их активацией, что приводит к уменьшения циркулирующих опухолевых клеток и, как следствие, количества метастазов. Вместе с тем, нельзя отрицать и прямой противоопухолевой активности, что требует дополнительных исследований.

3.2.5.2. Модель карциномы легких Льюиса

Антиметастатическую активность HTLP дополнительно изучали на модели карциномы легких Льюиса с пролонгированным наблюдением за животными.

Использовали мышей обоего пола линии C₅₇BL/6 весом 18–20 г, которым внутримышечно вводили клетки карциномы легких Льюиса в количестве 2×10^6 (0,3 мл взвеси клеточной суспензии в растворе Хэнкса) в бедро задней лапы. Введение HTLP осуществляли на 4 день после перевивки. В ходе роста опухоли ее вес измеряли пятикратно (5, 11, 14, 17, 20 дни). После эвтаназии животных производили удаление легких, их взвешивание и подсчет количества колоний метастазов. На каждую экспериментальную точку брали по 20 животных.

Были сформированы следующие группы: 1 – экспериментальная: однократное подкожное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозе 0,5 мг/кг; 2 – экспериментальная: пятикратное подкожное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозе 0,5 мг/кг; 3 – экспериментальная: пятикратное подкожное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозе 5,0 мг/кг; 4 – экспериментальная: пятикратное подкожное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозе 5,0 мг/кг; 5 – контрольная: пятикратное подкожное введение стерильного раствора 0,9% NaCl.

Влияние HTLP на вес первичной опухоли показано в Таблице 4 и на Рисунке 42. Параметром торможения роста опухоли являлась разница между кинетикой роста опухоли в контрольной и опытной группе. Коэффициент торможения роста опухоли (*KTP*, %) определялся следующим образом: $KTP = 1 - P_T/P_C$, где P_i – вес опухоли, $i = C$ или T , где C – в контроле и T – в опытной группе. Максимальный уровень *KTP* достигал 15%. В силу особенности метода не было учтено, что воспалительная реакция и некротические процессы влияют на вес опухоли. Тем не менее, морфологические различия между группами были существенные. В контрольной группе некротические процессы в центральной части начались лишь на 14-й день после перевивки, а в опытных группах – на 11-й день, причем к 20-му дню прогрессировали и были широко распространены.

Известно, что развитие карциномы Льюиса характеризуется интенсивными процессами метастазирования в легкие, которые прослеживаются, начиная уже с 4-х суток после трансплантации опухоли. Метод позволяет макроскопически подсчитывать количество колоний опухолевых клеток в легочной ткани, которые хорошо регистрируются после 10 суток развития опухоли.

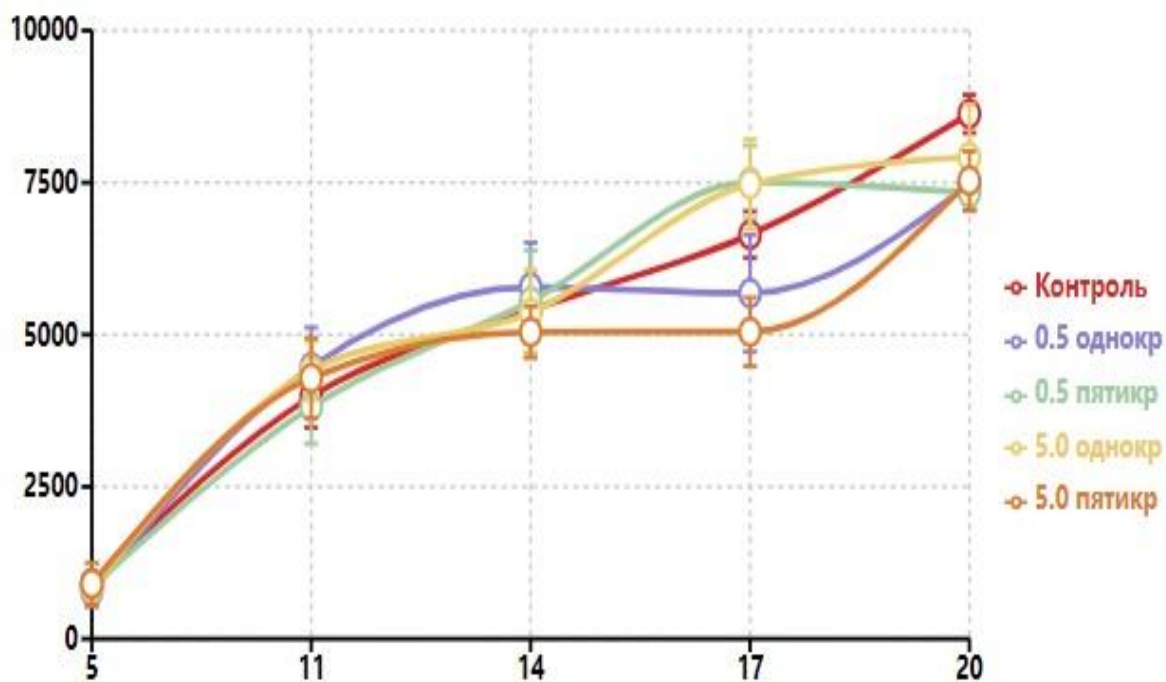


Рисунок 42. Влияние HTLP на вес первичной опухоли в модели карциномы легких Льюиса *in vivo*. По оси ординат – вес опухоли в мг, по оси абсцисс – день исследования.

Таблица 4. Изменение веса первичной опухоли в модели карциномы легких Льюиса *in vivo*.

Группа	Доза и курс HTLP	КТР, %					Рост, разы
		5 день	11 день	14 день	17 день	20 день	
1	0,5 мг/кг однократное введение	13,2%	-12,1%	-7,0%	14,5%	13,4%	9,4
2	0,5 мг/кг пятикратное введение	6,3%	4,3%	-2,7%	-13,0%	15,0%	8,6
3	5,0 мг/кг однократное введение	7,1%	-10,8%	0,7%	-12,5%	8,2%	9,4
4	5,0 мг/кг пятикратное введение	0,5%	-7,6%	6,6%	24,0%	12,7%	8,3
5	Контроль						9,5

Косвенным показателем развития метастазов в легких могло служить увеличение массы легких по мере развития опухолевого процесса. Динамика изменения массы легких у контрольных и опытных животных представлена в Таблице 5 и Рисунке 43. Четкой динамики в изменениях показателей массы легких у контрольных и опытных животных не прослеживается. Максимальный антиметастатический эффект наблюдался к 20-м суткам в группе животных с дозой 0,5 мг/кг при пятикратном введении, который составил 42,4%. Очевидно, данный показатель не является достаточно информативным для оценки процессов метастазирования первичной опухоли карциномы Льюиса.

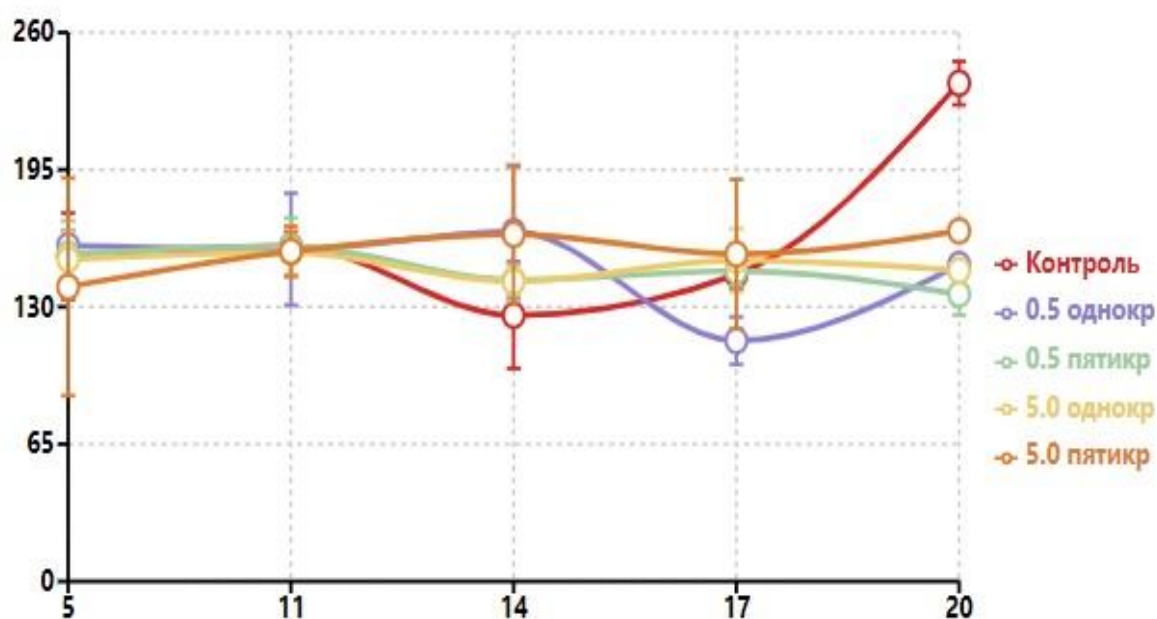


Рисунок 43. Влияние НТЛР на изменение массы легких у контрольных и опытных животных с карциномой Льюиса. По оси ординат – вес легкого в мг, по оси абсцисс – день исследования.

Таблица 5. Влияние НТЛР на изменение массы легких у контрольных и опытных животных с карциномой Льюиса.

Группа n=5**	Доза и курс введения НТЛР	Торможение, %				
		5 день	11 день	14 день	17 день	20 день
1	0,5 мг/кг Однократное	3,2	0,9	31,5*	11,2	36,4*
2	0,5 мг/кг Пятикратное	0,6	0	13,3	16,7*	42,4*
3	5,0 мг/кг Однократное	1,0	1,9	12,7%	14,6	37,6*

4	5,0 мг/кг Пятикратное	9,4*	1,5	30,4*	21,5*	29,7*
5	Контроль (в сравнении с нативными животными)	-4,1	-7,2	-14,9	-22,3	-59,5

* Статистически значимое ($p < 0,05$) отличие от контроля

** Среднее по 5-ти животным

Данные прямого подсчета количества метастазов в легочной ткани контрольных и опытных животных представлены в Таблице 6.

Таблица 6 и Рисунок 44 демонстрируют влияние полисахарида из *Helianthus tuberosus L.* на процесс метастазирования. К 14-му дню после введения легочной карциномы Льюиса обнаруживалось до 11-ти колоний раковых клеток в легких контрольной группы. Уже, начиная с 14-го дня, введение НТЛР эффективно тормозит процесс метастазирования. Введение полисахарида в дозах 25 и 5 мг/кг, однократно тормозит процесс метастазирования на 60–75% по сравнению с контролем.

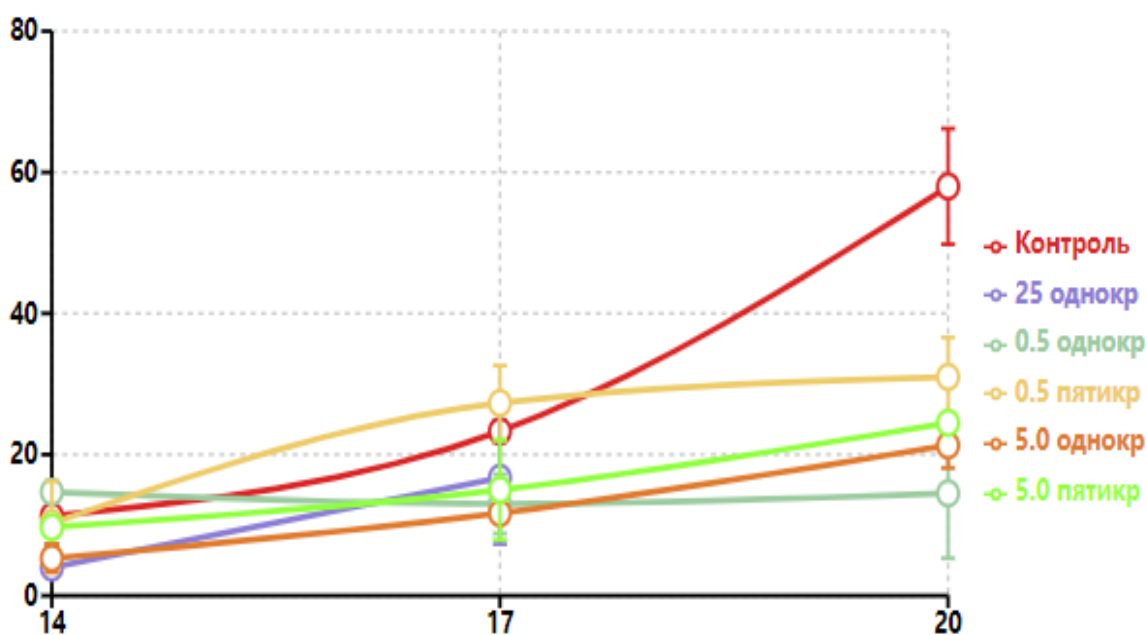


Рисунок 44. Влияние НТЛР на процесс метастазирования в легкие карциномы Льюиса. По оси ординат – количество колоний метастазов в легких, по оси абсцисс – день исследования.

Отчетливый антиметастатический эффект прослеживается и в более поздние сроки развития процесса. На 17-е сутки роста опухоли антиметастатический эффект наблюдается

во всех группах животных. Ингибирующий эффект варьирует в зависимости от дозы в пределах 30–50%.

Таблица 6. Влияние НТЛР на процесс метастазирования в легкие карциномы Льюиса (прямой подсчет колоний).

Группа	Доза и курс введения НТЛР	Количество колоний опухолевых клеток в легких в различные сроки после трансплантации карциномы Льюиса (M±SD)		
		14 день	17 день	20 день
1	25 мг/кг Однократное	4,0 ± 1,2	16,7 ± 9,4	-
2	0,5 мг/кг однократное	14,7 ± 1,5	13,0 ± 4,2	14,5 ± 9,2
3	0,5 мг/кг Пятикратное	10,3 ± 5,9	27,3 ± 5,3	31,0 ± 5,6
4	5,0 мг/кг Однократное	5,3 ± 2,0	11,7 ± 1,1	21,3 ± 3,2
5	5,0 мг/кг Пятикратное	9,7 ± 1,1	15,0 ± 7,1	24,5 ± 0,7
6	Контроль	11,3 ± 4,1	23,3 ± 1,5	58,0 ± 8,2

На последний срок наблюдения – 20-е сутки, антиметастатический эффект полисахарида оказывается наиболее выраженным. Торможение процесса метастазирования к 20-м суткам составляет 50–75%, колеблясь в этих пределах в зависимости от дозы и режима применения полисахарида.

Необходимо подчеркнуть, что максимальный антиметастатический эффект проявляется при однократном введении НТЛР, как в малой 0,5 мг/кг (2-ая группа), так и в высокой дозе 25 мг/кг (1-ая группа). В указанных дозах НТЛР ингибирует процесс метастазирования в легкие на 75 и 65% (соответственно на 20-е и 14-е сутки развития опухоли). Следует отметить, что у животных, получавших данные дозы полисахарида, метастатические колонии содержали существенно меньшее количество опухолевых клеток,

поскольку регистрируемые метастазы были значительно меньшего размера, чем наблюдаемые у контрольных мышей.

3.2.5.3. Адьювантная активность с производным индолкарбазола

Одной из важных биотехнологических и биомедицинских задач на сегодня является поиск новых способов и методов повышения эффективности терапии трудноизлечимых заболеваний, к которым относятся и онкологические. Для проверки возможного биомедицинского применения природных полисахаридов было изучено влияние HTLP на эффективность применения химиотерапевтического препарата ЛХС-1269 в модели эпидермоидной LLC мышей, являющегося производным N-гликозида индоло[2,3-а]карбазола [Киселева М.П. и др., 2024].

Использовали самок мышей линии F₁(C₅₇Bl/6×DBA/2) массой тела 18–22 г (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ), которым перевивали клетки LLC подкожно по 0,5 мл в среде 199 в разведении 1:10 (5×10^6 клеток). Ведение штамма вели по стандартному протоколу [Софьина З.П. и др., 1980; Трещалина Е.М. и др., 2012]. В каждой экспериментальной группе было по 16 животных ($n=16$), контрольная группа без лечения состояла из 20 особей ($n=20$).

Первое введение препаратов проводили через двое суток после перевивки опухолевых клеток. У мышей проводили забор крови для оценки гематологических показателей на гематологическом анализаторе (Mindray, Китай). Подсчет лейкоцитарной формулы проводили стандартным гематологическим методом [Tolle F. et al., 2021].

Были сформированы следующие группы: 1 – экспериментальная: однократное внутривенное введение стерильного раствора ЛХС-1269 в дозе 90 мг/кг; 2 – экспериментальная: пятикратное ежедневное внутрибрюшинное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозе 5 мг/кг; 3 – экспериментальная: сочетанное однократное внутривенное введение стерильного раствора ЛХС-1269 в дозе 90 мг/кг и пятикратное ежедневное внутрибрюшинное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозе 5 мг/кг; 4 – экспериментальная: сочетанное однократное внутривенное введение стерильного раствора ЛХС-1269 в дозе 90 мг/кг и однократное ежедневное внутрибрюшинное введение стерильного раствора 0,9% NaCl с HTLP в дозе 5 мг/кг; 5 – контрольная, без лечения.

Данные, представленные на рисунке, демонстрируют, что пролонгированный противоопухолевый эффект ЛХС-1269 наблюдали только при совместном с HTLP однократном или пятикратном введении (ТРО составил от 59 до 64% и от 53 до 59%,

соответственно, $p < 0,05$). ЛХС-1269 в монотерапии оказывал противоопухолевое действие только до 8-го дня наблюдения, тормозя рост опухоли до 60%, после чего эффект снижался до 35% на 12 день, а к 28 дню составил 42%. При применении HTLP в монотерапии торможение роста опухоли составляло до 38%. Сочетанное применение полисахарида HTLP и ЛХС-1269 приводило к уменьшению опухолевого роста LLC (Таблица 7 и Рисунок 45). Наблюдение за животными продолжали до 28 дня после прекращения введения веществ.

Таблица 7. Противоопухолевая эффект ЛХС-1269 и HTLP в монотерапии и в комбинациях на LLC мышей.

Группа		Путь введения	Доза (мг/кг) /интервал (час) x число введений	ТРО, %							
				Дни после окончания лечения							
				1	4	8	12	16	20	24	28
1.	ЛХС-1269	в/в	90 x 1	60 ^{1,2}	48 ^{1,2}	52 ^{1,2}	35	48	40	46	42
2.	HTLP	в/б	5/24 x 5	32 ¹	24 ¹	34 ¹	22 ¹	30 ¹	30 ¹	38 ¹	29 ¹
3.	ЛХС-1269 + HTLP	в/в + в/б	90 x 1 + 5/24 x 5	59 ^{1,2}	53 ^{1,2}	59 ^{1,2}	49 ¹	58 ^{1,2}	54 ^{1,2}	53 ^{1,2}	49 ^{1,2}
4.	ЛХС-1269 + HTLP	в/в + в/б	90 x 1 + 5 x 1	64 ^{1,2}	42	50 ^{1,2}	34	50 ¹	48 ^{1,2}	50 ^{1,2}	59 ¹

Примечание – ¹ $p < 0.05$ по отношению к контролю, ² $p > 0.05$ между группами 1, 3 и 4.

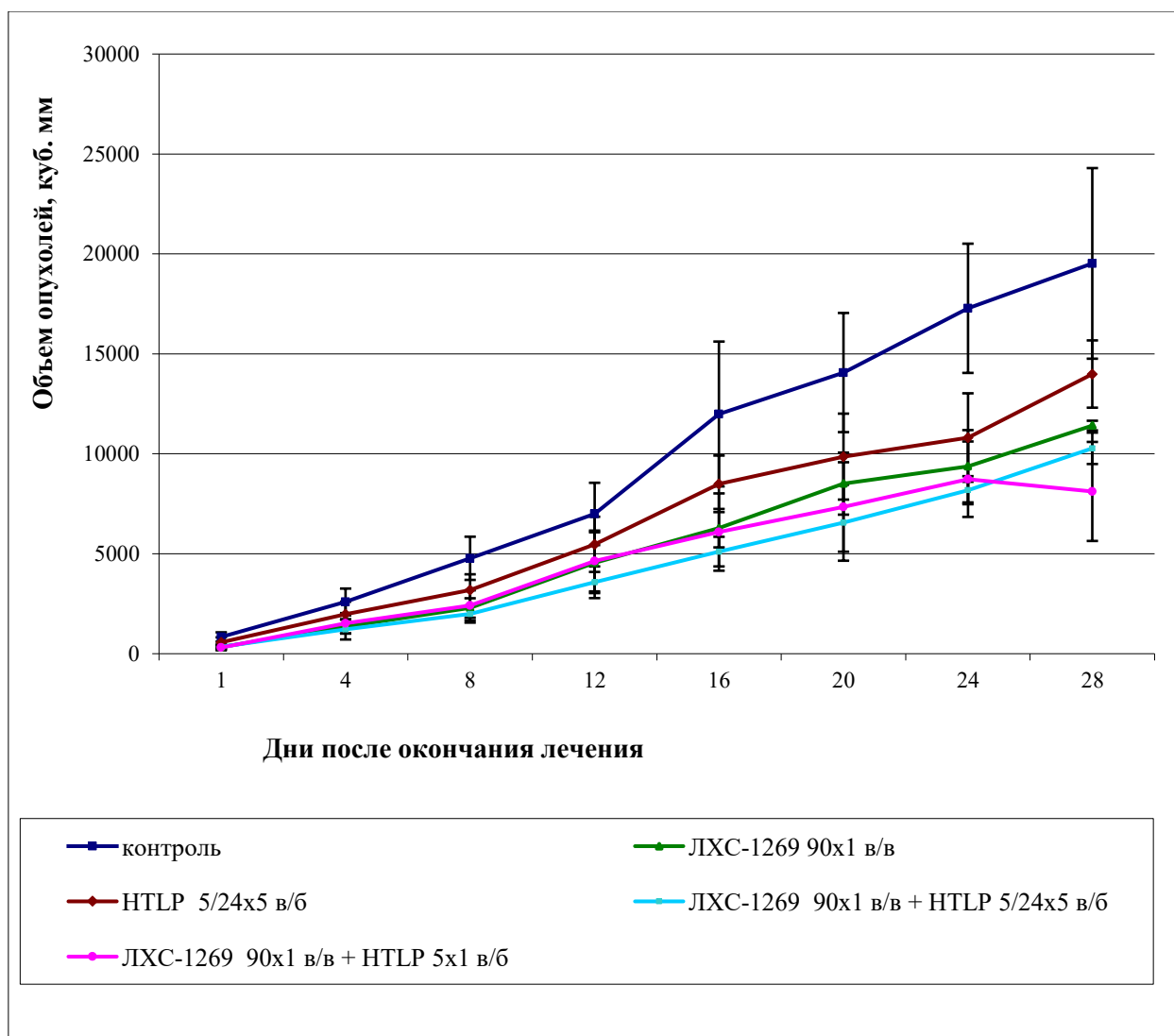


Рисунок 45. Динамика роста LLC при введении ЛХС-1269 или HTLP в монотерапии и в комбинации. В/в – внутривенное введение, в/б – внутрибрюшное.

В дальнейшем проводилась оценка влияния введения HTLP и производного индолкарбазола, а также их комбинаций, на клеточность крови подопытных животных с LLC на 12-й и 20-й дни после перевивки (Таблицы 8 и 9, соответственно).

Таблица 8. Общий анализ крови мышей на 12-е сутки после перевивки LLC и лечения.

Клетки крови	Группа животных				
	ЛХС-1269х1(в/в) + HTLP x 1(в/б)	ЛХС-1269х1(в/в) + HTLP x 5 (в/б)	HTLPx5 (в/б)	ЛХС-1269х1 (в/в)	Контроль
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	2,46±0,69*	2,83±0,71**	2,25±0,5*	1,27±0,38*	1,87±0,53
Нейтрофилы, %	64,5±18,6*	75,1±20,7**	36,7±11,4	59,2±14,2**	34,9±7,2
Количество, 10 ⁹ /л	1,59*	2,12**	0,83	0,75	0,65
Лимфоциты, %	9,6±2,9**	4,9±1,6**	59,3±10,6*	17,7±3,4**	45,1±15,3
Моноциты, %	25,4±9,4	19,4±7,8	3,4±2,4**	20,8±7,5	18,2±8,2
Количество, 10 ⁹ /л	0,62	0,55	0,08	0,26	0,34
Эозинофилы, %	0,4±0,4	0,4±0,5	0,5±0,3	1,5±1,2	1,6±0,9
Базофилы, %	0,1±0,1	0,2±0,1	0,1±0,2	0,8±0,5	0,2±0,3
Эритроциты, 10 ¹² /л	2,05±0,7	1,51±0,52	1,38±0,37	1,19±0,26	1,63±0,46
Гемоглобин, г/л	31,5±10,5	24,5±8,1	21,5±5,5	19,5±4,4	25,0±7,1
Гематокрит, %	8,75±2,67	6,85±1,85	5,95±1,49	5,2±1,4	6,90±2,14
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	135,0±35,1	137±31,5	82±23,8*	78,5±26,7*	141,0±38,1
Тромбоциты, %	0,08±0,03	0,08±0,02	0,05±0,01	0,05±0,02	0,08±0,02

Примечание – *p<0,05; **p<0,01при сравнении с показателями контроля по критерию Стьюдента. Приведены среднеарифметические значения ± стандартное отклонение (SD).

Таблица 9. Общий анализ крови мышей на 20-е сутки после перевивки LLC и лечения.

Клетки крови	Группа животных				
	ЛХС1269х1(в/в) + НТLP х 1(в/б)	ЛХС-1269х1(в/в) + НТLP х 5(в/б)	НТLP х 5 (в/б)	ЛХС-1269х1 (в/в)	Контроль
Лейкоциты, 109/л	2,5±0,78*	2,34±0,75*	4,9±1,23	2,83±0,79**	4,2±1,26
Нейтрофилы, %	53,2±14,4	57,4±21,0	43,4±10,2	55,1±14,9	48,8±12,7
Количество, 109/л	1,33	1,34	2,13	1,56	2,05
Лимфоциты, %	38,1±10,3	28,7±7,2**	45,8±11,0	34,3±6,9*	43,1±13,0
Моноциты, %	7,0±4,9	11,1±4,0**	9,4±3,3**	8,7±3,7	6,5±2,9
Количество, 109/л	0,17	0,26	0,46**	0,25	0,27
Эозинофилы, %	0,5±0,6	1,2±08	0,7±0,4	0,8±0,7	0,8±0,5
Базофилы, %	1,2±0,7	1,6±0,5	0,7±0,3	1,1±0,6	0,8±0,7
Эритроциты, 1012/л	1,99±0,65	1,97±0,55	2,07±0,60	2,10±0,57	2,13±0,66
Гемоглобин, г/л	31,50±9,77	32,0±9,0	29,0±7,8	34,0±9,0	29,0±8,7
Гематокрит, %	8,90±2,58	9,00±2,43	8,0±2,24	9,40±2,54	8,30±2,41
Тромбоциты, 109/л	101,0±28,1	54,0±12,7*	94,0±23,5	107,0±28,8	91,0±27,7
Тромбокрит, %	0,06±0,03	0,03±0,01	0,05±0,01	0,07±0,02	0,05±0,02

Примечание – *p<0,05; **p<0,01 при сравнении с показателями контроля по критерию Стьюдента. Приведены среднеарифметические значения ± стандартное отклонение (SD).

Данные, полученные в результате общего анализа крови, позволяют установить определенные тенденции. На 12-й день после начала развития опухолевого процесса произошло статистически значимое снижение абсолютного количества лейкоцитов в группе с введением ЛХС-1269. Наоборот, в группе с введением НТЛР, а также в когорте, получавшей комбинированное применение обоих препаратов, уровни лейкоцитов были повышены по сравнению с контрольной группой. Для иллюстрации: применение ЛХС-1269 в сочетании с пятикратным введением НТЛР привело к значительному увеличению количества лейкоцитов до 1,5-кратного, в то время как однократное введение НТЛР в сочетании с ЛХС-1269 привело к увеличению количества лейкоцитов примерно в 1,3 раза. Инъекции НТЛР в качестве монотерапии привели к повышению уровня лейкоцитов в 1,2 раза. К 20-му дню наблюдения суммарное количество лейкоцитов во всех экспериментальных группах возросло в 2,3 раза по сравнению с 12-м днем. Примечательно, что стимулирующее влияние НТЛР сохранялось на 1,2-кратном уровне, однако в группах, получавших ЛХС-1269, количество лейкоцитов снизилось в 1,8 раза по сравнению с контрольной группой.

На 12-й день наблюдалось заметное увеличение относительной популяции лимфоцитов в кровотоке у подопытных, получавших НТЛР в качестве монотерапии в сравнении с контрольной группой. Например, в сравнении с группой монотерапии ЛХС-1269, показало увеличение числа лимфоцитов в 3,4 раза, тогда как в сравнении с группой совместного применения увеличение было еще более выраженным и достигло 12-кратного значения. Это наблюдаемое изменение, вероятно, означает усиление пролиферации иммунокомпетентных клеток и их последующую миграцию из периферической системы кровообращения в очаги воспаления. Этот процесс, скорее всего, вызван иммуноопосредованным действием НТЛР.

В этом контексте ЛХС-1269, по-видимому, вызывает прямое химиотерапевтическое повреждение трансформированных клеток, что приводит к усилению местных воспалительных реакций, в то время как НТЛР способствует пролиферации и миграции лимфоцитов к опухолевому узлу. Эта гипотеза дополнительно подтверждается анализом данных о моноцитах, включающих как абсолютные, так и относительные значения: в группе с введением НТЛР было определено, что абсолютное количество моноцитов в крови в 4,3 раза ниже, чем в контрольной группе, и в 3,3 раза ниже по сравнению с группой ЛХС-1269. Кроме того, на 20-й день было обнаружено, что количество моноцитов в группе НТЛР в 1,7 раза превышало значения, зарегистрированные в контрольной группе, и в 1,8 раза количества моноцитов в группе ЛХС-1269, что также служит индикатором стимулированного синтеза моноцитов под действием НТЛР.

При изучении количества нейтрофилов важно отметить очевидное несоответствие между наблюдаемыми тенденциями процентного содержания нейтрофильных клеток и их абсолютным количеством. Это явление можно объяснить нормировкой количества клеток по отношению к общему количеству клеток. К 12-му дню совместное введение ЛХС-1269 и НТЛР привело к дозозависимому повышению количества нейтрофилов у подопытных и достигло 3,3-кратного значения. При этом, в группе НТЛР к 20-му дню этот эффект уменьшился до уровня, неотличимого от уровня контрольной, в то время как в группах, получавших лечение ЛХС-1269, количество нейтрофилов снижалось в 1,5 и 1,3 раза в сравнении с контрольными значениями. Стоит отметить, что на начальных этапах онкогенного процесса совместное применение полисахарида и химиопрепарата эффективно стимулирует нейтрофильный ответ, тогда как этот стимулирующий эффект, по-видимому, не сохраняется на поздних стадиях прогрессирования опухоли. Предположительно, это явление связано со специфическим угнетающим воздействием ЛХС-1269 на популяцию нейтрофилов. Вместе с тем, можно предположить, что пятикратного введения НТЛР в течение трехнедельного экспериментального периода было недостаточно для поддержания длительной выработки нейтрофилов.

Стоит отметить, что у мышей с LLC, которым вводили совместно ЛХС-1269 и НТЛР, наблюдался выраженный и устойчивый противоопухолевый ответ. Учитывая иммунобиологические свойства НТЛР как полисахарида, известного своими колониестимулирующими свойствами, в сочетании с ранее подтвержденными эпигенетическими и антиангиогенными свойствами, присущими индолкарбазольному соединению ЛХС-1269, можно сделать вывод, что механизмом, который может лежать в основе антипролиферативной эффективности синергетической комбинации НТЛР и ЛХС-1269, является прямое цитотоксическое действие ЛХС-1269 в качестве химиотерапевтического агента, а также не прямое действие НТЛР в качестве иммуномодулирующего и адъювантного средства. Совместное применение этих двух соединений способствует пролиферации и активации нейтрофилов и моноцитов определенных фенотипов, обладающих противоопухолевой активностью, особенно на ранних стадиях развития опухолей. В соответствии с результатами предыдущих исследований, проведенных другими исследователями на мышинных моделях карциномы легких Льюиса, было продемонстрировано, что включение полисахаридов в схемы комбинированной химиотерапии с использованием цисплатина и паклитаксела способствовало предотвращению нейтропении, распространенного побочного эффекта противоопухолевой терапии, и тем самым повышало общую терапевтическую

эффективность за счет восстановления роста количества гранулоцитов [Safonova E.A. et al., 2018].

Применение НТЛР привело к увеличению общего количества клеток крови, включая лейкоциты, лимфоциты и фагоцитарные клетки, которые играют важную роль в противоопухолевом иммунном ответе хозяина.

3.2.5.4 Влияние НТЛР на противоопухолевую активность лимфоцитов

Для изучения механизма противоопухолевой активности НТЛР были выбраны НК. Они представляют собой важный компонент врожденной иммунной системы и играют ключевую роль в защите организма, действуя в качестве первой линии обороны против опухолевых процессов. Они распознают аномальные или трансформированные клетки, способствуя предотвращению развития опухолей и обеспечивая иммунологический надзор. При обнаружении таких клеток НК активизируются и уничтожают трансформированные клетки. Для выполнения своей противоопухолевой функции НК используют несколько механизмов, включая секрецию литических гранул, экспрессию рецепторов смерти и выработку цитокинов, что позволяет уничтожать аномальные клетки и модулировать иммунный ответ. Кроме того, НК взаимодействуют с другими клетками в опухолевом микроокружении, что может оказывать значительное влияние на прогрессирование заболевания [Соёпон L. et al., 2024].

В качестве клеток-мишеней использовали клетки миелолейкоза человека (К-562), меченные ^3H -уридином в дозе 3 мКи на 1 мл клеточной культуры, в количестве 10^5 . В качестве клеток-эффекторов использовали лимфоциты периферической крови (ЛПК). Культивирование клеток-эффекторов производилось 24 ч *in vitro* с раствором полисахарида в объеме 100 мкг/лунку. В лунки круглодонной 96-луночной микропланшеты добавляли по 100 мкл клеточной суспензии эффекторов и клеток-мишеней в соотношении 100:1. К ним добавляли 10 мкл РНКазы в концентрации 5 мкг/мл. В качестве контроля использовали клетки-мишени без добавления клеток-эффекторов и клетки-мишени с добавлением такого же количества полисахарида, не обработанного ферментами и обработанного ферментами. Планшет инкубировали в CO_2 -инкубаторе 14 ч. Содержимое ячеек переносили с помощью харвестера на фильтры (Whatman) и отмывали физиологическим раствором, затем 5%-м раствором трихлоруксусной кислоты и 95%-м этанолом. Высушенные фильтры помещали во флаконы, содержащие сцинтилляционную жидкость.

Активность НК представлена на Рисунке 46 без инкубации и с совместной инкубацией с НТЛР. Индекс цитотоксичности (CI) определяли по формуле:

$CI = (1 - A/B) \times 100\%$, где A – число импульсов в тест-ячейках; B – число импульсов в контрольных ячейках.

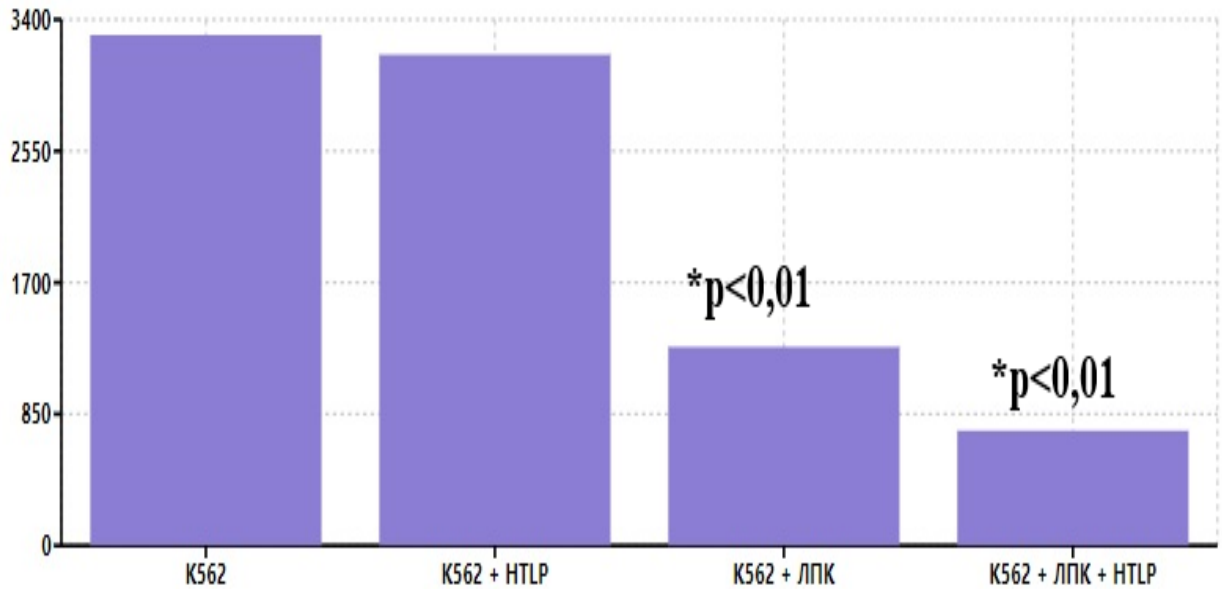


Рисунок 46. Влияние HTLP на активность НК *in vitro*. По оси ординат – количество импульсов от включения ^3H -уридина в K562, по оси абсцисс – экспериментальные группы.

При внесении HTLP без ЛПК в культуру клеток K562 не наблюдалось статистически значимого изменения количества клеток, что свидетельствует об отсутствии цитотоксичности HTLP и согласуется с данными других экспериментов.

Индекс цитотоксичности для модели с добавлением ЛПК составил 61 ± 3 , при добавлении ЛПК совместно с полисахаридом – 78 ± 3 . При этом добавление только полисахарида не приводило к цитотоксичности и индекс составил 4 ± 1 . Из полученных данных видно, что полисахарид усиливает активность лимфоцитов периферической крови *in vitro*, но при этом не является цитотоксическим агентом.

Активность НК регулируется балансом активности внутриклеточных сигнальных каскадов, запускаемых ингибирующими и активирующими рецепторами. При онкологических заболеваниях этот баланс может смещаться в сторону подавления, что способствует иммунному ускользанию опухоли. В связи с этим крайне важно найти новые подходы, направленные на оптимизацию противоопухолевой функциональности НК [Toffoli E.C. et al., 2021]. Одним из таких веществ может быть HTLP, что и показало исследование [Generalov E.A., 2015].

Следовательно, HTLP может быть использован в биомедицинских целях в качестве: химиоадьювантного средства для повышения антипролиферативной активности химиотерапевтических препаратов, что показано на примере производного индолкарбазола; для поддержания лимфо- и лейкопоза при проведении курсов химио- или лучевой терапии, что подтверждается данными по оценке как противоопухолевой, так и радиозащитной активности (представлены ниже), а также средства, активирующего противоопухолевую активность лимфоцитов. Результаты совместного применения не только привели к синергетическому противоопухолевому эффекту, но и показали, что терапевтические результаты, достигнутые при комбинированном введении, были значительно более выраженными и устойчивыми с течением времени по сравнению с результатами, наблюдаемыми при монотерапии в эквивалентных дозах.

Наиболее вероятно, что противоопухолевая и антиметастатическая активность HTLP наблюдается за счет иммуномодулирующей активности, взаимодействия с иммунокомпетентными клетками и регуляции цитокиновых каскадов (что показано ниже, как ИФА-методом, так и в анализе транскриптома), что позволяет рассматривать HTLP в качестве химиоадьювантного и радиоадьювантного агента (ниже показаны его противолучевые и радиопротекторные свойства, что может быть использовано при лучевой терапии опухолей). Так, например, стимуляция выработки TNF может ингибировать рост опухоли и процесс метастазирования несколькими путями. Фактор некроза опухоли влияет на связывание TNF- α с TNFR-1, что приводит к снижению гиперпроницаемости сосудов опухоли, стимулирует гипоксические явления в опухолевом узле [Wettschureck N. et al., 2019] и вызывает иммуноопосредованный некроз раковых опухолей [Wu T.H. et al., 2004; Mittal M. et al., 2014;].

3.2.6 Противолучевая активность

Оценку радиопротекторных свойств HTLP проводили в различных моделях и при разных типах облучения [Генералов Е.А., 2014; 2015; Generalov E.A. et al., 2024].

3.2.6.1. Протонное и рентгеновское облучение

В случае протонного облучения использовались беспородные мыши SHK массой 24–30 г в возрасте 5 месяцев. Все животные содержались в просторных клетках с 12:12-часовым циклом свет–темнота и свободным доступом к воде и пище.

Облучение протонами проводилось в лаборатории ядерных проблем Объединенного института ядерных исследований (ОИЯИ, Дубна) на пучке высокоэнергетических протонов фазотрона, на стенде для радиационных исследований. Облучение обеспечивалось протонными пучками с энергией 660 МэВ с дозами 1,5 Гр для микроядерного теста (описан ниже) и 6,5 Гр для теста на выживаемость. Контроль выделяемой дозы осуществлялся с помощью специализированных ионизационных камер и дозиметрических пленок (ЕВТЗ, США). Во время облучения животные находились в индивидуальном, быстросъемном, хорошо проветриваемом, тонкостенном (толщина стенки 1 мм) пластиковом контейнере, который закреплялся на специальной облучательной платформе [Агапов и др., 2023].

Рентгеновское облучение всего тела проводилось на терапевтическом рентгеновском аппарате РУТ-15 (ОИЯИ, Дубна) дозами 1,5 Гр для микроядерного теста и 6,5 Гр для теста на выживаемость.

В качестве положительного контроля использовали предварительно облученных животных в дозе 0,1 Гр (0,1 Гр в мин) за 24 ч до облучения в выявляющей дозе 1,5 Гр (по схеме индукции радиационного адаптивного ответа) [Zaichkina S.I. et al., 2016].

Были сформированы следующие группы: 1 – контрольная: необлученным мышам вводили внутривенно физиологический раствор; 2 – контрольная: необлученным мышам вводили внутривенно раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 100 мкг/мышь; 3 – контрольная: мышам вводили внутривенно раствор 0,9% NaCl за 15 минут до облучения протонами в дозе 1,5 Гр; 4 – экспериментальная: мышам вводили внутривенно раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 100 мкг/мышь за 15 мин до облучения протонами в дозе 1,5 Гр; 5 – контрольная: мышам вводили внутривенно раствор 0,9% NaCl за 15 мин до облучения протонами в дозе 6,5 Гр; 6 – экспериментальная: мышам вводили внутривенно раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 100 мкг/мышь за 15 мин до облучения протонами в дозе 6,5 Гр; 7 – контрольная: мышам вводили внутривенно раствор 0,9% NaCl за 15 мин до рентгеновского облучения в дозе 1,5 Гр; 8 – экспериментальная: мышам вводили внутривенно раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 100 мкг/мышь за 15 мин до рентгеновского облучения в дозе 1,5 Гр; 9 – контрольная: мышам вводили внутривенно раствор 0,9% NaCl за 15 мин до рентгеновского облучения в дозе 6,5 Гр; 10 – экспериментальная: мышам вводили внутривенно раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 100 мкг/мышь за 15 мин до рентгеновского облучения в дозе 6,5 Гр; 11 – контрольная: мышам вводили внутривенно 0,9% NaCl раствор 50 мг/кг цистамина после протонного облучения в дозе 6,5 Гр; 12 – контрольная: мышам вводили внутривенно 0,9% NaCl раствор 50 мг/кг цистамина после рентгеновского облучения в дозе 6,5 Гр.

На Рисунке 47 представлены 30-дневные кривые выживаемости Каплана-Майера для различных групп применения HTLP. Затененные области вокруг кривых указывают на доверительные интервалы. Анализ выживаемости показывает, что группы, с введением HTLP, демонстрируют более высокую выживаемость по сравнению как с контрольной группой, так и с группой, с введением цистамина, что предполагает значительный радиозащитный эффект HTLP при облучении, независимо от типа облучения (протонное или рентгеновское), поскольку цистамин является широко известным радиопротектором.

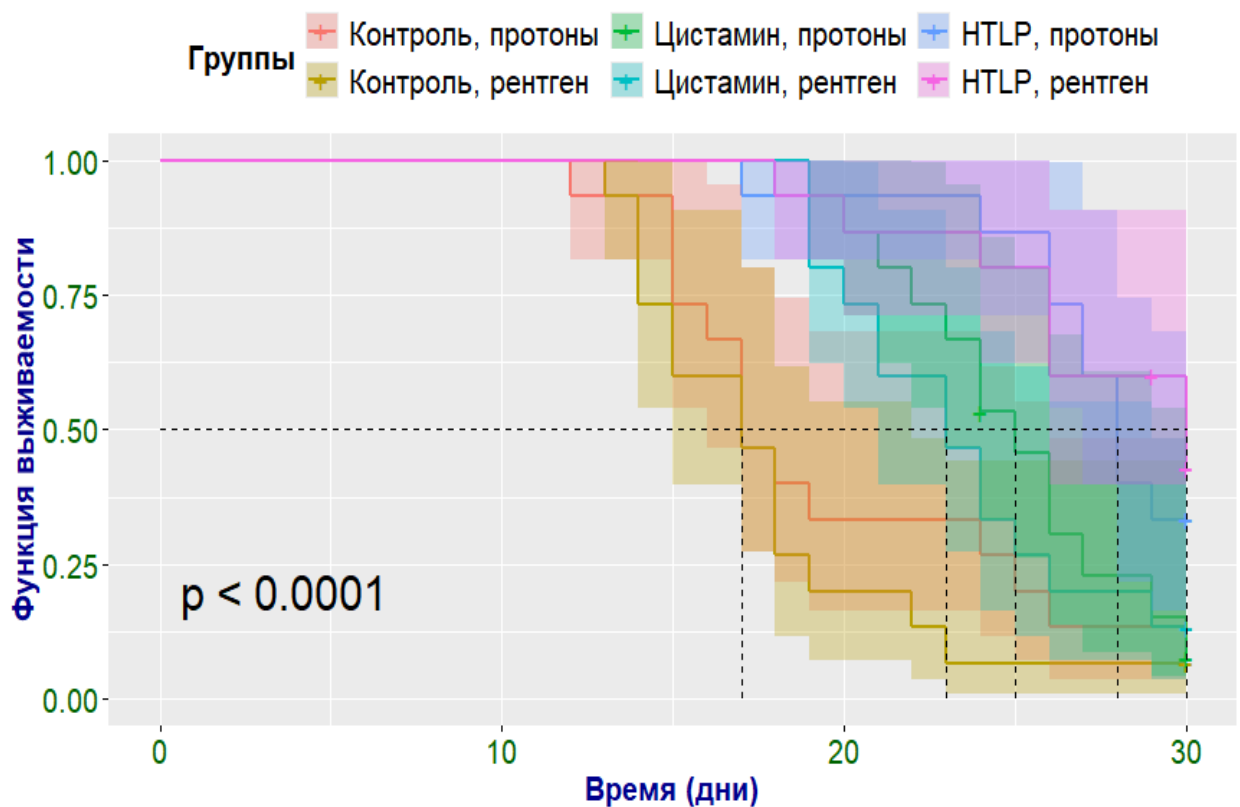


Рисунок 47. Кривые выживания Каплана-Майера для 30-дневной смертности мышей штамма SHK. Каждая кривая демонстрирует влияние различных методов лечения на выживаемость после облучения, при этом медианное время выживания отмечено пунктирной линией. По оси ординат – функция выживаемости, по оси абсцисс – дни [Kaplan E.L. and Meier P., 1958]. Статистическая значимость различий между группами оценивается с помощью логарифмического рангового теста, подчеркивающего значимые различия в результатах выживания со значением $p < 0,0001$.

После этого была проведена оценка пропорциональных рисков с использованием регрессии Кокса [Cox D.R. and Oakes D., 1984], чтобы определить вероятность выживания животных на основе различных параметров: терапия, вес животного и тип облучения. На Рисунке 48 представлен форест-плот с вышеупомянутыми параметрами. Этот анализ

использует log-ранговый тест для статистической значимости и включает информационный критерий Акаике (AIC) для оценки соответствия модели [Akaike H., 1974].

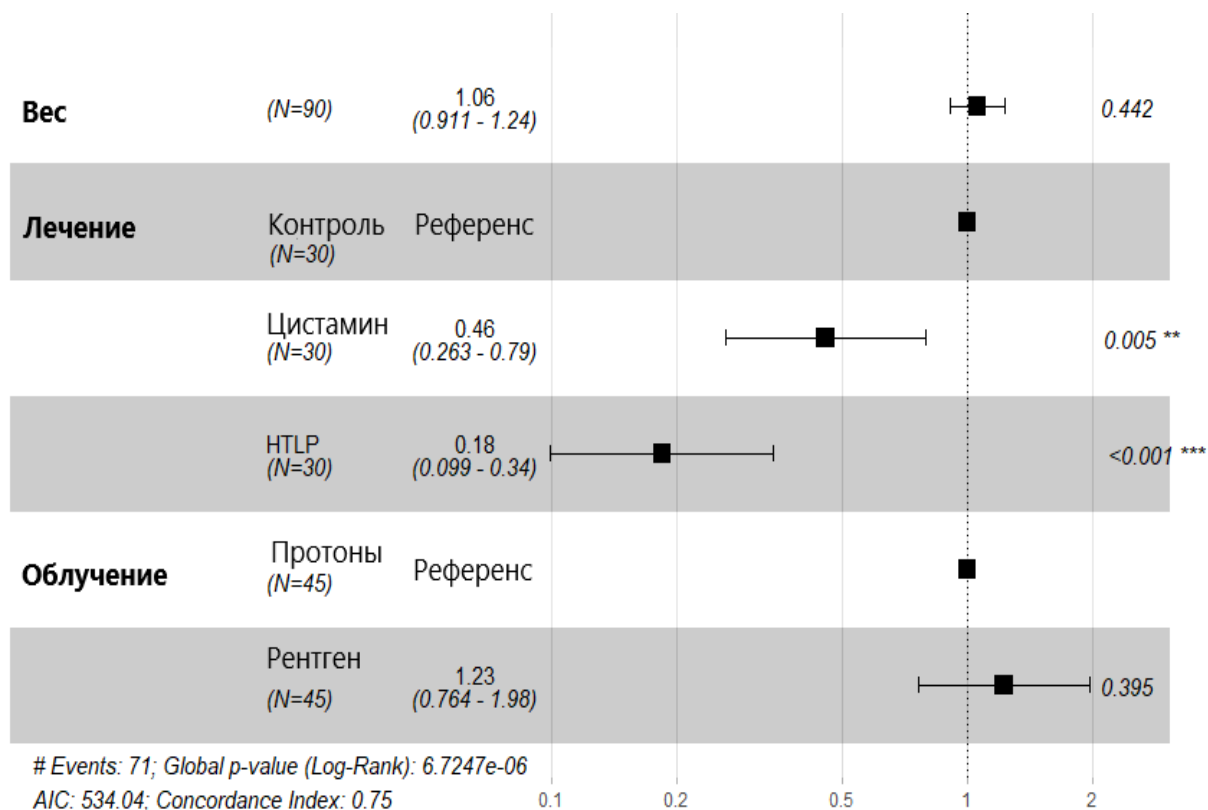


Рисунок 48. Форест-плот пропорциональных коэффициентов риска Кокса. График демонстрирует влияние различных факторов на коэффициент риска [Collins G.S. et al., 2015].

Данные анализа свидетельствуют о том, что введение HTLP приводит к значительному снижению риска по сравнению с контролем, что указывает на защитный эффект полисахарида при облучении. Типы облучения, в частности протонное и рентгеновское, значительно повышают коэффициент риска негативного исхода по сравнению с фоновым излучением. Таким образом, можно сделать вывод, что использование полисахарида увеличивает вероятность выживания животных при ионизирующем воздействии рентгеновских лучей и протонов.

3.2.6.2. Микроядерный тест

Микроядерный тест проводили, по методу Шмида, с небольшими модификациями [Schmid W., 1975; Generalov E.A. et al., 2013]. Цитогенетические повреждения оценивали

путем подсчета количества полихроматических эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами (МЯ). На каждом предметном стекле анализировали не менее 2000 ПХЭ. Суспензию клеток костного мозга в сыворотке эмбриона крупного рогатого скота наносили по 50 мкл на предметные стекла и делали мазки (подсчет производился вручную). Готовили по два мазка на каждую мышь. После высушивания на воздухе предметные стекла фиксировали, снова высушивали и окрашивали красителем Гимза по Романовскому в течение 30 мин. Используя микроскоп Leica DMI 6000B (Leica Microsystems, Германия) с иммерсионным объективом 100x в проходящем свете, оценивали процент ПХЭ с МЯ в костном мозге. В каждой экспериментальной точке участвовало не менее пяти мышей.

Для оценки радиозащитной эффективности НТЛР изучалось количество цитогенетических повреждений в клетках костного мозга после воздействия рентгеновских лучей или высокоэнергетических протонов. Микроядерный тест служит надежной моделью генотоксических эффектов радиации, признанной для оценки рисков воздействия радиации среди людей в зонах с высокой радиацией, а также для мониторинга во время космических миссий и сеансов радиотерапии [Akhmadullina Y.R. et al., 2020; Ахмадуллина Ю.Р., 2021].

На Рисунке 49 показано, что введение НТЛР животным значительно сокращает количество микроядер по сравнению с контрольной группой после облучения в дозе 1,5 Гр. Такой наблюдаемый эффект дополнительно подтверждает потенциальные радиозащитные свойства НТЛР при радиационных повреждениях хромосом.

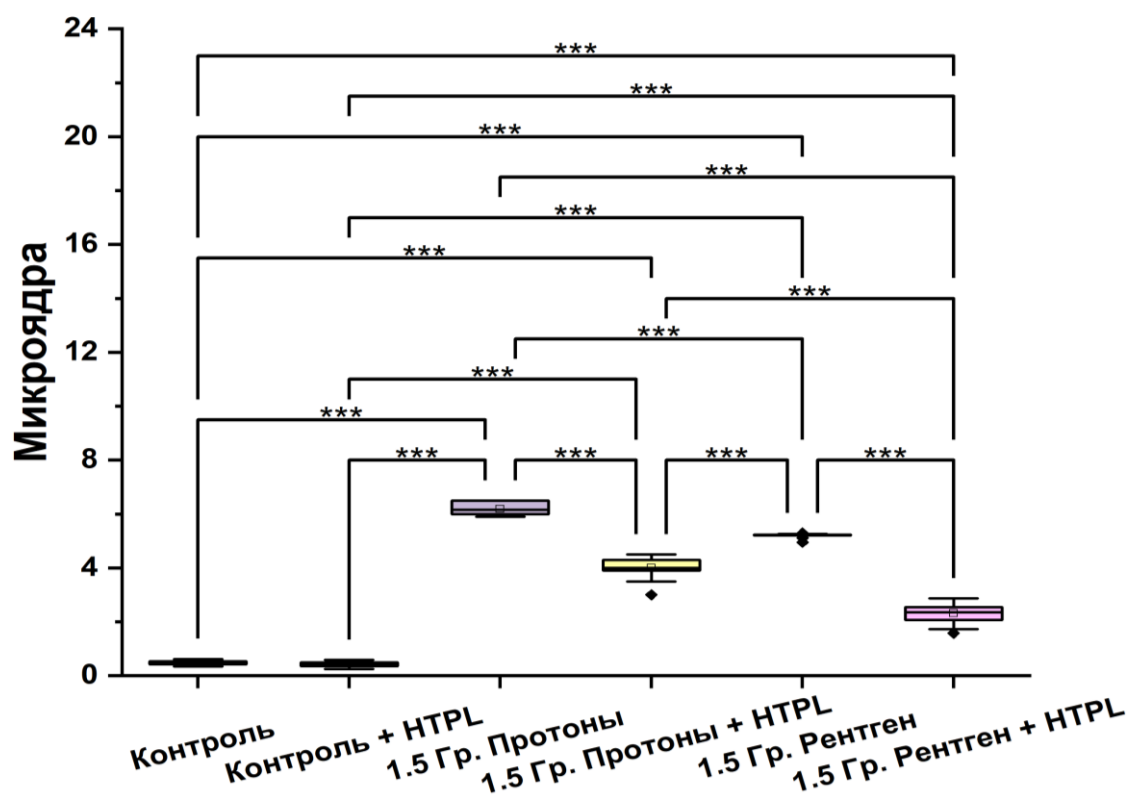


Рисунок 49. Результаты статистического анализа данных микроядерного теста ($n \geq 5$), (***) $p < 0,01$).

В случае необлученных животных НТЛР не обладает генотоксическими свойствами и не вызывает дополнительных хромосомных aberrаций. Контрольная группа с введением физиологического раствора статистически не отличается от контрольной группы с введением НТЛР при отсутствии облучения. В свою очередь, это означает, что НТЛР снижает радиационную нагрузку на хромосомы. Это говорит о том, что НТЛР действует эффективно как радиопротектор, защищая от повреждений ДНК, не вызывая дополнительных цитогенетических аномалий в группе лечения.

3.2.6.3. Выживаемость при 8,0 и 8,5 Гр

Опыты проводили на мышах-самцах линии BALB/c массой 20–25 г. Лабораторных животных подвергали γ -лучевому воздействию в дозах 8,0 и 8,5 Гр (^{137}Cs). Облучение проводили на установке «ИГУР», (ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ, Обнинск; ИТЭБ РАН, Пущино.), как описано в статье [Попучиев В.В. и др., 2014; Генералов Е.А., 2014, 2015].

Были сформированы следующие группы для 8,0 Гр и для 8,5 Гр:

1 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 1 мкг/мышь за 1 час до облучения; 2 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 10 мкг/мышь за 1 час до облучения; 3 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 100 мкг/мышь за 1 час до облучения; 4 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 1 мкг/мышь через 3 часа после облучения; 5 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 10 мкг/мышь через 3 часа после облучения; 6 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 100 мкг/мышь через 3 часа после облучения; 7 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 1 мкг/мышь через 6 часов после облучения; 8 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 10 мкг/мышь через 6 часов после облучения; 9 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 100 мкг/мышь через 6 часов после облучения; 10 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 1 мкг/мышь через 24 часа после облучения; 11 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 10 мкг/мышь через 24 часа после облучения; 12 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 100 мкг/мышь через 24 часа после облучения; 13 – контрольная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl за 1 час, через 3, 6 и 24 часа после облучения.

За экспериментальными животными наблюдали в течение месяца после облучения, регистрируя изменения в поведении, внешнем виде и состоянии.

Внутривенное введение НТЛР оказывает положительное влияние на выживаемость лабораторных животных при летальном (8,0 Гр) и сверхлетальном (8,5 Гр) облучении. Результаты представлены на Рисунках 50 и 51. Важно отметить, что положительный эффект наблюдался как в профилактической (за 1 час), так и в терапевтической (через 1, 6 и 24 часа) схеме введения полисахарида НТЛР.

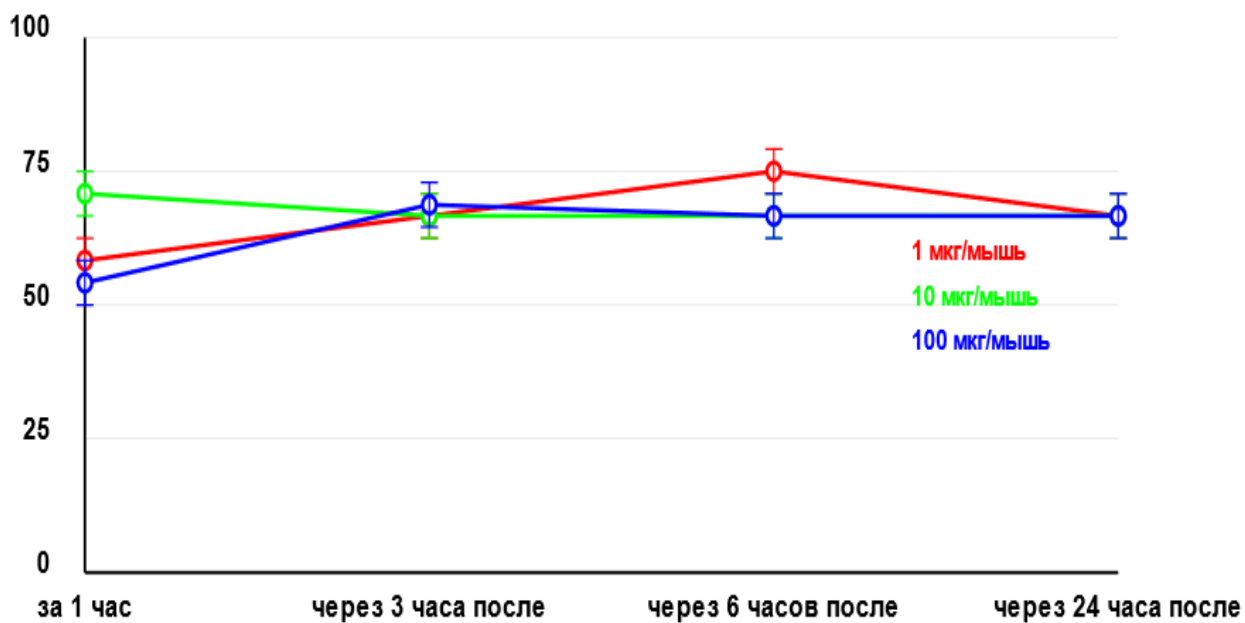


Рисунок 50. Выживаемость мышей при облучении в дозе 8,0 Гр при разных дозах и времени введения HTLP. По оси ординат – выживаемость, по оси абсцисс – времена введения до или после облучения. Выживаемость в контрольной группе составила 20%.

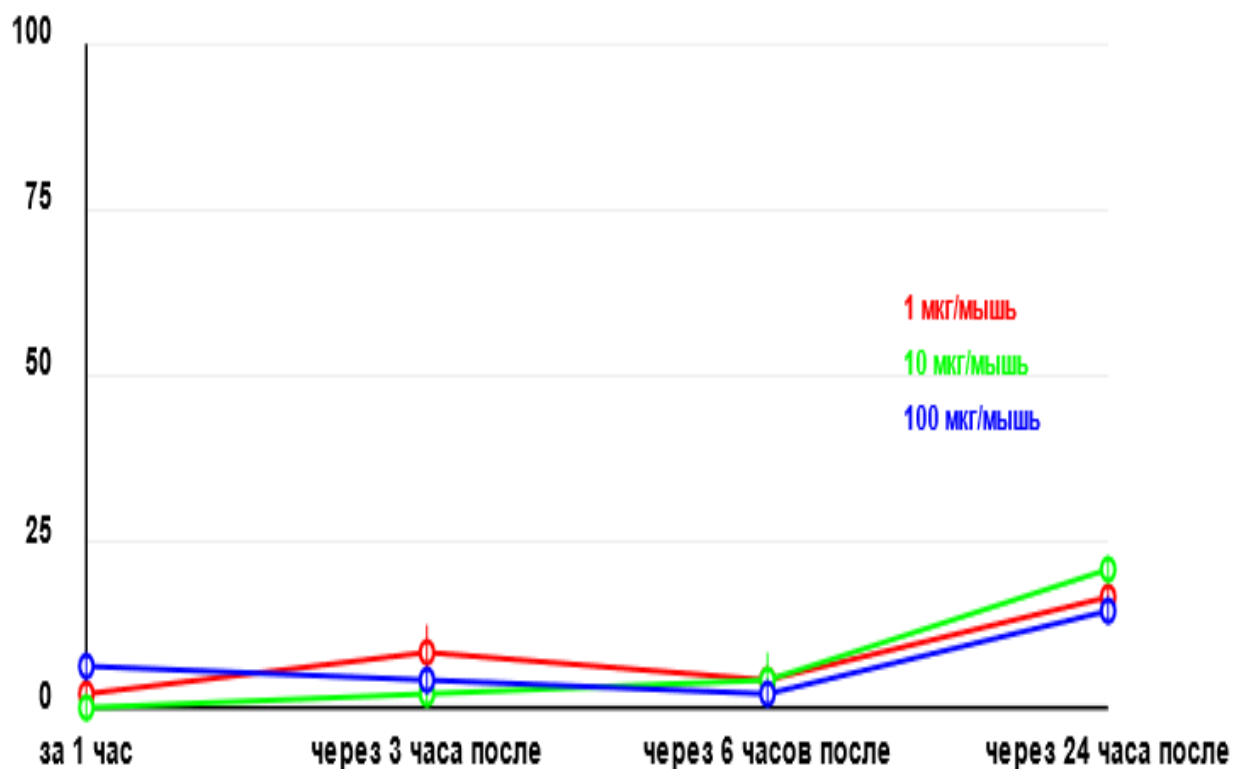


Рисунок 51. Выживаемость мышей при облучении в дозе 8,5 Гр при разных дозах и времени введения HTLP. По оси ординат – выживаемость, по оси абсцисс – времена введения. Выживаемость в контрольной группе составила – 0%.

Максимальную выживаемость ($95\pm 5\%$) регистрировали в группе мышей, облученных 8,0 Гр, при введении HTLP в дозе 100 мкг/мышь через шесть часов после облучения, к 24 ч выживаемость стабилизируется на уровне $80\pm 5\%$ для всех доз. Выживаемость в этой группе была примерно в 4,8 раза больше, чем в контрольной группе. Минимальная выживаемость в экспериментальной группе с введением HTLP составила 65%, что примерно в 3,3 раза больше значений в контрольной группе. При облучении животных сверхлетальной дозой в 8,5 Гр общая выживаемость ожидаемо резко снижалась. Так, например, самый высокий показатель выживаемости составил 40% в группе с введением HTLP в дозе 10 мкг/мышь через 24 часа после облучения. Все дозы препарата показывают тенденцию к увеличению выживаемости к 24 ч.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии у HTLP радиопротекторных свойств, что соотносится с предыдущими данными. Данные экспериментов по изучению биологической активности HTLP позволяют предположить наличие широкого терапевтического диапазона у исследуемого вещества.

Одним из ограничений использования гипоксантов в качестве радиопротекторных средств является узкий временной диапазон эффективного введения. Так, например, введение мексамина необходимо произвести за 30–40 минут до предполагаемого облучения. В случае с HTLP такое ограничение отсутствует, что подтверждается наличием биологической активности как при профилактическом, так и терапевтическом введении, вплоть до суток после облучения.

3.2.6.4. Оценка количества гемоцитобластов

Для оценки количества плюрипотентных клеток использовали мышей линии F₁(CBA×C₅₇B1/6) массой 20–27 г. Облучали гамма-излучением (⁶⁰Co) в дозе 6 Гр на аппарате «Луч» (ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ, Обнинск). За мышами наблюдали неделю, на 8-ой день проводили гуманную эвтаназию. Для анализа количества колониобразующих единиц спленоцитов (КОЕ-С) у мышей извлекали селезенки и анализировали по ранее описанному методу [Мурзина Е.В. и др., 2023].

Были сформированы следующие группы: 1 – контрольная, облученные животные; 2 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с HTLP в дозе 10 мкг/мышь за 3 ч до облучения; 3 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с HTLP в дозе 10 мкг/мышь за 1 ч до облучения; 4 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с HTLP в дозе 10 мкг/мышь через 1 ч

после облучения; 5 – экспериментальная: вводили внутривенно стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 10 мкг/мышь через 24 ч после облучения.

Именно гемопоэтические плюрипотентные клетки являются предшественниками клеток крови, снижение числа которых приводит ко многим патологическим состояниям, а в случае критического снижения к летальным исходам. При лучевой болезни одним из механизмов летальности является нарушение пролиферации и дифференцировки плюрипотентных клеток, снижение их числа и, как следствие, числа клеток крови. Одним из способов повышения резистентности организма к лучевому воздействию является использование различных стимуляторов гемопоэза (эритропоэтин, дарбэпоэтин, лейкостим и др.). В данном случае была обнаружена биологическая активность полисахарида по влиянию в качестве митогена на плюрипотентные клетки, что соотносится с митогенной активностью, обнаруженной методом Ерне, и косвенно подтверждается данными по изменению массы селезенки мышей (Рисунок 52).

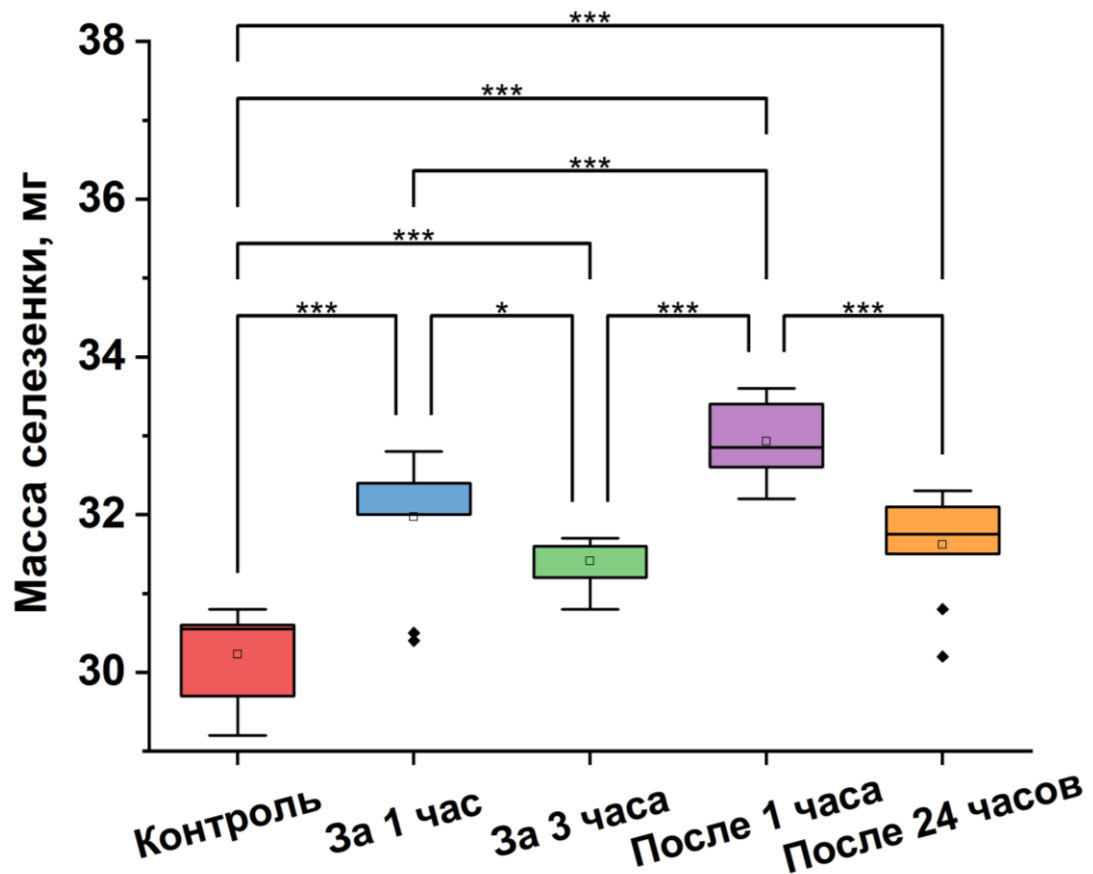


Рисунок 52. Изменения массы селезенки мышей в различных группах при облучении, (* $p<0,05$, *** $p<0,001$).

При лучевом воздействии на мышей введение НТЛР позволяет не только повысить общую выживаемость подопытных, но и увеличить число гемопоэтических клеток КОЕ-С на 8-е сутки после облучения (Рисунок 53).

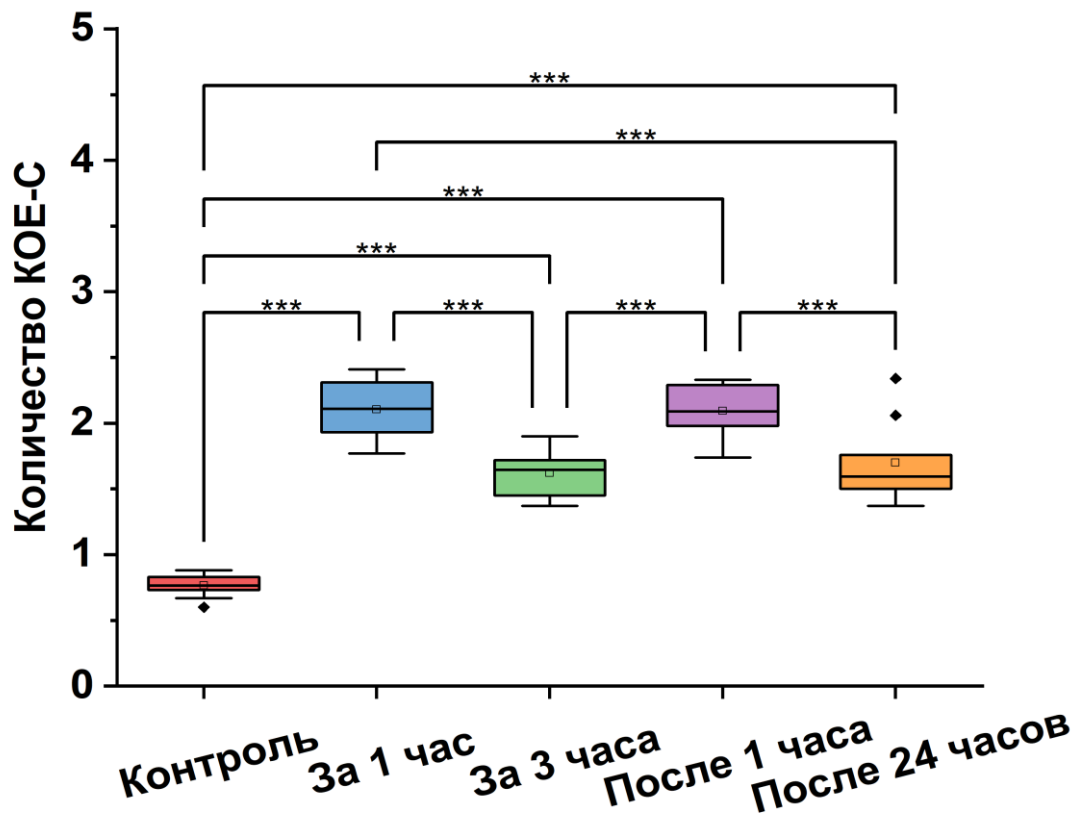


Рисунок 53. Результаты опыта по тесту количества гемопоэтических стволовых клеток, (***) $p < 0,001$.

После внутривенного введения НТЛР наблюдается рост количества КОЕ-С в 2,0–2,3 раза в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$), что дополнительно подтверждает наличие у полисахарида радиопротекторных свойств.

Радиозащитные свойства полисахарида, вероятно, обусловлены несколькими основными механизмами. В первую очередь, стимуляция пролиферации плюрипотентных клеток играет решающую роль в увеличении числа циркулирующих клеток, что необходимо для поддержания клеточности костного мозга. Это поддержание жизненно важно для повышения общей выживаемости организма после воздействия радиации. Кроме того, полисахарид взаимодействует с рецепторами TLR и Dectin-1 (показано ниже), что приводит к модуляции уровней цитокинов. В частности, снижение уровней IL-1 может облегчить воспаление в поврежденных тканях, в то время как стимуляция IL-6 может

усилить регенеративные способности организма, что показано в нескольких работах [Galun E., Rose-John S., 2013; Kummer K.K. et al., 2021]. Эта стимуляция не только способствует деградации метаболитов, образующихся в результате ионизирующего излучения [Marasco M.R. et al., 2018], но и смягчает окислительный стресс посредством активации транскрипционного фактора Nrf2 [Matsuoka Y. et al., 2016]. Кроме того, активируя сигнальный путь Akt, полисахарид снижает уровень гексокиназы-2, тем самым усиливая митохондриальный гликолиз и минимизируя потенциальный ущерб. Наконец, влияние полисахарида на клеточную метаболическую активность, как показано в МТТ-тесте, предполагает его регуляторное воздействие на оксигеназы, пероксидазы и другие ферменты, которые контролируют как уровень перекисного окисления, так и выработку активных форм кислорода после воздействия ионизирующего излучения.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что иммуномодулирующие свойства HTLP, обусловленные его структурой, могут быть использованы в биомедицинских целях для поддержания клеточности крови, в качестве химио- и радиоадъюванта.

3.2.7. Биобезопасность

3.2.7.1. RAW 264.7 виталити-тест

Для оценки цитотоксического действия STP и HTLP были проведены как анализы жизнеспособности, так и анализы МТТ-редуктазы в макрофагальной клеточной линии клетках RAW 264.7 (лейкемия макрофагов мыши).

Рисунок 54 иллюстрирует результаты теста жизнеспособности на клетках RAW 264.7, которые не показали существенных различий между контрольной группой и клетками, обработанными растворами STP и HTLP.

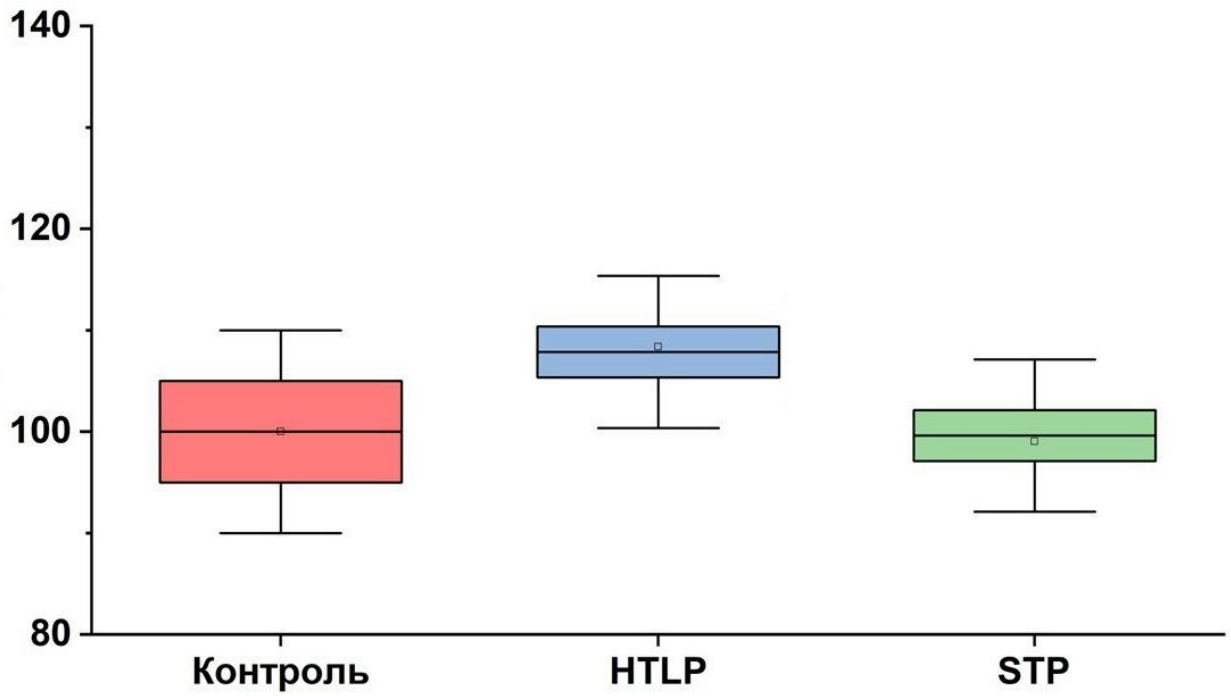


Рисунок 54. RAW 264.7 виталити-тест STP и HTLP. По оси ординат – процент живых клеток, по оси абсцисс – группа.

3.2.7.2. МТТ-тест

МТТ-тест (Рисунок 55) показал повышенную жизнеспособность клеток (мера метаболической активности, которая часто коррелирует с пролиферативной способностью [Karakaş et al. 2017], обработанных HTLP и сравнимую с контролем для STP.

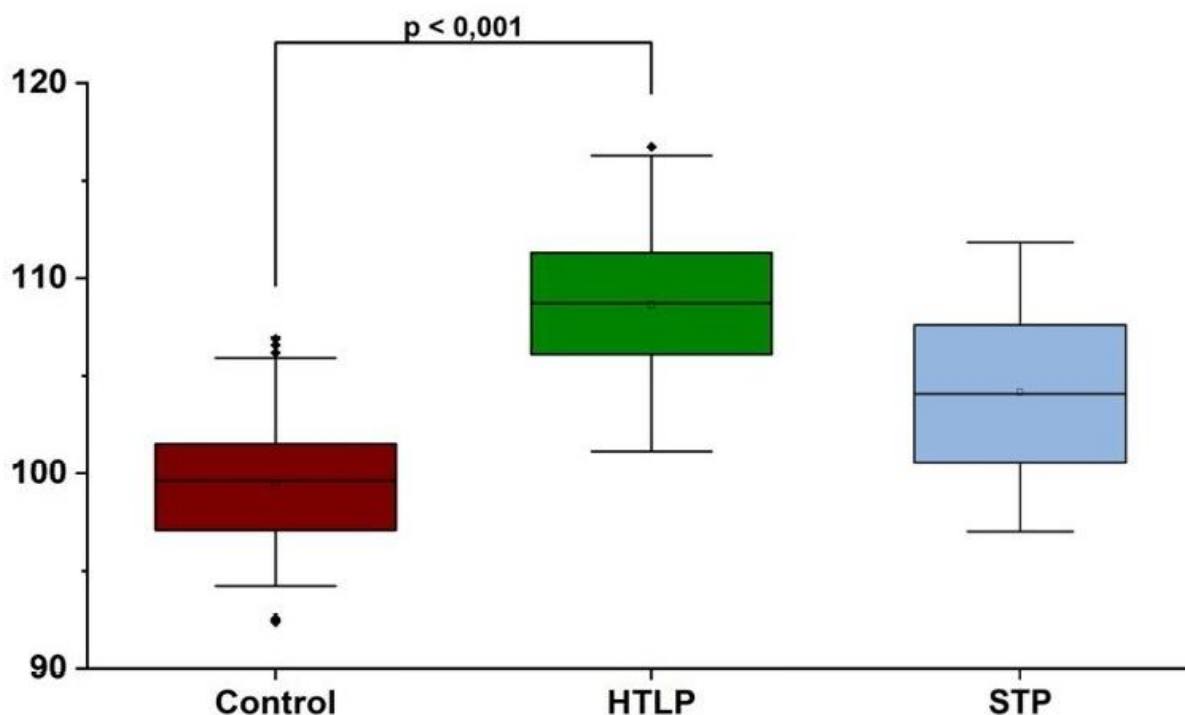


Рисунок 55. МТТ-тест STP и HTLP.

По результатам МТТ- и виталити-теста на цитотоксичность можно сделать вывод, что ни STP, ни HTLP не оказывают токсического воздействия на клеточную культуру. Более того, результаты анализа активности МТТ-редуктазы показывают, что HTLP может усиливать метаболическую активность клеток. Этот эффект, вероятно, опосредован активацией НАДФН-зависимых оксидоредуктаз. По оси ординат – процент живых клеток, по оси абсцисс – группа.

3.2.7.3. Анафилактогенная активность

В ходе исследования не было обнаружено анафилактогенной активности у раствора STP в концентрациях 2,8 и 28,0 мкг/животное и раствора HTLP в концентрациях 0,56 и 5,6 мкг/животное. Исследованные вещества при внутривенном введении не вызывают развития анафилактического шока у подопытных животных ни на 14-й, ни на 21-ый день.

3.2.7.4. Аллергизирующая активность

При оценке аллергизирующей активности HTLP на массу и клеточность подколенного лимфоузла у мышей F₁(СВАхС₅₇В1/6) в соответствии с методикой PLNA («popliteal lymph node assay») были получены результаты, представленные на Рисунке 56.

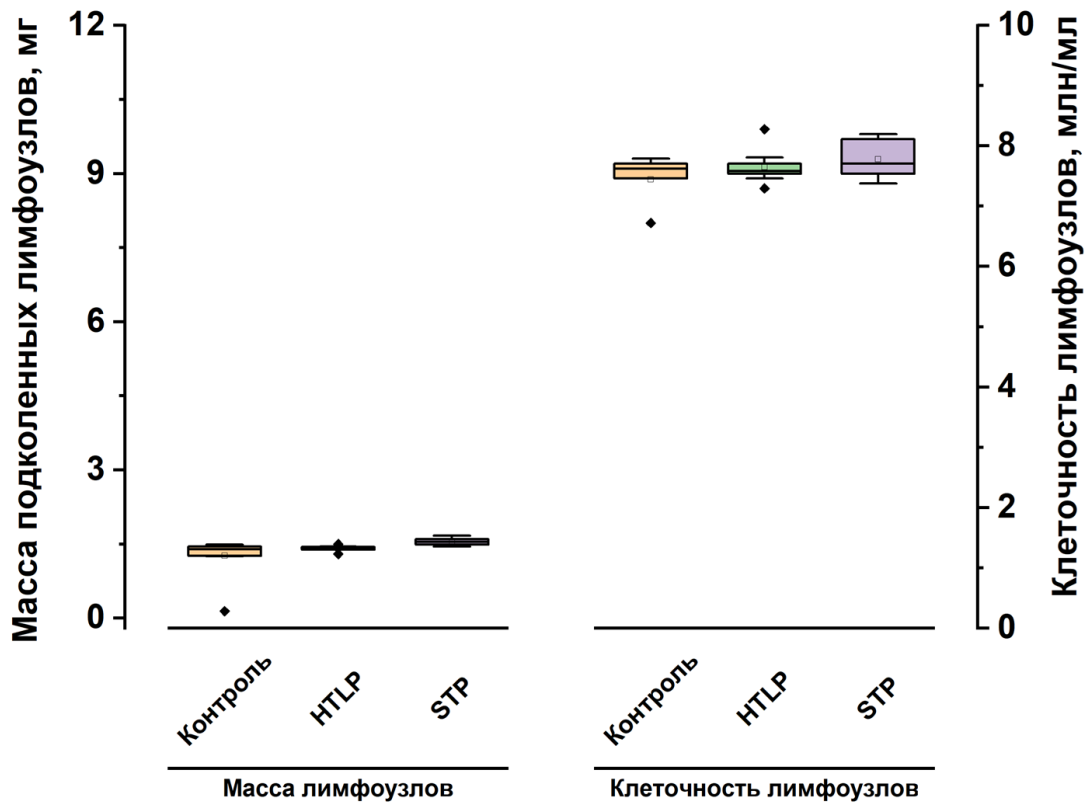


Рисунок 56. Влияние STP и HTLP на массу и клеточность подколенных лимфоузлов.

Из результатов исследования следует, что ни STP, ни HTLP не обладают аллергизирующей активностью.

3.2.7.5. Острая и субхроническая токсичность

На протяжении всего периода наблюдения в группах с применением препарата HTLP или STP не обнаружено изменений в приросте массы тела крыс, температуры тела, давления или других параметров относительно контрольной группы. В качестве примера, ниже приводятся данные по общему анализу крови (Таблица 10) и миелограмме

(Таблица 11), как наиболее интегральные показатели состояния подопытных самок (f) и самцов (m).

Таблица 10. Влияние STP и HTLP на показатели общего анализа крови ($M \pm SEM$).

Срок	Контроль		СТР				НТЛР			
			0,043 мг/кг		0,43 мг/кг		0,1 мг/кг		0,5 мг/кг	
	м	ф	м	ф	м	ф	м	ф	м	ф
Гемоглобин, г/л										
Контроль	143,4 ± 2,47	144,4 ± 2,19	143,5 ± 2,44	143,4 ± 2,12	144,1 ± 2,25	143,8 ± 2,18	144,7 ± 1,80	143,1 ± 1,92	144,4 ± 1,91	143,7 ± 1,75
1 мес	144,8 ± 1,59	144,3 ± 2,37	143,4 ± 1,53	143,3 ± 1,83	143,6 ± 1,96	143,3 ± 2,27	144,8 ± 2,17	143,1 ± 1,86	143,8 ± 2,13	144,8 ± 2,02
1,5 мес	143,6 ± 1,59	143,1 ± 2,02	143,5 ± 2,46	143,1 ± 1,57	144,3 ± 2,32	144,5 ± 1,54	144,4 ± 1,71	143,0 ± 2,27	144,0 ± 2,47	144,0 ± 2,38
Эритроциты, x10 ¹² /л										
Контроль	7,47 ± 0,28	7,39 ± 0,21	7,47 ± 0,24	7,36 ± 0,22	7,42 ± 0,23	7,59 ± 0,24	7,52 ± 0,29	7,38 ± 0,26	7,55 ± 0,20	7,44 ± 0,29
1 мес	7,32 ± 0,24	7,57 ± 0,24	7,56 ± 0,28	7,35 ± 0,21	7,48 ± 0,29	7,56 ± 0,22	7,57 ± 0,23	7,55 ± 0,21	7,34 ± 0,20	7,54 ± 0,27
1,5 мес	7,48 ± 0,21	7,56 ± 0,22	7,37 ± 0,29	7,59 ± 0,21	7,47 ± 0,20	7,33 ± 0,24	7,38 ± 0,24	7,35 ± 0,24	7,58 ± 0,20	7,37 ± 0,28
Лейкоциты, x10 ⁹ /л										
Контроль	13,14 ± 0,56	12,94 ± 0,60	12,61 ± 0,66	12,80 ± 0,54	12,21 ± 0,61	12,41 ± 0,78	12,62 ± 0,71	12,21 ± 0,53	12,50 ± 0,78	12,84 ± 0,72
1 мес	12,92 ± 0,78	12,34 ± 0,54	12,83 ± 0,51	12,69 ± 0,65	12,46 ± 0,72	12,77 ± 0,60	12,16 ± 0,70	13,19 ± 0,52	12,47 ± 0,69	12,15 ± 0,56
1,5 мес	12,32 ± 0,56	12,62 ± 0,65	12,72 ± 0,74	12,79 ± 0,51	12,22 ± 0,68	12,71 ± 0,75	12,64 ± 0,70	12,24 ± 0,65	12,63 ± 0,52	12,48 ± 0,60
Тромбоциты, x10 ⁹ /л										

Сроки	Контроль		STP				HTLP			
			0,043 мг/кг		0,43 мг/кг		0,1 мг/кг		0,5 мг/кг	
	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
Контроль	775,5 ± 21,0	750,8 ± 25,4	770,7 ± 25,8	740,2 ± 25,4	773,9 ± 27,0	771,6 ± 29,3	762,0 ± 23,0	748,2 ± 29,5	763,4 ± 20,9	756,4 ± 28,6
1 мес	741,8 ± 22,3	763,6 ± 23,3	761,4 ± 26,4	747,3 ± 22,2	764,6 ± 25,5	770,7 ± 22,8	750,4 ± 29,3	754,3 ± 25,8	765,5 ± 24,5	779,2 ± 27,7
1,5 мес	758,9 ± 22,0	760,4 ± 22,1	745,9 ± 24,2	759,7 ± 26,3	751,6 ± 26,3	748,9 ± 22,8	779,5 ± 28,5	753,1 ± 23,6	762,7 ± 24,7	768,3 ± 20,8
СОЭ, мм/ч										
Контроль	1,70 ± 0,23	1,50 ± 0,26	1,55 ± 0,29	1,65 ± 0,26	1,75 ± 0,22	1,55 ± 0,28	1,70 ± 0,26	1,65 ± 0,25	1,60 ± 0,26	1,60 ± 0,29
1 мес	1,70 ± 0,29	1,65 ± 0,28	1,70 ± 0,21	1,75 ± 0,29	1,65 ± 0,25	1,60 ± 0,22	1,65 ± 0,23	1,55 ± 0,22	1,65 ± 0,23	1,65 ± 0,26
1,5 мес	1,65 ± 0,25	1,65 ± 0,22	1,75 ± 0,25	1,70 ± 0,28	1,55 ± 0,23	1,75 ± 0,23	1,75 ± 0,20	1,60 ± 0,20	1,60 ± 0,22	1,60 ± 0,28
Палочкоядерные нейтрофилы, %										
Контроль	0,55 ± 0,19	0,70 ± 0,14	0,55 ± 0,18	0,70 ± 0,12	0,65 ± 0,13	0,60 ± 0,15	0,75 ± 0,13	0,70 ± 0,14	0,65 ± 0,19	0,70 ± 0,15
1 мес	0,75 ± 0,14	0,70 ± 0,18	0,70 ± 0,15	0,65 ± 0,12	0,50 ± 0,14	0,55 ± 0,18	0,70 ± 0,16	0,70 ± 0,13	0,50 ± 0,18	0,55 ± 0,12
1,5 мес	0,60 ± 0,18	0,55 ± 0,14	0,70 ± 0,13	0,65 ± 0,19	0,60 ± 0,12	0,75 ± 0,18	0,70 ± 0,12	0,65 ± 0,16	0,60 ± 0,15	0,55 ± 0,13
Сегментоядерные нейтрофилы, %										
Контроль	20,35 ± 0,96	20,75 ± 1,00	20,60 ± 1,04	21,45 ± 1,11	20,40 ± 1,44	20,00 ± 1,07	21,15 ± 1,08	19,85 ± 1,38	20,15 ± 0,92	21,85 ± 1,16
1 мес	20,80 ± 1,45	21,75 ± 1,12	19,90 ± 1,44	21,35 ± 1,45	21,25 ± 1,12	20,20 ± 1,18	21,70 ± 0,99	20,00 ± 0,97	21,00 ± 0,91	21,25 ± 1,37
1,5 мес	20,70 ± 0,90	20,35 ± 1,42	21,15 ± 1,37	21,60 ± 0,94	20,90 ± 0,97	19,55 ± 1,10	21,70 ± 0,92	21,90 ± 1,38	21,20 ± 0,95	20,25 ± 1,32

Сроки	Контроль		STP				HTLP			
			0,043 мг/кг		0,43 мг/кг		0,1 мг/кг		0,5 мг/кг	
	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
Базофилы, %										
Контроль	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 мес	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,5 мес	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Эозинофилы, %										
Контроль	1,90 ± 0,41	1,85 ± 0,35	1,90 ± 0,41	1,85 ± 0,34	1,95 ± 0,42	1,95 ± 0,33	1,90 ± 0,30	1,95 ± 0,40	1,95 ± 0,35	1,95 ± 0,36
1 мес	1,90 ± 0,33	1,85 ± 0,38	1,90 ± 0,31	1,85 ± 0,41	1,95 ± 0,34	1,85 ± 0,39	1,90 ± 0,32	1,85 ± 0,32	1,95 ± 0,32	1,85 ± 0,36
1,5 мес	1,95 ± 0,39	1,90 ± 0,38	1,95 ± 0,31	1,90 ± 0,39	1,85 ± 0,36	1,90 ± 0,30	1,95 ± 0,44	1,90 ± 0,31	1,90 ± 0,41	1,90 ± 0,44
Моноциты, %										
Контроль	2,85 ± 0,44	2,90 ± 0,38	2,85 ± 0,44	2,90 ± 0,43	2,85 ± 0,32	2,90 ± 0,37	2,95 ± 0,42	2,90 ± 0,47	2,85 ± 0,30	2,85 ± 0,28
1 мес	2,80 ± 0,32	2,90 ± 0,20	2,95 ± 0,30	2,90 ± 0,25	2,95 ± 0,43	2,85 ± 0,47	2,80 ± 0,36	2,80 ± 0,32	2,80 ± 0,27	2,80 ± 0,27
1,5 мес	2,95 ± 0,29	2,90 ± 0,33	2,90 ± 0,45	2,85 ± 0,44	2,80 ± 0,39	2,95 ± 0,24	2,80 ± 0,46	2,95 ± 0,41	2,80 ± 0,37	2,95 ± 0,36
Лимфоциты, %										
Контроль	73,00 ± 1,22	73,75 ± 1,42	74,80 ± 1,11	74,45 ± 1,15	73,00 ± 1,28	73,45 ± 1,00	74,85 ± 1,26	73,20 ± 1,46	73,45 ± 1,39	74,35 ± 1,14
1 мес	74,25 ± 1,11	74,25 ± 1,27	74,55 ± 1,29	74,75 ± 1,21	74,55 ± 1,22	73,10 ± 1,45	74,85 ± 1,30	73,80 ± 1,37	73,90 ± 1,24	73,10 ± 1,19

Сро ки	Контроль		STP				HTLP			
			0,043 мг/кг		0,43 мг/кг		0,1 мг/кг		0,5 мг/кг	
	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
1,5 мес	74,80 ± 1,28	73,80 ± 1,24	73,00 ± 1,09	73,15 ± 1,23	73,55 ± 1,10	74,85 ± 1,19	73,80 ± 1,38	74,25 ± 1,33	73,00 ± 1,17	73,00 ± 1,04

Таблица 11. Влияние STP и HTLP на миелограмму крыс (M ± SEM).

Сроки	Контроль		STP				HTLP			
			0,043 мг/кг		0,43 мг/кг		0,1 мг/кг		0,5 мг/кг	
	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
Количество клеток, 10 ⁶										
1 мес	21,0 ± 1,5	21,7 ± 2,4	20,4 ± 1,8	20,3 ± 1,6	20,2 ± 1,5	20,6 ± 2,0	21,5 ± 2,2	21,7 ± 1,9	20,7 ± 2,4	21,7 ± 1,9
1,5 мес	21,6 ± 2,4	20,5 ± 1,6	21,1 ± 1,6	21,8 ± 1,5	21,3 ± 2,4	21,9 ± 1,6	20,6 ± 1,6	21,1 ± 2,4	20,5 ± 1,8	20,6 ± 1,6
Недифференцированные бласты, %										
1 мес	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,5 мес	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Проэритробласты, %										
1 мес	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,5 мес	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Эритробласты, %										
1 мес	0,89 ± 0,08	0,84 ± 0,08	0,83 ± 0,07	0,80 ± 0,09	0,81 ± 0,08	0,89 ± 0,08	0,80 ± 0,09	0,84 ± 0,09	0,83 ± 0,09	0,84 ± 0,08

Сроки	Контроль		STP				HTLP			
			0,043 мг/кг		0,43 мг/кг		0,1 мг/кг		0,5 мг/кг	
	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
1,5 мес	0,84		0,85	0,83	0,89	0,83	0,84		0,80	0,82
	±	0,82 ±	±	±	±	±	±	0,80 ±	±	±
	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,07	0,09	0,07	0,07	0,08
Базофильные нормобласты, %										
1 мес	4,75		4,56	4,99	5,03	4,71	4,75		5,09	4,54
	±	5,01 ±	±	±	±	±	±	4,72 ±	±	±
	0,47	0,40	0,44	0,41	0,42	0,42	0,47	0,42	0,45	0,40
1,5 мес	4,90		4,93	4,64	4,60	4,57	4,54		5,01	4,76
	±	5,17 ±	±	±	±	±	±	4,87 ±	±	±
	0,46	0,42	0,44	0,48	0,41	0,45	0,40	0,46	0,40	0,48
Полихроматофильные нормобласты, %										
1 мес	15,47		15,61	15,94	15,51	15,93	15,53		15,78	15,97
	±	15,99 ±	±	±	±	±	±	15,83 ±	±	±
	0,91	0,87	0,64	0,62	0,71	0,69	0,53	0,64	0,91	0,87
1,5 мес	15,17		15,94	15,93	15,60	15,91	15,94		15,26	15,21
	±	15,42 ±	±	±	±	±	±	15,95 ±	±	±
	0,71	0,79	0,91	0,92	0,96	0,94	0,56	0,78	0,76	0,88
Число митозов красной крови, %										
1 мес	0,84		0,80	0,84	0,88	0,88	0,82		0,83	0,86
	±	0,86 ±	±	±	±	±	±	0,88 ±	±	±
	0,07	0,09	0,08	0,08	0,07	0,07	0,07	0,09	0,07	0,07
1,5 мес	0,89		0,81	0,81	0,83	0,81	0,84		0,82	0,80
	±	0,81 ±	±	±	±	±	±	0,85 ±	±	±
	0,07	0,09	0,08	0,09	0,09	0,07	0,08	0,09	0,09	0,07
Миелобласты, %										
1 мес	1,55		1,62	1,60	1,50	1,80	1,82		1,88	1,84
	±	1,61 ±	±	±	±	±	±	1,80 ±	±	±
	0,10	0,12	0,13	0,18	0,12	0,11	0,18	0,12	0,15	0,18
1,5 мес	1,84		1,87	1,55	1,68	1,52	1,72		1,65	1,88
	±	1,65 ±	±	±	±	±	±	1,58 ±	±	±
	0,12	0,10	0,10	0,11	0,16	0,18	0,14	0,15	0,14	0,10

Сроки	Контроль		STP				HTLP			
			0,043 мг/кг		0,43 мг/кг		0,1 мг/кг		0,5 мг/кг	
	м	ф	м	ф	м	ф	м	ф	м	ф
Промиелоциты, %										
1 мес	2,42		2,62	2,58	2,68	2,44	2,45		2,61	2,54
	±	2,51 ±	±	±	±	±	±	2,48 ±	±	±
	0,21	0,20	0,27	0,21	0,20	0,21	0,28	0,27	0,25	0,26
1,5 мес	2,54		2,53	2,52	2,45	2,68	2,58		2,44	2,43
	±	2,66 ±	±	±	±	±	±	2,51 ±	±	±
	0,29	0,22	0,23	0,27	0,21	0,29	0,29	0,25	0,25	0,25
Миелоциты, %										
1 мес	3,64		3,55	3,54	3,68		3,61		3,55	3,62
	±		±	±	±	3,52±	±	3,58 ±	±	±
	0,33	3,55±0,39	0,38	0,38	0,39	0,36	0,39	0,37	0,33	0,34
1,5 мес	3,53		3,52	3,65	3,56	3,62	3,61		3,61	3,60
	±	3,69 ±	±	±	±	±	±		±	±
	0,31	0,35	0,31	0,30	0,37	0,33	0,36	3,62±0,30	0,31	0,39
Метамиелоциты, %										
1 мес	5,62		5,60	5,67	5,55	5,69	5,67		5,57	5,59
	±	5,65 ±	±	±	±	±	±	5,51 ±	±	±
	0,30	0,30	0,39	0,31	0,49	0,35	0,37	0,32	0,43	0,30
1,5 мес	5,55		5,67	5,68	5,53	5,55	5,55		5,66	5,66
	±	5,68 ±	±	±	±	±	±	5,62 ±	±	±
	0,45	0,39	0,35	0,41	0,33	0,45	0,30	0,35	0,37	0,38
Палочкоядерные нейтрофилы, %										
1 мес	14,43		14,24	14,23	14,92	14,98	14,28		14,29	14,35
	±	14,89 ±	±	±	±	±	±	14,38 ±	±	±
	1,03	0,87	1,19	0,72	0,89	1,03	0,85	1,00	0,88	0,66
1,5 мес	14,12		14,18	14,60	14,37	14,24	14,18		14,70	14,43
	±	14,02 ±	±	±	±	±	±	14,05 ±	±	±
	0,75	0,68	1,00	0,69	0,78	1,03	0,71	0,58	0,78	0,79
Сегментоядерные нейтрофилы, %										

[illegible]

Сроки	Контроль		STP				HTLP			
			0,043 мг/кг		0,43 мг/кг		0,1 мг/кг		0,5 мг/кг	
	м	ф	м	ф	м	ф	м	ф	м	ф
1,5 мес	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Лимфоциты, %										
1 мес	21,04		21,12	20,91	20,75	21,34	20,73		21,18	20,82
	±	20,52 ±	±	±	±	±	±	21,27 ±	±	±
	0,83	1,05	0,96	1,05	1,10	0,84	0,90	0,89	0,91	0,89
1,5 мес	21,44		20,95	21,23	20,80	21,34	20,57		21,11	20,55
	±	20,78 ±	±	±	±	±	±	20,98 ±	±	±
	1,00	0,87	0,83	0,80	0,88	1,09	1,14	1,05	0,86	1,10
Плазматические клетки, %										
1 мес	1,55		1,51	1,62	1,68	1,58	1,67		1,56	1,56
	±	1,59 ±	±	±	±	±	±	1,52 ±	±	±
	0,29	0,23	0,21	0,29	0,32	0,34	0,24	0,32	0,24	0,21
1,5 мес	1,57		1,58	1,52	1,59	1,56	1,63		1,57	1,53
	±	1,56 ±	±	±	±	±	±	1,57 ±	±	±
	0,33	0,20	0,23	0,33	0,22	0,27	0,26	0,37	0,37	0,35
Промоноциты, %										
1 мес	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,5 мес	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Моноциты, %										
1 мес	2,69		2,67	2,67	2,52	2,41	2,36		2,61	2,41
	±	2,38 ±	±	±	±	±	±	2,41 ±	±	±
	0,26	0,23	0,21	0,24	0,24	0,27	0,26	0,20	0,21	0,26
1,5 мес	2,68		2,54	2,48	2,48	2,33	2,57		2,42	2,43
	±	2,68 ±	±	±	±	±	±	2,30 ±	±	±
	0,28	0,25	0,29	0,29	0,24	0,22	0,27	0,26	0,23	0,27
Мегакариоциты и мегакариобласты, %										

Сроки	Контроль		STP				HTLP			
			0,043 мг/кг		0,43 мг/кг		0,1 мг/кг		0,5 мг/кг	
	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
1 мес	0,36		0,32	0,32	0,35	0,36	0,37		0,33	0,33
	±	0,36 ±	±	±	±	±	±	0,36 ±	±	±
	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
1,5 мес	0,33		0,36	0,35	0,35	0,35	0,35		0,33	0,35
	±	0,35 ±	±	±	±	±	±	0,35 ±	±	±
	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

При анализе на токсичность было выявлено, что однократное подкожное, внутривенное или внутримышечное введение растворов изучаемых веществ в дозах близких к ЛД₅₀ (2,8–4,5 г/кг для STP, 2,3–4,1 г/кг для HTLP), сопровождалось кратковременным снижением двигательной активности животных, тремором, учащением дыхания и гибелью в течение трех суток после введения. В условиях острого опыта животные переносили все дозировки хорошо, включая 12,5 мг/кг, летальных исходов в группах STP и HTLP не наблюдалось. По результатам пробит-анализа ЛД₁₆ и ЛД₈₄ составили для STP 2,1–3,4 и 3,4–6,0 г/кг, для HTLP 2,0–3,3, 4,7–5,9 г/кг, соответственно, в зависимости от пути введения и вида животных.

3.2.7.6. Мутагенность

В этом исследовании были использованы штаммы *Salmonella typhimurium* TA100/his G46-, rfa-, uvr B-, pkm 101/ и TA 98 /his D-, G3052-, rfa-, uvr B-, pkm 101/. *In vitro* HTLP и STP не оказывают мутагенного действия в тесте Эймса [Миронов А.Н. и др., 2012; Vijay U. et al., 2018; Ajithdoss D.K. et al., 2024]. В процессе биотрансформации и метаболической активации исследуемые вещества не образуют метаболиты с мутагенной активностью и не обладают мутагенным действием.

3.2.7.7. Эмбриотоксичность и тератогенность

В группах с введением STP и HTLP статистически не отличались от контрольных значений следующие показатели: продолжительность беременности, показатели предимплантационной и постимплантационной гибели, количество живых плодов, мест имплантации и желтых тел, масса тел и размеры эмбрионов, что видно в Таблице 12.

Таблица 12. Показатели эмбриотоксического действия при внутрибрюшинном введении крысам STP и HTLP с 1 по 20 сутки беременности ($M \pm SD$).

	Контроль	STP	HTLP
Продолжительность беременности, сутки	$23,1 \pm 0,2$	$23,3 \pm 0,3$	$23,0 \pm 0,4$
Эмбрионов, шт	$6,6 \pm 1,2$	$10,1 \pm 1,9$	$7,7 \pm 1,5$
Мест имплантации, шт	$7,8 \pm 1,2$	$10,6 \pm 2,1$	$8,5 \pm 2,0$
Желтых тел, шт	$10,1 \pm 0,6$	$12,0 \pm 1,7$	$11,4 \pm 1,1$
Предимплантационная гибель, %	19,7	15,3	17,1
Постимплантационная гибель, %	7,7	4,0	5,4
Размер плода, см	$3,2 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,2$
Масса плода, г	$3,0 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,2$

При макроскопическом осмотре и микроанатомическом исследовании плодов, подвергавшихся в пренатальном периоде введению STP и HTLP не выявлено каких-либо уродств или пороков развития внутренних органов.

Введение растворов STP и HTLP не влияет на количество рожденных крысят, динамику массы тела, развитие потомства (открытие глаз, развитие зубов и т.д.), динамику смертности.

Проведенные исследования биобезопасности позволяют утверждать, что и STP, и HTLP безопасны, являются малотоксичными веществами при внутримышечном, внутривенном и подкожном введении. Половых или видовых различий в чувствительности к введению исследованных веществ не наблюдается. Лабораторные животные введение STP и HTLP переносили хорошо. Влияния на общее состояние, поведенческие функции, показатели крови и мочи, состояние внутренних органов, как и признаков интоксикации не наблюдали. Таким образом, исследованные вещества не обладают мутагенностью, эмбриотоксичностью или тератогенностью.

3.2.8. Молекулярные механизмы биологической активности

3.2.8.1. Анализ противовоспалительного действия полисахарида в модели ЛПС-индуцированного воспаления в макрофагоподобных клетках THP-1

Коронавирусная инфекция COVID-19 представляет собой тяжелую острую респираторную инфекцию, вызванную вирусом SARS-CoV-2 [Brosseau L.M. et al., 2022]. Заболевание может проявляться как в виде легкой острой респираторной вирусной инфекции, так и в тяжелой форме, которая может сопровождаться серьезными осложнениями, такими как вирусная пневмония, приводящая к острому респираторному дистресс-синдрому или дыхательной недостаточности с высоким риском летального исхода [Gibson P. et al., 2022].

Приблизительно в 15% случаев COVID-19 протекает в тяжелой форме, требующей кислородной терапии, а в 5% случаев состояние пациентов становится критическим [Kataoka H. et al., 2021]. В тяжелых случаях коронавирусной инфекции наблюдается диффузное повреждение альвеол, что приводит к нарушению целостности их стенок и повышению проницаемости альвеолокапиллярной мембраны. Основным патогенетическим механизмом острого легочного повреждения является пропотевание плазмы и клеток крови в альвеолы и интерстиций легких. Воспалительная инфильтрация носит мультифокальный характер с тенденцией к слиянию, что в конечном итоге приводит к образованию фиброзных рубцов в легочной ткани [Wallace W.A. et al., 2007]. В некоторых случаях на фоне тяжелой формы COVID-19 может развиваться сепсис и вторичная бактериальная инфекция [Naque O.I. et al., 2023], сопровождающаяся гиперцитокинемией [Limmer A. et al., 2023]. Эта неконтролируемая активация цитокинов иммунными клетками в очаге воспаления приводит к высвобождению новых порций цитокинов, что создает порочный круг, способствующий разрушению легочной ткани. По мере прогрессирования гиперцитокинемия может приобретать системный характер, затрагивая весь организм и вызывая полиорганную недостаточность.

Ключевую роль в развитии гиперцитокинемии играют резидентные макрофаги, которые способны быстро реагировать на внешние стимулы, существенно изменяя экспрессию генов. Эта быстрая реакция, наблюдаемая при воспалении или повреждении тканей, называется активацией макрофагов, в результате чего увеличивается выработка ими цитокинов, хемокинов и других медиаторов воспаления, способствующих привлечению новых макрофагов.

В зависимости от типа активирующего патогена и микроокружения, макрофаги могут принимать либо провоспалительный фенотип M1, либо противовоспалительный фенотип M2. M1-макрофаги вырабатывают значительные количества провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, IL-12 и TNF- α , а также оксид азота и активные формы кислорода, что обеспечивает их бактерицидную активность. M2-макрофаги, в свою очередь, продуцируют противовоспалительные цитокины, прежде всего IL-10. M1-макрофаги инициируют Th1-ответ, направленный на уничтожение бактерий, вирусов и опухолевых клеток, тогда как M2-макрофаги активируют Th2-ответ, который борется с внеклеточными паразитами. Кроме того, M2-макрофаги способствуют ремоделированию поврежденных тканей, ангиогенезу и росту опухолей [Li W. et al., 2024]. Клинические исследования выявили значимую корреляцию между тяжестью течения коронавирусной инфекции COVID-19 и уровнем провоспалительных цитокинов в периферической крови, таких как IL-6 и TNF- α , а также с концентрацией LPS. При этом уровень провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α прямо зависит от концентрации LPS [Wang X. et al., 2022]. Для изучения потенциального механизма биологической активности STP была выбрана модель LPS-индуцированного воспаления в макрофагоподобных клетках THP-1.

Культивирование клеток и создание модели воспаления

Клеточная линия

В исследовании использовали клеточную линию THP-1 (моноциты человека), полученную из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Клетки культивировали в среде RPMI-1640, с добавлением 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), 2 mM L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Культуры поддерживали в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при температуре 37°C.

Дифференцировка клеток THP-1

Для дифференцировки моноцитов THP-1 в макрофагоподобные клетки, суспензионные культуры обрабатывали форбол-12-миристан-13-ацетатом (PMA) в концентрации 100 нг/мл в течение 96 часов. После этого среду, содержащую PMA, удаляли, клетки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и оставляли на 24 ч в свежей среде без PMA для восстановления.

Создание модели воспаления и обработка исследуемым веществом

После периода восстановления клетки обрабатывали LPS в концентрации 100 нг/мл для индукции воспалительного ответа. Одновременно с LPS в культуральную среду вносили STP в концентрациях 50, 100 и 200 мкг/мл. Контрольные культуры обрабатывали PBS или только LPS без добавления STP. Клетки инкубировали в присутствии LPS и STP в

течение 24 ч, после чего проводили сбор образцов для дальнейшего анализа экспрессии генов методом количественной ПЦР в реальном времени.

Анализ экспрессии генов методом количественной ПЦР в реальном времени

Разработка праймеров

Для проведения количественной ПЦР в реальном времени были разработаны специфические праймеры с использованием онлайн-инструмента NCBI Primer-BLAST. При проектировании учитывались следующие параметры: длина олигонуклеотидов 18–25 оснований, температура плавления 58–62°C, содержание GC 40–60%, длина амплифицируемого фрагмента 80–150 пар нуклеотидов. Специфичность праймеров была подтверждена с помощью алгоритма BLAST для исключения возможности неспецифической амплификации. Последовательности разработанных праймеров приведены в Таблице 13.

Таблица 13. Праймеры для исследуемых генов для STP

<i>Название</i>	<i>Прямой праймер</i>	<i>Обратный праймер</i>
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTTC
TNF (TNF- α)	CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG	GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
IL1B (IL-1 β)	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTTCGTAGCTGGA
IL-6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
NFKB1	AACAGAGAGGATTTCTGTTTCCG	TTTGACCTGAGGGTAAGACTTCT
IL-10	GACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG	TCACATGCGCCTTGATGTCTG
NRF2	TTCCCGGTCACATCGAGAG	TCCTGTTGCATACCGTCTAAATC
BAX	CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
BCL2	GGTGGGGTCATGTGTGTGG	CGGTTCAGGTAATCAGTCATCC

Экстракция РНК и обратная транскрипция

Выделение суммарной РНК из исследуемых образцов проводили с применением метода фенол-хлороформной экстракции [Zumbo P., 1979], используя коммерческий набор реагентов (Евроген, Россия). Количественную оценку выделенной РНК осуществляли спектрофотометрически при длине волны 260 нм. Синтез комплементарной ДНК (кДНК) проводили с использованием обратной транскриптазы MMLV (Евроген). Реакционная смесь общим объемом 20 мкл содержала 1–2 мкг общей РНК, олиго(dT)-праймеры (20 мкМ), смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (10 мМ), дитиотреитол (20 мМ) и 100 единиц обратной транскриптазы. Реакцию обратной транскрипции проводили при 40°C в течение 45 минут с последующей инактивацией фермента при 70°C в течение 10 минут.

Количественная ПЦР в реальном времени

Полученные образцы кДНК использовали в качестве матрицы для количественной ПЦР в реальном времени. Реакционная смесь включала 3 мкл кДНК, специфические праймеры (10 мкМ каждого) и коммерческую смесь, содержащую SYBR Green и термостабильную ДНК-полимеразу (Евроген). Амплификацию проводили на приборе DTlite (ДНК-Технологии, Россия) по следующей программе: первичная денатурация при 95°C в течение 5 минут, затем 40 циклов, состоящих из денатурации (95°C, 30 секунд), отжига праймеров и элонгации (72°C, 30 секунд).

Анализ данных и контроль качества

Для исключения контаминации геномной ДНК в каждый эксперимент включали отрицательный контроль без добавления обратной транскриптазы. Отсутствие сигнала в этих образцах подтверждало чистоту препаратов РНК. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов определяли с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$. В качестве референсного гена для нормализации данных использовали *GAPDH*, кодирующий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу [Kozera B. and Rapacz M., 2013].

Анализ противовоспалительного действия полисахарида STP проводили с использованием модели LPS-индуцированного воспаления в макрофагоподобных клетках THP-1. Как показано на тепловой карте (Рисунок 57), стимуляция клеток LPS вызвала значительное увеличение экспрессии провоспалительных генов, в частности IL-6 (18,54-кратное увеличение), TNF (15,32-кратное увеличение) и IL1B (11,76-кратное увеличение) по сравнению с контрольной группой. Последующая обработка клеток различными концентрациями STP привела к дозозависимому снижению экспрессии этих провоспалительных генов. При максимальной концентрации STP (200 мкг/мл) наблюдалось наиболее выраженное подавление экспрессии IL-6 (снижение до 5,62-кратного уровня), TNF (до 4,92-кратного уровня) и IL1B (до 3,51-кратного уровня) относительно LPS-стимулированных клеток.

Интересно отметить, что экспрессия противовоспалительного гена IL-10 демонстрировала противоположную тенденцию. Как видно из тепловой карты (Рисунок 57), с увеличением концентрации STP наблюдалось прогрессивное повышение экспрессии IL-10 от 5,15-кратного уровня при LPS-стимуляции до 9,69-кратного уровня при добавлении 200 мкг/мл STP. Это указывает на активацию эндогенных противовоспалительных механизмов под действием исследуемого полисахарида.

Помимо влияния на воспалительные медиаторы, исследование выявило модулирующее действие STP на гены, связанные с окислительным стрессом и апоптозом. В частности, наблюдалось дозозависимое увеличение экспрессии NRF2, ключевого

регулятора антиоксидантного ответа, от 1,46-кратного уровня при LPS-стимуляции до 3,43-кратного уровня при максимальной концентрации STP. Одновременно отмечались изменения в экспрессии генов, регулирующих апоптоз: антиапоптотического BCL2 и проапоптотического BAX. Экспрессия BCL2 дозозависимо возрастала с увеличением концентрации STP (от 0,73- до 1,54-кратного уровня), тогда как экспрессия BAX снижалась (от 3,38 до 1,75-кратного уровня), что может свидетельствовать о протективном действии STP на клетки в условиях воспалительного стресса [Generalov E. et al., 2025b].

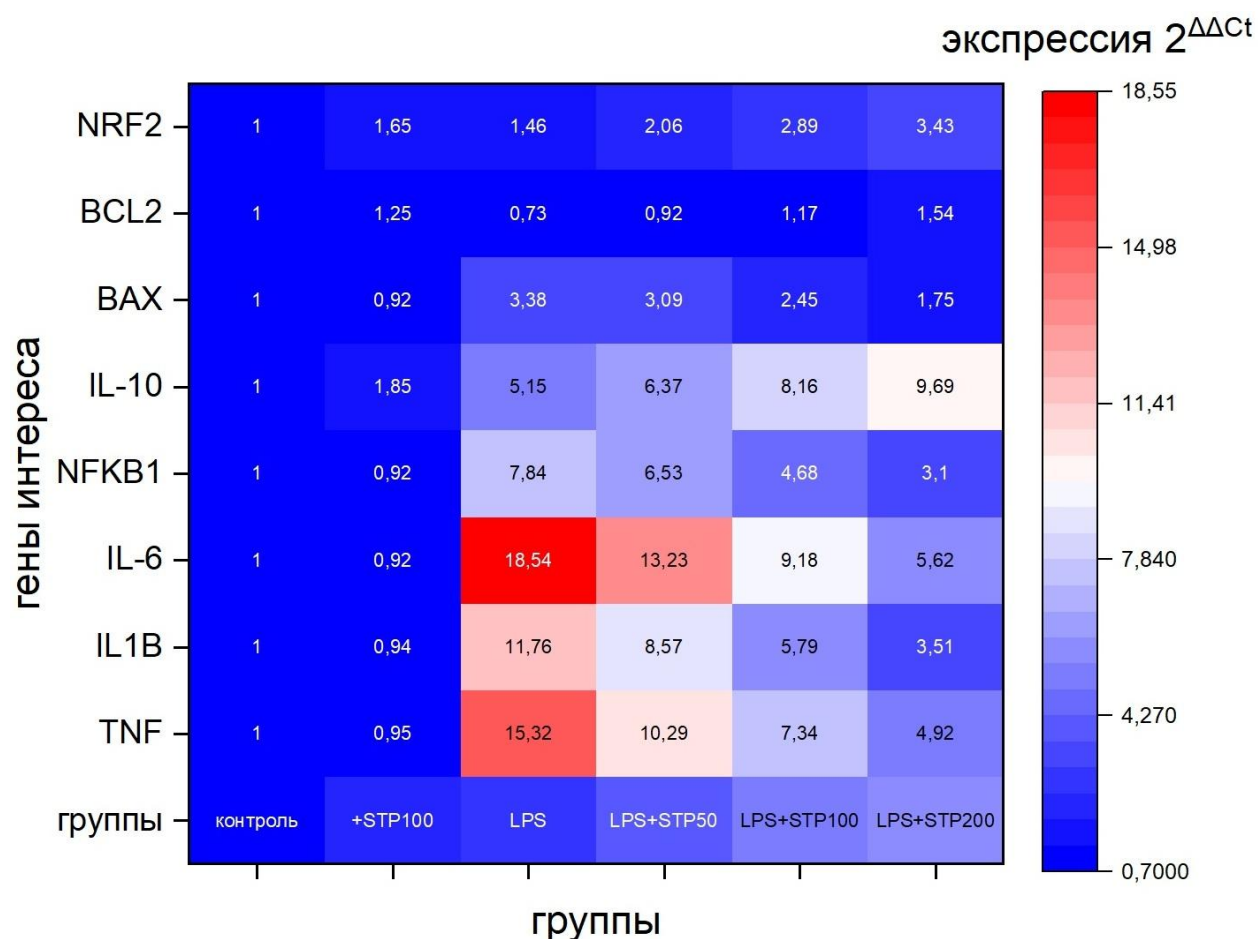


Рисунок 57. Результаты исследования противовоспалительного действия STP (50, 100 и 200 мкг/мл) на уровень мРНК методом ПЦР РВ в реальном времени, вовлеченных в регуляцию воспалительных процессов и окислительного стресса в макрофагоподобных клетках THP-1 в условиях LPS-индуцированного воспаления. По вертикальной оси расположены изучаемые гены, а по горизонтальной — соответствующие экспериментальные группы. Секвенирование проводили в 4 повторах [Generalov E. et al., 2025b].

Представленные данные демонстрируют комплексное действие STP, которое проявляется не только в подавлении провоспалительных сигналов, но и в активации

защитных механизмов клетки через усиление экспрессии противовоспалительных факторов и модуляцию генов, связанных с окислительным стрессом и апоптозом. Такой многофакторный эффект может иметь существенное значение для потенциального терапевтического применения STP при воспалительных заболеваниях.

Для HTLP были выбраны следующие гены интереса, представленные в Таблице 14.

Таблица 14. Праймеры для исследуемых генов для HTLP.

Название	Прямой праймер	Обратный праймер
IL-1B (IL-1 β)	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTCGTAGCTGGA
IL-6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
IL-10	GACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG	TCACATGCGCCTTGATGTCTG
IL12B	GCGGAGCTGCTACACTCTC	CCATGACCTCAATGGGCAGAC
IL23	CTCAGGGACAACAGTCAGTTC	ACAGGGCTATCAGGGAGCA
TNF (TNF- α)	CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG	GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
CD40	TTGGGGTCAAGCAGATTGCTA	GCAGATGACACATTGGAGAAGA
CD80	GGCACATACGAGTGTGTTGT	TCAGCTTTGACTGATAACGTCAC
CD274	GGACAAGCAGTGACCATCAAG	CCCAGAATTACCAAGTGAGTCCT
CSF-1	TGGCGAGCAGGAGTATCAC	AGGTCTCCATCTGACTGTCAAT

Воздействие LPS на дифференцированные макрофаги, полученные из линии THP-1, привело к значимому росту экспрессии 10 генов: увеличение экспрессии гена IL-6 в 4240 раз; увеличение экспрессии гена CD80 в 231 раз; увеличение экспрессии гена IL-1 β в 145 раз; увеличение экспрессии гена CD274 в 85 раз; увеличение экспрессии гена IL12b в 85 раз; увеличение экспрессии гена TNF- α в 76 раз; увеличение экспрессии гена IL23 в 60 раз; увеличение экспрессии гена CSF-1 в 17 раз; увеличение экспрессии гена CD40 в 7 раз; увеличение экспрессии гена IL-10 в 2 раза. Одновременное воздействие ЛПС и HTLP привело к аналогичным изменениям экспрессии за исключением гена IL-10. Его экспрессия увеличилась в 3 раза [Generalov E. et al., 2025a].

Влияние HTLP на продукцию TNF, IL-1 β и IL-6 в культуре мононуклеарных клеток

В опыте проверяли влияние HTLP *in vitro* на уровень экспрессии цитокинов IL-1 и IL-6 в культуре клеток мононуклеаров периферической крови (МПК).

HTLP вносили в концентрациях 1, 3, 10, 30, 100 мкг/мл полисахарида без и с 10 нг/мл LPS. Культуру МПК (Polylab Pte Ltd, Singapore, ATCC, USA) культивировали в среде RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), 10% FBS (Sigma-Aldrich), 2 mM L-глутамина (Sigma-Aldrich), 20 мкг/мл гентамицина (Sigma-Aldrich), 2 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 2,8 M 2-меркаптоэтанола (Helicon), в объеме 1,5 мл/лунку в 24-луночной панели (Nunc, Дания) в

течение 12 часов при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Надосадочную жидкость, содержащую цитокины, собирали и хранили при -20 °С. Количество и жизнеспособность клеток оценивали в камере Горяева в присутствии 0,1% раствора трипанового синего (Sigma-Aldrich). Концентрацию цитокинов в надосадочной жидкости анализировали по стандартному протоколу производителей наборов ELISA Kit Human IL-1beta, Human IL-6 и Human TNF α (ab214025, ab178013, ab181421 Abcam, Великобритания). Положительным контролем служили клетки, инкубированные с LPS в концентрации 10 нг/мл.

МПК являются удобной экспериментальной моделью для оценки уровня продукции цитокинов. Результаты представлены на Рисунках 58–61.

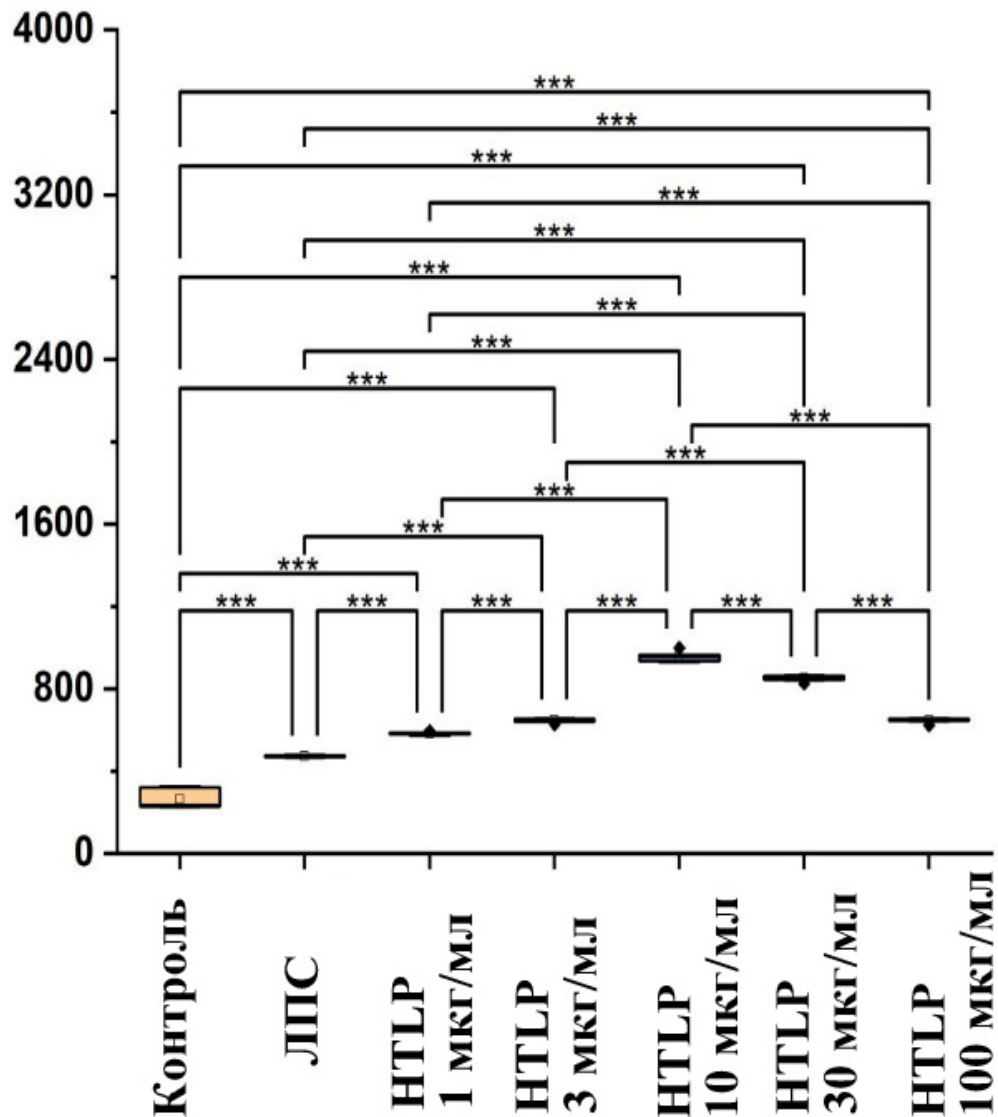


Рисунок 58. Уровень продукции TNF- α (пг/мл) мононуклеарами периферической крови после 12-часовой инкубации с HTLR. По оси ординат – концентрация TNF в пг/мл, по оси абсцисс – группы, (***) $p<0,001$).

Концентрации TNF- α в надосадочных жидкостях демонстрируют более высокие уровни продукции цитокина, в сравнении с контролем и LPS (17,7 и 6 раз, соответственно).

Наблюдаемое увеличение продукции цитокинов, обладающих радиопротекторными свойствами [Slørdal L. et al., 1989; Matsuoka, Y. et al., 2016] может быть обусловлено как прямой активацией клеток *in vitro*, так и увеличением скорости секреции этих молекул. Кроме того, *in vivo*, вероятно, происходит активация различных клеток-продуцентов цитокинов, включая дендритные клетки, лимфоциты, макрофаги, НК и стромальные клетки, которые, в свою очередь, также могут потенцировать высвобождение цитокинов, создавая каскадный эффект усиления иммунного ответа. Таким образом, полисахариды могут инициировать комплексные процессы, включающие как прямую активацию, так и аутокринную и паракринную регуляцию секреции цитокинов.

Экспериментальные данные показали, что в клеточных культурах с высокой спонтанной или LPS-индуцированной продукцией IL-1, добавление полисахарида HTLP приводило к снижению уровней высвобождаемого IL-1. Напротив, в условиях низкой продукции цитокина HTLP стимулировал секрецию IL-1. Аналогичная закономерность наблюдалась и в LPS-стимулированных культурах МПК (Таблица 12). Таким образом, полисахарид HTLP обладает плейотропным действием на продукцию IL-1 *in vitro*, подавляя повышенные уровни и стимулируя пониженные уровни как спонтанной, так и LPS-индуцированной продукции этого цитокина. Это свидетельствует о комплексном регуляторном действии полисахарида, направленном на модуляцию иммунного ответа.

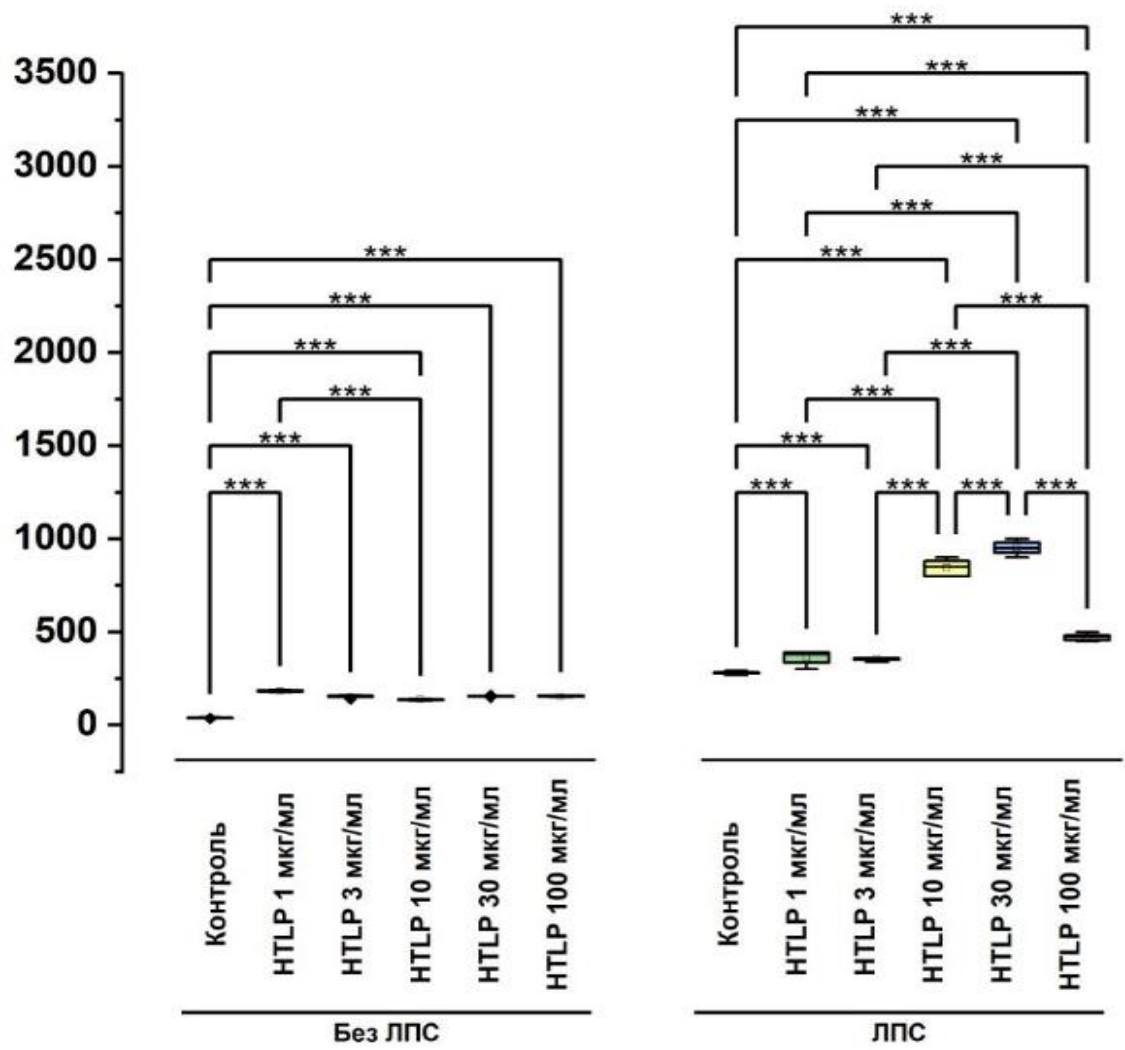


Рисунок 59. Изменение концентрации IL-1 при добавлении HTLR с и без стимуляции LPS при начальной низкой продукции цитокина. По оси ординат – концентрация IL-1 в пг/мл, по оси абсцисс – группы, (**p<0,01).

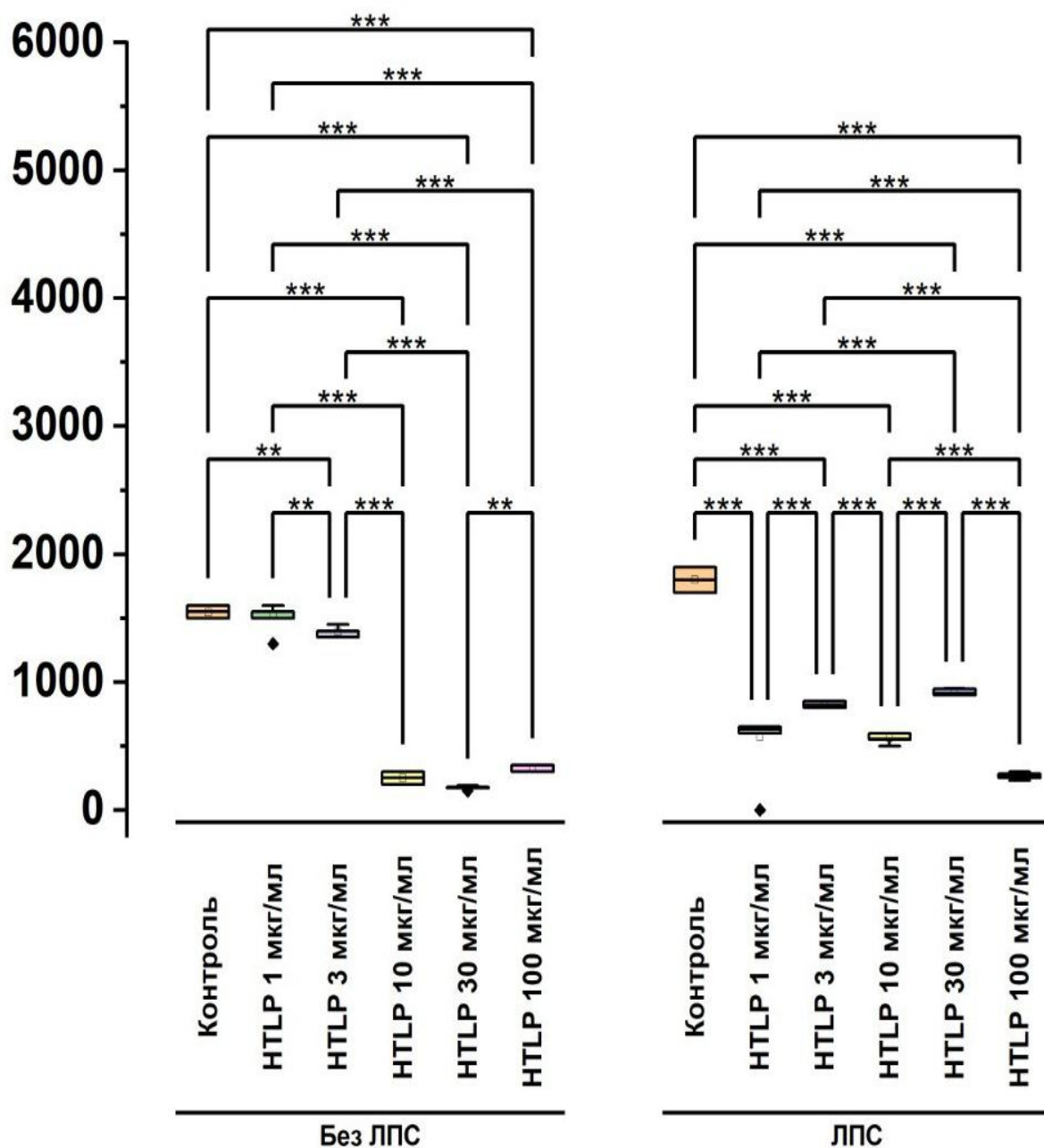


Рисунок 60. Изменение концентрации IL-1 при добавлении HTLR с и без стимуляции LPS при начальной высокой продукции цитокина. По оси ординат – концентрация IL-1 в пг/мл, по оси абсцисс – группы, (**p<0,01, ***p<0,001).

Продукция IL-6 была исследована *in vitro* в культурах МПК в присутствии и отсутствии липополисахарида. Анализ исходных уровней IL-6 показал отсутствие значимых различий между культурами. Внесение полисахарида вызывало стимуляцию выработки IL-6 в обеих группах, за исключением нестимулированных культур, где стимуляция наблюдалась только при использовании высоких доз полисахарида. Интенсивность стимуляции продукции IL-6 демонстрировала дозозависимый характер.

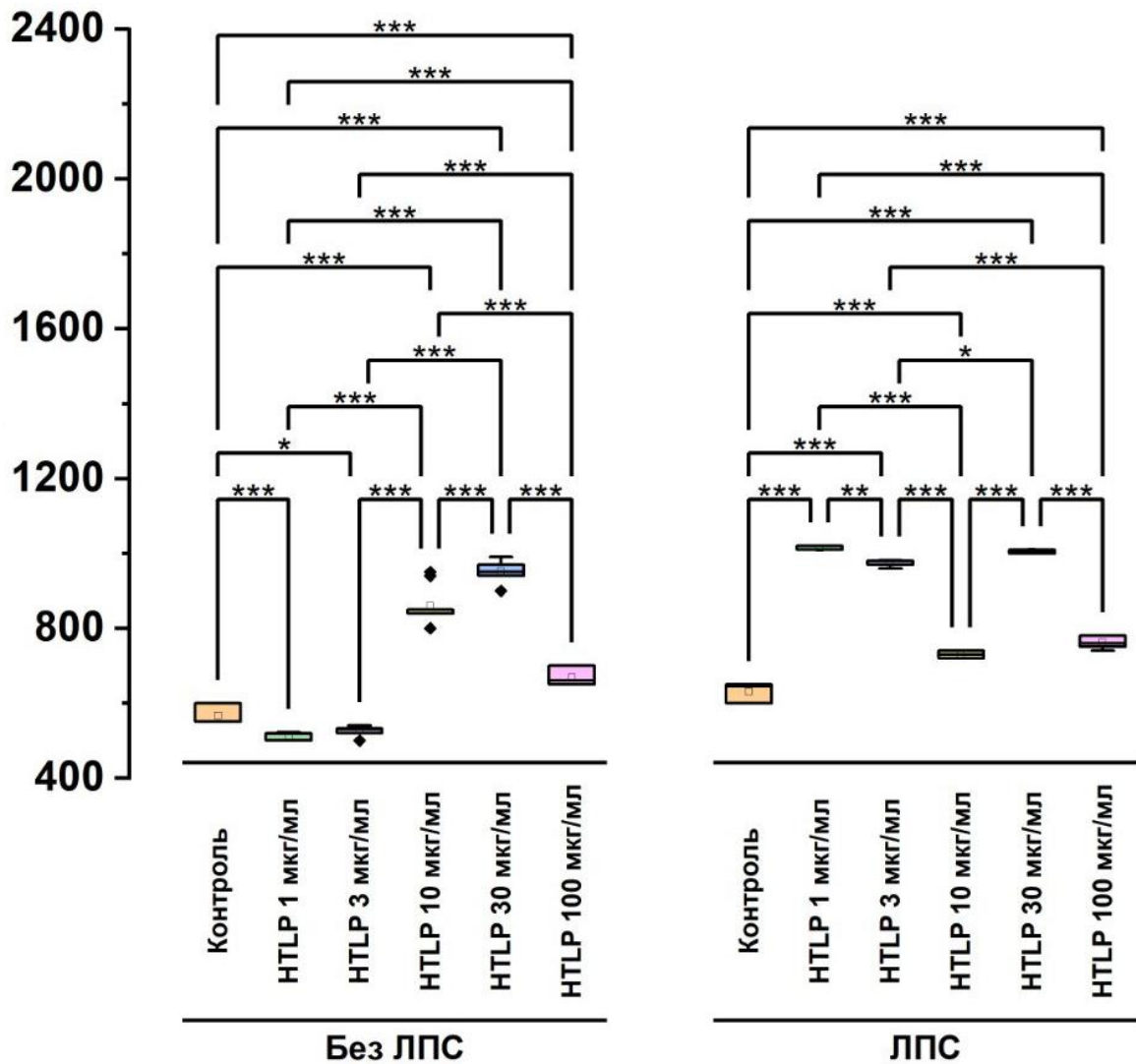


Рисунок 61. Изменение концентрации IL-6 при добавлении HTLP с и без стимуляции LPS при начальной высокой продукции цитокина. По оси ординат – концентрация IL-1 в пг/мл, по оси абсцисс – группы, (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

Введение полисахарида приводило к модуляции уровня IL-1: стимуляции низкой продукции цитокина, при его изначально низкой продукции, а при изначально высокой – ингибированию. Отсутствие побочных эффектов, которые сопутствуют введению цитокинов (IL-1, IL-6, TNF) и LPS в биомедицинских целях, полисахарид может быть использован в качестве средства, модулирующего экспрессию IL-1 и стимулирующего выработку провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF, и, как следствие, активацию иммунной системы. На основании этого можно сделать вывод, что HTLP обладает иммуномодулирующей активностью.

3.2.8.2. Инактивация генов целевых рецепторов и блокирование рецепторов антителами

Для HTLP была разработана другая модель поиска потенциального молекулярного механизма действия. С учетом физико-химических особенностей, биологической активности и клеток, на которых наблюдались проявления биологической активности были выбраны рецепторы Dectin-1, TLR-6 и CR3 как основные к рассмотрению. В качестве модельной системы была выбрана макрофагальная клеточная линия RAW 264.7, способная к продукции TNF при наличии внешнего стимула.

С целью инактивации целевых рецепторов были использованы синтезированные олигонуклеотидные последовательности, комплементарные мРНК генов целевых рецепторов – Таблица 15.

Таблица 15. Использованные олигонуклеотидные последовательности

	Прямая последовательность (смысловая цепь)	Обратная последовательность (антисмысловая цепь)
CR3	5'-p-gatccg- CCTACTATAAACTCTCCTCTACACGT GTAGAGGAGAGTTTATAGTAGG-tttttg	5'-p-aattcaaaaa- CCTACTATAAACTCTCCTCTACACGT GTAGAGGAGAGTTTATAGTAGG-cg
Dectin-1	5'-p-gatccg- GCGACACAATTCAGGGAGAAACACG TGTTTCTCCCTGAATTGTGTCGC-tttttg	5'-p-aattcaaaaa- GCGACACAATTCAGGGAGAAACACG TGTTTCTCCCTGAATTGTGTCGC-cg
TLR-6	5'-p-gatccg- CACCAGAGGTCCAACCTTATTCACGT GAATAAGGTTGGACCTCTGGTG-tttttg	5'-p-aattcaaaaa- CACCAGAGGTCCAACCTTATTCACGT GAATAAGGTTGGACCTCTGGTG-cg

Олигонуклеотиды попарно отжигались, а затем были встроены в лентивирусный плазмидный вектор pLSLP по соответствующим сайтам рестрикции.

Для получения рекомбинантного лентивируса использовали клетки HEK293T, которые котрансфецировались плазмидами pRSV-Rev, pMDLg/pRRE (ген/вставка HIV-1 GAG/POL) (плазмида № 12251), pCerulean-VSVG (плазмида № 11913) и плазмидой, несущей shRNA гена интереса.

Для проведения трансфекции клетки HEK293T культивировали в чашке Петри (90 см) до плотности посева 50–70% со средой DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), сыворотку (Sigma-Aldrich, F2442) и антибиотики (пеницилин и стрептомицин). После чего клетки промывали однократно PBS и наносили на них

трансфекционную смесь: упаковочные и целевую плазмиды, на одну точку – 4 мкг pRSV-Rev, 2 мкг pMDLg/pRRE, 1 мкг pCerulean-VSVG, 1,3 мкг плазмиды интереса. Добавляли смесь 150 мкл OPTIMEM с 3 мкл Plus Reagent. Через 5 мин добавляли смесь 150 мкл OPTIMEM с 6 мкл липофектамина. Все перемешивания производили посредством плавного пипетирования.

Инкубировали 6 ч в CO₂-инкубаторе, затем клетки промывали 1х PBS, а среду заменяли свежей – DMEM и FBS до 5%. Первый вирусный супернатант собирали через 24 ч и фильтровали через фильтр-насадку с порами 0,45 мкм в пробирки. Клетки вновь заливали свежей средой с добавлением 2% сыворотки по объему. В дальнейшем сбор вирусного супернатанта проводили несколько раз с интервалом 12 часов. Супернатанты объединяли. Осаждение вирионов проводили путем центрифугирования при 5000 об/мин с 12%-м полиэтиленгликолем при 4 °C в течение 12 часов. Очищенные супернатанты хранили либо на льду (не более часа), либо в кельвинаторе (при температуре –70 °C).

Заражение и селекцию клеток RAW 264.7 проводили стандартным способом [Stein S.C. and Falck-Pedersen E., 2012]. Вирусные стоки объединяли (все по BFP, все по CLEC7A и т.д.), добавляли 1 мл вирусного концентрата с титром 10⁸/мл, разведенного сывороткой 1:2, полибрен до конечной концентрации 5 мкг/мл и инкубировали в CO₂-инкубаторе двое суток. Затем клетки рассаживали с добавлением среды и через сутки добавляли пуромицин (Sigma-Aldrich, P9620) до концентрации 1 мкг/мл и инкубировали клетки одни сутки. Меняли среду и добавляли пуромицин – 2 мкг/мл. Селекцию вели 1-2 недели или до вымирания контроля. Выросшие до 60–80% плотности пересева, отсеlectionированные колонии отбирали и высевали на пластик. Проверку исключения рецепторов проводили по свечению метки в генном конструкте RFP, GFP и BFP (контрольные плазмиды инкубировались параллельно с целевыми). Эффективность лентивирусной трансфекции составляла около 80%. В дальнейшем клетки активировали с помощью LPS и HTLP и тестировали на выработку TNF-α.

Анализ данных, представленных в Таблицах 16 и 17, а также на Рисунках 62 и 63, продемонстрировал, что HTLP, подобно LPS, индуцирует продукцию TNF-α. На 4-й час инкубации наблюдалось увеличение уровней TNF-α в 18,3 раза при воздействии HTLP и в 23,2 раза при воздействии LPS относительно контроля. На 24-й час уровни TNF-α были увеличены в 7,4 и 7,3 раза, соответственно. В контрольных культурах с индивидуальным нокаутом генов рецепторов уровни TNF-α не отличались от контроля без нокаута в пределах ошибки. В отличие от этого, HTLP не индуцировал продукцию TNF-α в культурах с нокаутом генов рецепторов TLR-6 и Dectin-1, что позволяет предположить, что активация клеток HTLP инициируется через ко-зависимость этих рецепторов. Учитывая высокую

молекулярную массу HTLP (1–2 МДа), представляется вероятным, что активация клеток происходит посредством одновременного взаимодействия HTLP с TLR-6 и Dectin-1, что определяет его биологическую активность.

Таблица 16. Влияние HTLP и LPS на продукцию TNF- α клеточной линии RAW 264.7 с инактивированными генами целевых рецепторов CR3, Dectin-1 и TLR-6 после 4 часов инкубации.

№	Группа	TNF- α в культуральной жидкости (M $\pm$ SD), пкг/мл
1	Контроль – физиологический раствор	4,47 $\pm$ 1,56
2	Дектин-1 (физиологический раствор)	6,57 $\pm$ 1,00
3	CR3 (физиологический раствор)	6,92 $\pm$ 2,12
4	TLR-6 (физиологический раствор)	4,44 $\pm$ 2,6
5	LPS (физиологический раствор)	103,66 $\pm$ 9,60*
6	LPS – Дектин-1 (физиологический раствор)	63,03 $\pm$ 6,42*
7	LPS – CR3 (физиологический раствор)	57,36 $\pm$ 5,56*
8	LPS – TLR-6 (физиологический раствор)	70,88 $\pm$ 7,12*
9	Опыт (HTLP, 100 мкг/мл)	81,71 $\pm$ 7,82*
10	Дектин-1 (HTLP, 100 мкг/мл)	10,03 $\pm$ 3,84
11	CR3 (HTLP, 100 мкг/мл)	69,78 $\pm$ 7,02*
12	TLR-6 (HTLP, 100 мкг/мл)	10,53 $\pm$ 2,56

Таблица 17. Влияние HTLP на продукцию TNF- α клеточной линии RAW 264.7 с инактивированными генами целевых рецепторов CR3, Dectin-1 и TLR-6 после 24-х часовой инкубации.

	Группа	TNF- α в культуральной жидкости (M $\pm$ SD), пкг/мл
1	Контроль – физиологический раствор	18,02 $\pm$ 7,56
2	Дектин-1 (физиологический раствор)	21,00 $\pm$ 8,00
3	CR3 (физиологический раствор)	15,88 $\pm$ 6,60
4	TLR-6 (физиологический раствор)	13,65 $\pm$ 6,56
5	LPS (физиологический раствор)	131,85 $\pm$ 13,20*
6	LPS - Дектин-1 (физиологический раствор)	120,78 $\pm$ 12,06*
7	LPS - CR3 (физиологический раствор)	123,08 $\pm$ 10,89*

8	LPS – TLR-6 (физиологический раствор)	129,82 ± 12,60*
9	Опыт (HTLP, 100 мкл/мл)	133,80 ± 13,80*
10	Дектин-1 (HTLP, 100 мкл/мл)	26,70 ± 7,60
11	CR3 (HTLP, 100 мкл/мл)	124,32 ± 12,60*
12	TLR-6 (HTLP, 100 мкл/мл)	28,73 ± 9,63

*-достоверное различие с контролем (критерий Манна-Уитни) ($p < 0,05$).

Данные по влиянию LPS на выработку TNF- α в культуре клеток демонстрируют взаимосвязь между основным рецептором LPS TLR-4 и рецепторами CR3, TLR-6 и Dectin-1. Выключение этих рецепторов приводит к сдвигу равновесия во внутриклеточной системе передачи сигнала и уменьшает продукцию цитокина к 4-му часу.

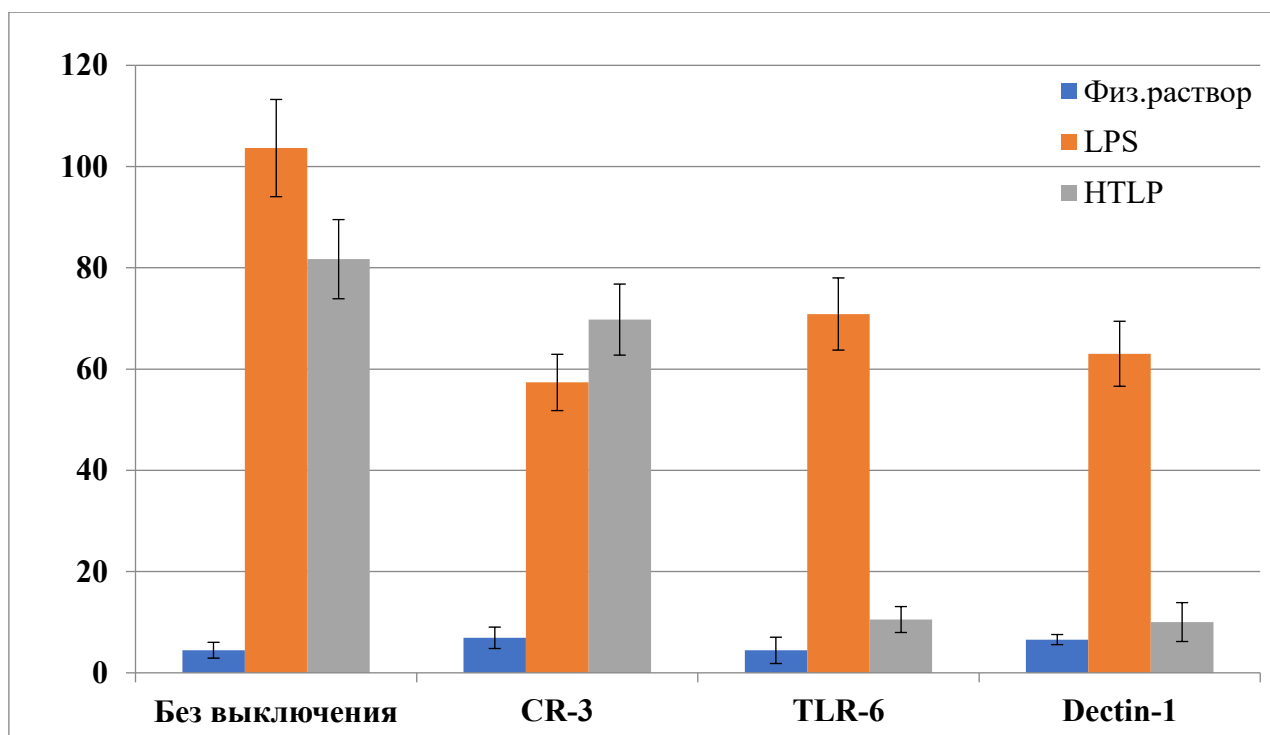


Рисунок 62. Диаграмма сравнений уровней выработки TNF- α клеточной линии RAW 264.7 с инактивированными генами целевых рецепторов CR3, Dectin-1 и TLR-6 через 4 часа инкубации. По оси ординат – концентрация TNF- α в пкг/мл.

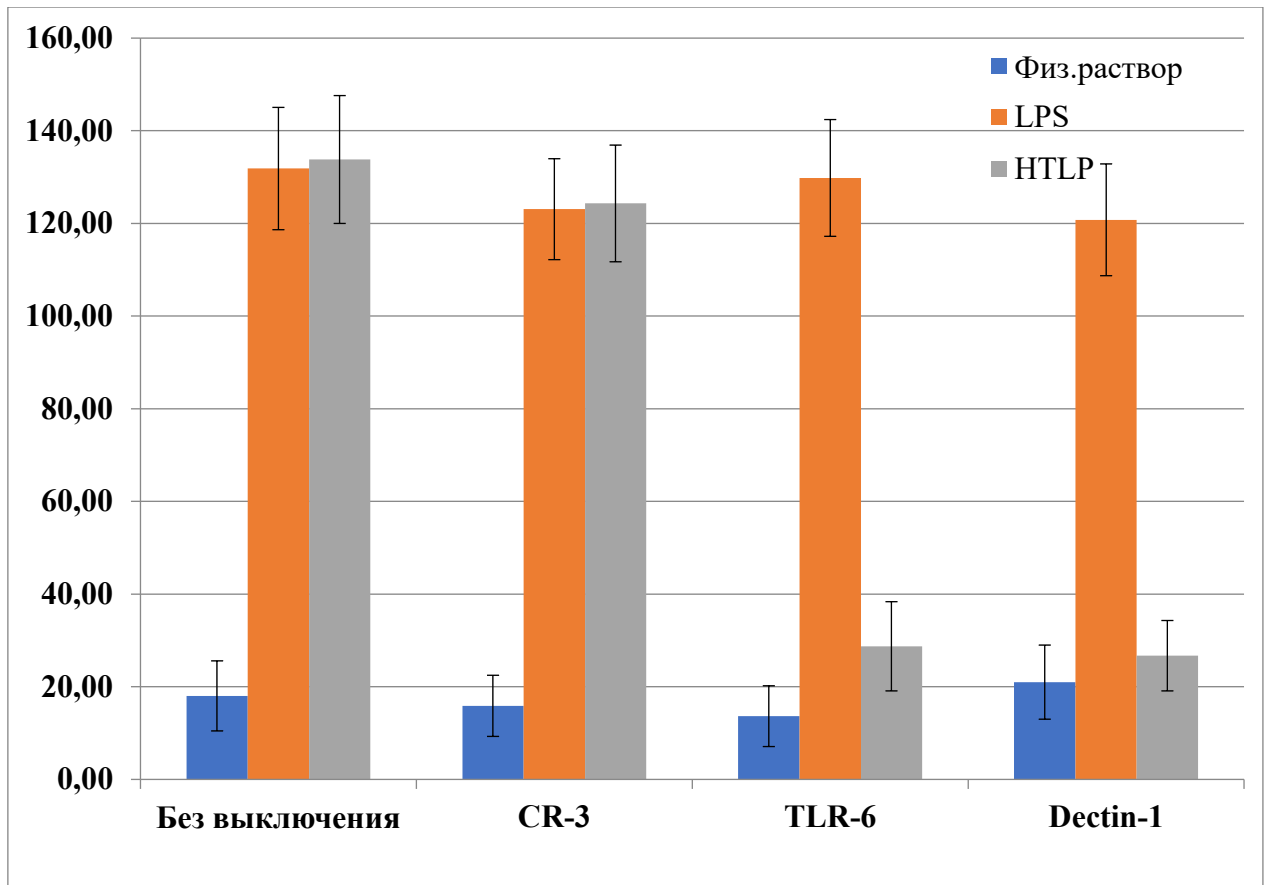


Рисунок 63. Диаграмма сравнений уровней выработки TNF- α клеточной линии RAW 264.7 с инактивированными генами целевых рецепторов CR3, Dectin-1 и TLR-6 через 24 часа инкубации. По оси ординат – концентрация TNF- α в пкг/мл.

Блокирование рецепторов антителами и продукция TNF- α

Вторая экспериментальная модель, в которой оценивался потенциальный молекулярный механизм действия HTLP – инактивация целевых рецепторов TLR-6, CR3 и Dectin-1 за счет связывания с высокоспецифичными моноклональными антителами.

Клетки RAW 264.7 отмывали дважды FACS окрашивающим буфером (dPBS containing 1% FCS и 0,1% NaN₃). Супернатант отбирали и добавляли первичные антитела anti-TLR-6, anti-CR3, anti-Dectin-1 (Novus NB100-56536, ebioscience 14-0112-85, biovision 3891-100, соответственно), разведенные в среде без добавления FBS, инкубировали с ними 30 минут при температуре 4 °C без доступа света. Концентрации антител к CR3 – 1 мкг/мл, TLR-6 – 4 мкг/мл и Dectin-1 – 4 мкг/мл [Lin J.-S. et al., 2010]. В дальнейшем клетки активировали с помощью LPS и HTLP и тестировали на выработку TNF- α .

Были получены данные, согласующиеся с данными по инактивации генов целевых генов рецепторов, приведенные в Таблице 18 и на Рисунке 64.

Таблица 18. Влияние HTLP на продукцию TNF- α после 4-ех часов инкубации при блокировании рецепторов антителами.

№	Группа	TNF- α в культуральной жидкости ($M \pm SD$), пкг/мл
1	Контроль – физиологический раствор	$6,47 \pm 1,16$
2	Дектин-1 (физиологический раствор)	$8,32 \pm 1,21$
3	CR3 (физиологический раствор)	$4,88 \pm 1,07$
4	TLR-6 (физиологический раствор)	$7,25 \pm 2,23$
5	LPS (физиологический раствор)	$101,81 \pm 11,32^*$
6	LPS – Дектин-1 (физиологический раствор)	$72,10 \pm 7,19^*$
7	LPS – CR3 (физиологический раствор)	$77,36 \pm 6,31^*$
8	LPS – TLR-6 (физиологический раствор)	$76,51 \pm 8,01^*$
9	Опыт (HTLP, 100 мкг/мл)	$90,52 \pm 8,69^*$
10	Дектин-1 (HTLP, 100 мкг/мл)	$7,13 \pm 3,74$
11	CR3 (HTLP, 100 мкг/мл)	$84,73 \pm 7,91^*$
12	TLR-6 (HTLP, 100 мкг/мл)	$9,22 \pm 3,22$

*-достоверное различие с контролем (критерий Манна-Уитни) ($p < 0,05$).

Аналогично результатам, полученным в модели нокаута генов, исследование продемонстрировало, что HTLP индуцирует продукцию TNF- α в культивируемых клетках, при этом уровень стимуляции был сопоставим с эффектом LPS, известного как мощный индуктор этого цитокина. Активация клеток под действием HTLP опосредована рецепторами Dectin-1, вовлеченным в распознавание различных антигенов, в том числе, грибковых, и TLR-6, участвующим в распознавании бактериальных фрагментов.

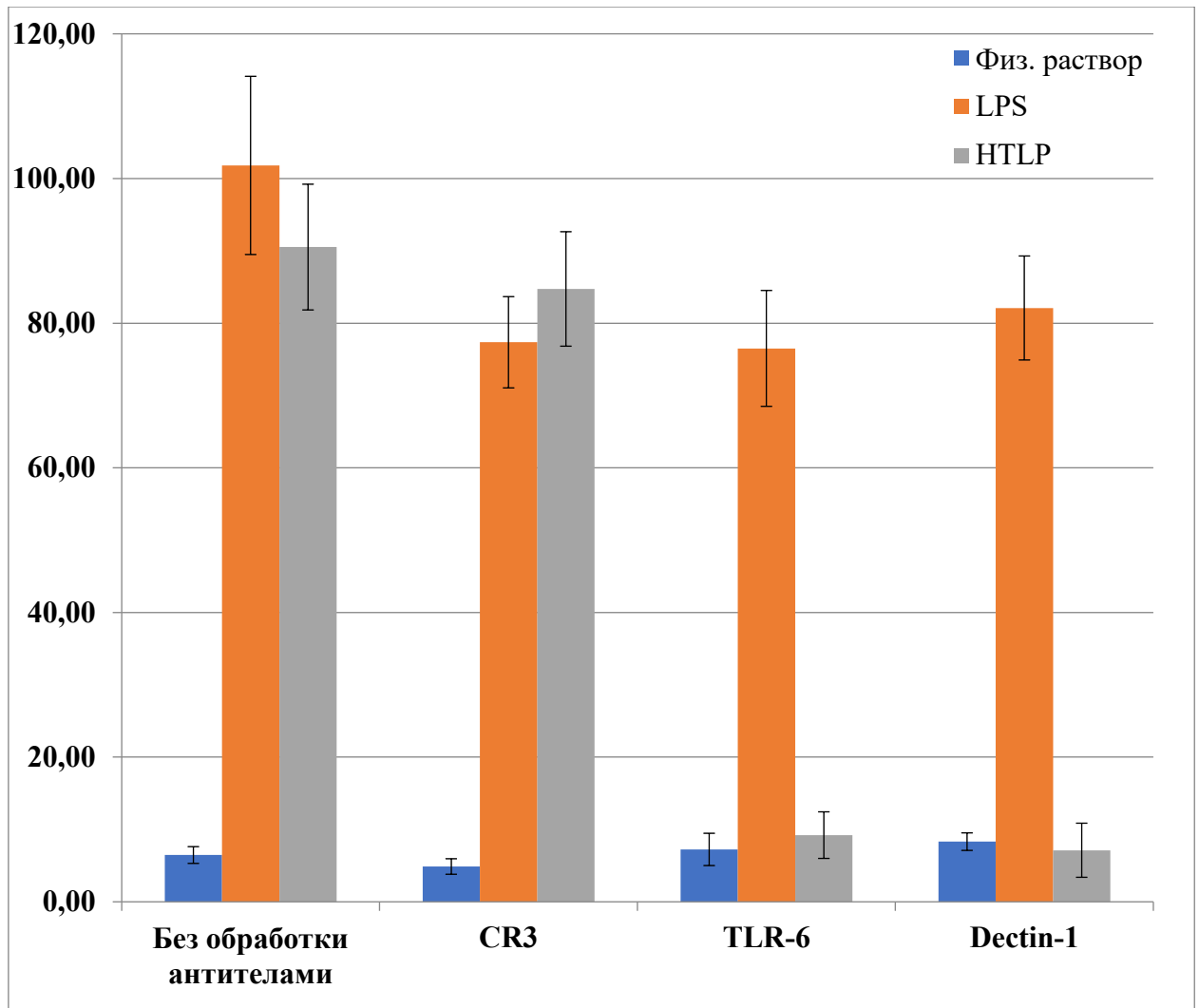


Рисунок 64. Диаграмма сравнений уровней выработки TNF- α клеточной линии RAW 264.7 после инактивации моноклональными антителами целевых рецепторов TLR-6, CR3 и Dectin-1 через 4 часа инкубации. По оси ординат – концентрация TNF- α в пкг/мл.

Полученные данные свидетельствуют о том, что для реализации биологической активности в модели по стимуляции выработки цитокина TNF- α макрофагальной клеточной линией RAW 264.7 оба рецептора Dectin-1 и TLR-6 необходимы.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1. HTLP

Биологически активный полисахарид HTLP был выделен из коркового слоя клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.) с использованием ультрафильтрации и различных видов хроматографии. Были изучены структурные, физико-химические характеристики и

биологическая активность очищенного полисахарида, проанализированы биохимические и молекулярные механизмы его действия.

Было показано, что HTLP является β -гликаном, проявляющим свойства полиэлектролита, с β -(1 $\rightarrow$ 4)- и β -(1 $\rightarrow$ 3)-гликозидными связями с высокой ММ 1–2 МДа, способным взаимодействовать с рецепторами Dectin-1 и TLR-2. Именно эти факторы являются основными для реализации его биологических активностей.

β -Гликаны характеризуются гетерогенностью структурных свойств, включая степень разветвления, ММ и конформационную организацию (например, тройная спираль, одностебельная спираль, неупорядоченный клубок) [Manabe N. and Yamaguchi Y., 2021]. Молекулярная масса является одним из ключевых факторов, определяющим биологическую активность β -гликанов. Как правило, β -гликаны с высокой ММ демонстрируют более выраженную биологическую активность [Wang Z. et al., 2023].

Одним из способов реализации биологического эффекта полисахаридов является взаимодействие их с рецепторами на клеточной поверхности или внутри клеточных везикул. Полисахариды с высокой ММ могут демонстрировать повышенную аффинность к рецепторам, вызывая активацию внутриклеточных сигнальных путей. Кроме того, увеличенное число повторяющихся звеньев в составе полисахаридов с высокой ММ способствует повышению их биоактивности.

Очищенная полисахаридная фракция HTLP, представлена гетерополисахаридом, состоящим в основном из глюкозы, галактозы, глюкуроновой и галактуроновой кислот с небольшим количеством рамнозы, арабинозы, маннозы, что видно, как из ВЭЖХ, так и ГЖХ анализа, с содержанием белка 0,5%. Глюкоза является преобладающим моносахаридом, в состав HTLP входят также галактоза, глюк- и галактуроновые кислоты. Различные виды полисахаридов: β -глюканы, гетеро- β -глюканы, гликаны и гетерогликаны, природные полисахариды, связанные с белками или пептидными остатками, такие как гликопептиды, протеогликанов или гликопротеинов, в той или иной степени проявляют противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo* [Khan T. et al., 2019; Guo R. et al., 2022]. Полисахариды с противоопухолевой активностью существенно различаются по химическому составу, конформации и физическим свойствам, поэтому трудно соотносить структуру полисахарида с противоопухолевой активностью, тем не менее, наблюдаются некоторые закономерности. Литературные данные свидетельствуют о важности наличия тройной спирали для проявления противоопухолевой активности, но описаны и другие конформации полисахаридов от беспорядочного клубка до нитей, проявляющих высокую противоопухолевую активность [Guo X. et al., 2021].

4.2. STP

Полисахарид, названный STP, был выделен из коркового слоя клубней картофеля с ростками (*Solanum tuberosum* L.). Очищенный препарат получили, используя ионообменную хроматографию и гельфилтрацию. Были изучены его структурные, физико-химические характеристики, биологические активности и молекулярный механизм действия. Было показано, что STP является полисахаридным комплексом, содержащим до 9% белка, с β -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями и ММ около 70 кДа. Именно эти факторы являются главными в определении физико-химических особенностей и реализации STP биологических активностей.

4.3. Сравнение HTLP и STP

Гликозидная связь является одним из важнейших параметров полисахаридной молекулы, определяющим противоопухолевую и иммуностимулирующую активность. Наиболее изученными в данном контексте являются β -D-гликаны, характеризующиеся (1 $\rightarrow$ 3)- и -(1 $\rightarrow$ 6)-связями. Полисахарид HTLP содержит как β -(1 $\rightarrow$ 4)-, так и β -(1 $\rightarrow$ 3)-гликозидные связи, в то время как полисахарид STP содержит β -(1 $\rightarrow$ 4)-связи, которые необходимы для проявления их биологической активности. Моносахаридный состав HTLP включает, помимо глюкозы, значительные количества галактозы и уроновых кислот, тогда как STP – галактозу, арабинозу и глюкозу. В этой связи следует отметить структурное сходство с каррагинанами.

С целью оценки влияния HTLP на иммунный ответ *in vitro*, было исследовано его воздействие на продукцию провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β и IL-6 в культуре мононуклеаров периферической крови (МПК). Данный набор цитокинов был выбран, поскольку они являются ранними медиаторами воспаления, продуцируемыми мононуклеарными клетками в ответ на антигенную стимуляцию. Результаты показали, что HTLP индуцирует продукцию TNF- α , что согласуется с данными, полученными в макрофагальной клеточной линии RAW 264.7, где HTLP также стимулировал выработку TNF- α в дозозависимой манере.

В отношении IL-1 было установлено, что в условиях высокой, как спонтанной, так и LPS-индуцированной, продукции, HTLP подавлял высвобождение этого цитокина из МПК, в то время как при низкой продукции наблюдалась стимуляция его высвобождения. Аналогичные результаты были получены и в LPS-стимулированных культурах МПК доноров. Учитывая, что IL-1 является ключевым медиатором острого и хронического

воспаления, бифазная модуляция его продукции под влиянием HTLP может указывать на его иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства. Последние подтверждаются в моделях каррагинанового, формалинового отека и карманной гранулемы.

Изучение влияния HTLP на продукцию IL-6 выявило дозозависимое увеличение его уровня в культурах МПК, что предполагает возможность регуляции его экспрессии и, соответственно, провоспалительной или иммуномодулирующей активности. Известно, что IL-6, чья экспрессия индуцируется TNF- α и IL-1 β , играет важную роль в противоопухолевом иммунном ответе, выступая в качестве фактора дифференцировки для В-лимфоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов, способствуя формированию клонов антителопродуцентов и цитотоксических Т-клеток, соответственно. Основываясь на этом, можно предположить, что стимуляция HTLP выработки IL-6 активированными макрофагами вносит вклад в его противоопухолевый эффект.

Для STP были выбраны цитокины IL-1, IL-4, IFN-g, как основные к рассмотрению в силу их роли в регенераторных процессах. Исследование влияния STP на цитокиновый баланс продемонстрировало значительную модуляцию соотношения про- и противовоспалительных цитокинов. Наблюдаемое снижение уровней провоспалительных цитокинов IL-1 β и IFN- γ в сочетании с увеличением концентрации противовоспалительного цитокина IL-4 указывает на выраженный противовоспалительный эффект STP, который, вероятно, играет ключевую роль в профилактике рецидивов язвенной болезни. Этот эффект сохранялся на протяжении всего периода наблюдения, свидетельствуя о долговременном влиянии STP на регуляцию иммунного ответа и предполагая его потенциальную пользу в профилактике хронических воспалительных заболеваний желудка. Помимо регуляции иммунного ответа, цитокины, такие как IL-4, играют важную роль в процессах регенерации тканей, стимулируя пролиферацию и дифференцировку клеток, участвующих в восстановлении поврежденных тканей и органов. Баланс между про- и противовоспалительными цитокинами имеет решающее значение для поддержания гомеостаза тканей и предотвращения патологического воспаления, которое может привести к хроническим заболеваниям и фиброзу.

Противоопухолевая активность HTLP исследовалась *in vivo* в модели карциносаркомы Уокера и карциномы легких Льюиса. Антиметастатическое действие полисахарида HTLP изучали в модели карциносаркомы Уокера *in vivo*. Противоопухолевое действие HTLP наблюдали во всех используемых моделях. Такой эффект HTLP, скорее всего, не связан с его влиянием на жизнеспособность опухолевых клеток напрямую, поскольку HTLP не обладает прямым цитотоксическим действием, что было показано в

различных моделях. Скорее всего, действие HTLP обусловлено активацией специфических противоопухолевых клеток иммунной системы – Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и макрофагов, что было показано в различных моделях.

Исследования *in vitro* показали, что культивирование макрофагальной клеточной линии RAW 264.7 с полисахаридом HTLP и STP в течение 24 часов не вызывало статистически значимого снижения жизнеспособности этих клеток, а также не влияло на их пролиферацию. Эти результаты, наряду с ранее полученными данными об отсутствии цитотоксического действия HTLP на лимфоидные клетки, позволяют предположить, что *in vivo* HTLP проявляет свое противоопухолевое действие посредством механизмов, не связанных с прямой цитотоксичностью. Известно, что природные полисахариды обладают способностью модулировать иммунный ответ и ингибировать рост опухолей без прямого цитотоксического эффекта на опухолевые клетки [Yang K. et al., 2023].

При изучении *in vivo* моделей первичных опухолей, в частности карциномы Льюиса, монотерапия HTLP ингибировала рост опухоли до 38%. Монотерапия с применением ЛХС-1269 индуцировала максимальное ингибирование роста опухоли до 60% на 8-й день, с последующим снижением до 35% на 12-й день и 42% на 28-й день. Совместное применение приводило к синергетическому эффекту, который выражался в пролонгации действия ЛХС-1269 на протяжении всего периода наблюдения и поддержании клеточности у лабораторных животных. Предполагается, что противоопухолевое действие HTLP *in vivo* опосредовано модуляцией иммунной системы, приводящей к развитию воспаления в опухолевом микроокружении.

Результаты соответствуют данным литературы о том, что полисахариды проявляют противоопухолевое действие преимущественно через стимуляцию иммунного ответа, а не за счет прямого цитотоксического воздействия на опухолевые клетки. Известно, что для развития Т-клеточного ответа, играющего важную роль в уничтожении опухоли, требуется определенное время, поэтому возможно, что к 20-м суткам наблюдается начало этого процесса, и более длительные сроки эксперимента необходимы для оценки истинного влияния HTLP на опухолевый рост. IL-1, TNF и IL-6, как провоспалительные цитокины, могут участвовать в противоопухолевом ответе, способствуя рекрутированию и активации иммунных клеток, а также индуцируя апоптоз в опухолевых клетках.

Изучение влияния HTLP на метастазирование показало наличие выраженного антиметастатического эффекта на модели метастазирующей карциномы легких Льюиса, где ингибирование метастазирования достигало 75% в зависимости от дозы и режима введения. Антиметастатическую активность HTLP также подтвердили на модели карциносаркомы Уокера. Полисахарид HTLP проявлял антиметастатическую активность в широком

диапазоне концентраций, включая дозы 1,5 мкг и 100 мкг на животное. Учитывая наличие иммуномодулирующей активности HTLP, можно заключить, что этот полисахарид может влиять на метастазирование путем модуляции иммунных ответов и подавления инвазивности опухолевых клеток.

Предполагается, что макрофаги могут расщеплять HTLP на фрагменты, которые способны взаимодействовать с галектином-3, а также с различными рецепторами иммунокомпетентных клеток, включая дендритные клетки и моноциты, активируя их в направлении противоопухолевого действия. Возможно, HTLP способствует регуляции баланса Th1/Th2, с преобладанием Th1-ответа, что ведет к активации клеточного иммунитета. Активированные макрофаги продуцируют цитокины, которые активируют НК и Т-лимфоциты, обладающие цитотоксическим действием в отношении опухолевых клеток. НК высвобождают цитолитические молекулы, приводящие к разрушению опухолевых клеток путем нарушения целостности клеточных мембран [Krzewski K. and Coligan J.E., 2012].

Известно, что β -(1 $\rightarrow$ 3)-, β -(1 $\rightarrow$ 4)- и β -(1 $\rightarrow$ 6)-гликаны способны активировать врожденный иммунный ответ через макрофаги и НК, взаимодействуя с рецептором Dectin-1 [Chiba S. et al., 2014; Kalia N. et al., 2021], что приводит к стимуляции сигнальных путей, усиливающих врожденный иммунный ответ. TLR также участвуют в первичном распознавании опухолевых антигенов, а также патоген-ассоциированных молекулярных паттернов [Duan T. et al., 2022]. HTLP способствует инфильтрации опухоли лимфоцитами, активируя иммунные эффекторные клетки, такие как НК и цитотоксические Т-лимфоциты, что способствует уничтожению опухоли. Клинически показано, что инфильтрация лимфоцитами опухолевого микроокружения является фактором, препятствующим метастазированию.

Иммуномодулирующие полисахариды, обладающие способностью стимулировать выработку цитокинов и не проявляющие цитотоксической активности, представляют собой перспективный класс соединений для разработки радиопротекторных средств. Противолучевая активность полисахарида HTLP была оценена в экспериментальной модели выживаемости гемопоэтических стволовых клеток, формирующих селезеночные колонии, через 8 суток после облучения мышей-гибридов F₁(CBA $\times$ C₅₇B1/6). Полученные результаты продемонстрировали, что HTLP оказывает протекторное действие на гемопоэтические стволовые клетки, снижая их повреждение ионизирующей радиацией. Примечательно, что высокий радиозащитный эффект HTLP проявляется в течение суток, что делает данный полисахарид перспективным для экстренного применения в ситуациях радиационного поражения. Предполагается, что механизм, лежащим в основе

радиопротекторного эффекта НТЛР, является стимуляция роста колоний гемопоэтических стволовых клеток и модуляция цитокиновой активности.

Поскольку гемопоэтические стволовые клетки являются предшественниками всех клеток крови, обеспечивающих жизнедеятельность организма, то стимуляция их пролиферации ведет к увеличению порога дозы облучения, необходимой для деструкции критического количества стволовых клеток, и, как следствие, к снижению степени подавления гемопоэза, а также уменьшению выведения метаболитов, образующихся при взаимодействии γ -излучения с тканями, и улучшению снабжения тканей необходимыми веществами.

Различные цитокины, включая лимфокины, хемокины и интерлейкины, проявляют радиопротекторные свойства, основанные на их гемо- и иммуностимулирующей активности, а также на способности повышать эндогенный уровень радиорезистентности, сохраняя его в течение продолжительного времени. Однако непосредственное применение цитокинов в качестве радиопротекторов ограничено их высокой токсичностью. В то же время, препараты, способные стимулировать эндогенную индукцию цитокинов, приводят к опосредованному повышению радиорезистентности и активации процессов элиминации продуктов метаболизма, образующихся при радиационном воздействии (таких как супероксид анион, перекись водорода), что открывает перспективу их широкого применения.

IL-1 β , TNF- α и IL-6 участвуют в активации каскада сигнальных путей, которые приводят к экспрессии генов, вовлеченных в репарацию ДНК, таких как гены, кодирующие ферменты, участвующие в эксцизионной репарации нуклеотидов и репарации разрывов двухцепочечной ДНК. IL-1 β и TNF- α , в частности, могут индуцировать фосфорилирование белков, участвующих в репарационных процессах, таких как ATM и ATR, тем самым повышая их активность и способность распознавать повреждения ДНК и инициировать соответствующие механизмы репарации, включая негомologичное соединение концов и гомологичную рекомбинацию. IL-6, помимо прочего, может влиять на организацию хроматина, что обеспечивает более свободный доступ белков репарации ДНК к поврежденным участкам, облегчая тем самым процесс восстановления генетического материала и подавляя накопление повреждений ДНК в клетках, подвергшихся воздействию повреждающих факторов. Поэтому вещества, такие как НТЛР, могут опосредованно влиять на процессы регенерации ДНК регулируя активность указанных выше цитокинов.

Литературные данные свидетельствуют о том, что экспрессия рецепторов, распознающих β -глюканы, в макрофагах, дендритных клетках и субпопуляциях Т-лимфоцитов необходима для проявления их биологической активности [Del Cornò M.

et al., 2020]. С целью изучения вовлечения рецепторов CR3, Dectin-1 и TLR-6 в опосредование провоспалительных ответов на HTLP было исследовано влияние генных конструкций, подавляющих экспрессию белков указанных рецепторов, на способность HTLP индуцировать продукцию TNF- α в макрофагальных клетках RAW 264.7. Все генные конструкции были клонированы в ретровирусный вектор, упакованы в вирионы и использованы для трансдукции RAW 264.7. Результаты показали, что HTLP не стимулирует продукцию TNF- α в культурах с нокаутом генов рецепторов TLR-6 и Dectin-1. При этом инактивация гена CR3 не оказывала существенного влияния на выработку TNF- α .

Дополнительным подтверждением полученных данных служили схожие результаты, полученные в модели блокирования рецепторов TLR-6, CR3 и Dectin-1 высокоспецифичными моноклональными антителами. В соответствии с предыдущими результатами, HTLP не стимулировал продукцию TNF- α в культурах с добавлением моноклональных антител к рецепторам TLR-6 и Dectin-1. Блокирование CR3 соответствующими моноклональными антителами, в свою очередь, не влияло на продукцию TNF- α .

Полученные данные, основанные на инактивации генов и блокировании целевых рецепторов, указывают на то, что рецепторы Dectin-1 и TLR-6 играют важную роль в активации клеток RAW 264.7 под действием полисахарида HTLP. Подавление экспрессии или блокирование хотя бы одного из этих рецепторов приводит к существенному снижению продукции TNF- α . На основании этих результатов представляется возможным существование нескольких способов взаимодействия полисахарида с рецепторами и передачи внутриклеточного сигнала [Генералов Е.А. и Афремова А.И., 2016; Генералов Е.А. и др., 2017; Белошапко, В.А. и др., 2019; Генералов Е. А. и др., 2022].

Во-первых, одновременное связывание HTLP с двумя рецепторами – Dectin-1 и TLR-6, может происходить синергетично с активацией двух параллельных сигнальных каскадов.

Во-вторых, возможно первичное связывание HTLP с одним из рецепторов, Dectin-1 или TLR-6, с последующей димеризацией или вторичным связыванием с другим рецептором. Первичное связывание, вероятнее всего, происходит с Dectin-1, поскольку активация комплекса TLR-6/TLR-2 может приводить к активации каспазного каскада по CASP8-пути, индуцирующего апоптоз. Однако, экспериментальные данные демонстрируют, что HTLP, наоборот, является колониестимулирующим фактором, что предполагает совместную активацию TLR-6 и рецептора TNF-R1. Такое взаимодействие смещает внутриклеточный сигнальный путь в сторону антиапоптотического TRADD-сигнального каскада посредством TIRAP-Myd88 и мобилизации RIPK и TRAF2.

TRAF2, в свою очередь, активирует протеинкиназу IKK, позволяя серин-треониновой киназе RIPK активировать NF-κB. Ингибирующий белок IκBα, связанный с NF-κB, подвергается фосфорилированию IKK и последующей деградации, что высвобождает NF-κB, который транслоцируется в ядро и запускает транскрипцию генов, участвующих в выживании, пролиферации, воспалении и продукции антиапоптотических факторов. Кроме того, TNF-α может усиливать пролиферацию через JNK-сигнальный путь и активацию AP-1, однако, совместная активация TLR-6 и Dectin-1, вероятно, способствует активации преимущественно NF-κB-пути. Совместное действие Dectin-1 и TLR-6, активируемых HTLP, приводит к усилению противоопухолевого ответа, за счет активации NF-κB и продукции цитокинов. При этом, инфламмасомный путь активации макрофагов, опосредованный рецептором CR3, не вовлечен во взаимодействие с HTLP.

В-третьих, существует гипотетическая возможность существования еще одного или нескольких рецепторов, для которых HTLP выступает лигандом, но при этом оба – Dectin-1 и TLR-6 – необходимы для реализации внутриклеточных сигнальных каскадов. Однако, многокомпонентные системы менее стабильны, что делает такую гипотезу менее вероятной. Скорость наработки TNF-α (4 часа) и скорость миграции рецепторов, позволяют предположить, что происходит быстрая активация клетки с последующим распадом комплекса полисахарид-рецепторы и постепенной деградацией полисахарида.

Любые из описанных выше способов взаимодействия HTLP с рецепторами приводят к повышению продукции TNF-α, что было подтверждено в различных экспериментальных моделях. Модуляция уровней IL-1β и стимуляция продукции IL-6, вероятно, приводят к стабилизации баланса между про- и противовоспалительным ответом. Совместное действие IL-1 и TNF-α, а также активация p50–p65, формируют петлю положительной обратной связи по NF-κB-пути. IL-6 и TNF-α, в зависимости от активности АКТ, могут вызывать апоптоз или пролиферацию клеток. TNF-α может активировать АКТ, ингибируя апоптоз.

Для STP можно предположить наличие другого молекулярного и биохимического механизма действия. Так, например, для оценки противовоспалительного действия полисахарида STP была использована модель LPS-индуцированного воспаления в макрофагоподобных клетках THP-1. Стимуляция клеток LPS приводит к значительному увеличению экспрессии провоспалительных генов, в частности IL-6, TNF и IL1β. Последующая обработка клеток STP в концентрациях дозозависимо снижала экспрессию этих провоспалительных генов. В контексте вирусных инфекций, таких как COVID-19, дисрегуляция продукции цитокинов, включая IL-6 и TNF, может приводить к развитию «цитокинового шторма», усугубляющего течение заболевания. Модуляция продукции этих

провоспалительных цитокинов может иметь существенное значение для снижения патологического воспаления при вирусных инфекциях и сопутствующих заболеваниях. Кроме того, цитокины, такие как IL-1 β , IL-6, TNF играют роль в повреждении слизистой оболочки желудка при воспалении, поэтому уменьшение их экспрессии под действием STP может способствовать восстановлению тканей и уменьшению риска осложнений. Одновременная стимуляция экспрессии противовоспалительного гена IL-10 позволяет снизить уровень повреждения тканей, что и было подтверждено в моделях язв по методу Селье и Окабэ.

Помимо влияния на экспрессию воспалительных медиаторов, STP оказывал модулирующее действие на гены, связанные с окислительным стрессом и апоптозом. Изменения в экспрессии этих генов является основой биологической активности *in vivo* STP в модели коронавирусной инфекции у сирийских золотистых хомячков, где наблюдалось быстрое снижение вирусного титра, вкупе с восстановлением паренхимы легких.

Представленные данные демонстрируют комплексный, многофакторный механизм действия STP, который проявляется в подавлении провоспалительных сигналов, активации защитных механизмов клетки через усиление экспрессии противовоспалительных факторов, а также модуляции генов, связанных с окислительным стрессом и апоптозом.

Для применения полисахаридов в биомедицинских целях необходимо сперва установить спектр потенциальной биологической активности полисахаридных комплексов из растительного сырья и возможные биохимические механизмы ее реализации. Зачастую биологическая активность грубых экстрактов известна из практики традиционной медицины, что позволяет сузить круг используемых *in vivo* или *in vitro* моделей. При этом, стоит учитывать, что для препаратов с непрямым механизмом активности модели должны включать в себя задействованные в ее реализации системы организма (например, иммунная, эндокринная и др.). Следующим этапом логически представляется выделение и очистка, для получения максимально гомогенных препаратов с максимальной степенью очистки, при сохранении целевой биологической активности, на которую необходимо тестировать после каждого этапа очистки. Полученное вещество или комплекс веществ следует физико-химически описать и установить основные свойства, участвующие в реализации биологической активности. На основании полученных свойств можно провести анализ предполагаемых клеточных механизмов активности – мембранный, рецепторный, трансмембранный и т.д., что позволит установить влияние на геном, метаболит или транскриптом. Данные транскриптомного, геномного и рецепторного анализа позволяют выбрать направление дальнейших исследований реализации других видов биологической активности исследуемого вещества.

Настоящая работа основана на разработанном методологическом подходе исследования полисахаридов, включающем в себя спектральные, физико-химические, доклинические и молекулярно-генетические подходы, позволившие выдвинуть экспериментально и теоретически обоснованную гипотезу о биохимических основах биомедицинского применения полисахаридов, выделенных из клубненосных растений.

В настоящей работе на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, которые играют важную роль в теоретической гликобиологии и вносят вклад в решение важной научной проблемы, имеющей большое социально-экономическое и хозяйственное значение, изложены новые научно обоснованные решения, имеющие существенные биомедицинские перспективы.

5. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Впервые выделены и охарактеризованы биологически активные фракции полисахаридов из *Helianthus tuberosus* L. и *Solanum tuberosum* L., названные HTLP и STP, соответственно. HTLP – это гетеро- β -гликан с молекулярной массой 1–2 МДа, содержащий β -(1→4)- и β -(1→3)-гликозидные связи и 0,5% белка. STP – полисахаридный комплекс молекулярной массой 70 ± 10 кДа, состоящий из гетеро- β -гликана, содержащий β -(1→4)-гликозидные связи, и до 9% белка. В обоих случаях гликозидные связи определяли биологическую активность полисахаридов.
2. Показано, что HTLP и STP – иммунологически активные полисахариды, по-разному регулирующие иммунный ответ. HTLP и STP статистически значимо стимулируют и АОК, и клеточность селезенки. Коэффициент стимуляции антителообразования в селезенке колебался для STP в интервале 2,1–5,3, а HTLP 4,3–19,7. STP и HTLP проявляли противовоспалительную активность в модели каррагинанового отека. В модели формалинового отека HTLP достоверно проявлял противовоспалительную активность, а STP не проявлял активности. STP в модели карманной гранулемы проявляет ярко выраженное антиэкссудативное действие, превосходящее HTLP в 1,4 раза.
3. HTLP активирует цитотоксические Т-лимфоциты, макрофаги и естественные киллеры, стимулирует выработку TNF- α и IL-6 и модулирует IL-1 β , проявляет противоопухолевые и радиозащитные свойства. STP является противовоспалительным, но не анальгезирующим средством, ингибируя экспрессию провоспалительных генов IL1, IL6, TNF, BAX и NF κ B, стимулируя экспрессию IL10, NRF2, BCL2 после ЛПС активации клеток THP1. При этом STP

не обладает цитотоксичностью, проявляет адъювантные свойства, обладает регенераторно-репараторными, противовоспалительными и противовирусными свойствами.

4. По результатам исследования STP и HTLP сформулированы основополагающие теоретические и методические подходы для изучения возможных механизмов действия и биохимических основ биологической активности природных полисахаридов. На основании использования этих подходов было установлено, что для реализации биологической активности HTLP необходимы рецепторы Dectin-1 и TLR-6. Вместе с тем, STP реализует свою биологическую активность посредством ингибирования экспрессии генов провоспалительных цитокинов IL1, IL6 и TNF, проапоптотического BAX и стимуляции – противовоспалительного IL10, регулятора антиоксидантного ответа NRF2, антиапоптотического BCL2. Для HTLP наблюдалось увеличение экспрессии генов IL1B, IL6, IL10, IL12B, IL23, CD80, CD274, TNF.

Список сокращений

- 4-SO₄-GalNAc – сульфатированный N-ацетилгалактозамин
- AIC – информационный критерий Акаике
- Ala – аланин
- APS – полисахарид из *Astragalus*
- Ara – арабиноза
- Arg – аргинин
- ASGPR – рецептор асгиалопротеин
- Asp – аспарагиновая кислота
- BAX – Bcl-2-ассоциированный X-белок
- BCL2 – В-клеточная лимфома 2
- BCR – В-клеточный рецептор
- BDCA2 – антиген 2 дендритных клеток крови
- BIR – домен ингибирования апоптоза
- cAMP – цАМФ
- CARD – домен активации каспаз
- CD – кластер дифференцировки
- CI – индекс цитотоксичности
- CLEC – лектиноподобный рецептор С-типа
- CLECSF8 – суперсемейство 8 лектинов С-типа
- CR – цистеин богатый домен
- CR3 – рецептор комплемента 3
- CRD – углевод-распознающий домен
- CSF – колониестимулирующий фактор
- CTLD – С-типа-лектин-подобный домен
- CTLR – лектиновый рецептор С-типа
- Cys – цистеин
- DAG – диацилглицерин
- DAMPs – молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями
- DCAR – рецептор активации дендритных клеток
- DCIR – иммунорецептор дендритных клеток
- DED – домена эффектора смерти
- ERK – внеклеточная киназа, регулируемая сигналами
- FcR γ – γ -цепью Fc-рецептора

- FNII – фибронектиноподобный домен типа II
- GAG – гликозаминогликан
- Gal – галактоза
- GalAc – галактуроновая кислота
- GalNAc – N-ацетилгалактозамина
- GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
- GBP – гликансвязывающие белки
- Glc – глюкоза
- GlcAc – глюкуроновая кислота
- GlcNAc – N-ацетилглюкозамин
- Glu – глутаминовая кислота
- Gly – глицин
- GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- GPCR – G-белок-сопряженные рецепторы
- GPI – гликозилфосфатидилинозитол
- His – гистидин
- HTLP – полисахарид из *Helianthus tuberosus L.*
- IFN – интерферон
- Ig – иммуноглобулин
- II – индекс ингибирования
- IKK – киназа IκB
- IRAK – киназа, ассоциированная с рецептором IL-1
- IL – интерлейкин
- ILC – врожденные лимфоидные клетки
- Ile – изолейцин
- IP3 – инозитол-1,4,5-трифосфат
- ITAM – иммунорецепторные тирозин-активационные мотивы
- Leu – лейцин
- lgTCID – логарифм тканевой цитопатической инфекционной дозы
- LLC – карцинома легких Льюиса
- LOX-1 – лектиноподобный рецептор окисленных липопротеинов низкой плотности-1
- LPS – липополисахарид
- LRR – лектин богатый рецептор
- Lys – лизин

M – среднее арифметическое
 Man – манноза
 ManNAc – N-ацетилманнозамина
 MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа
 MBL – манозосвязывающий белок
 MCL – макрофагальный лектин C-типа
 MD-2 – фактор дифференцировки миелоидных клеток 2
 MDP – мурамилдипептид
 MGL – макрофагальный лектин галактозного типа
 MHC – главный комплекс гистосовместимости
 Mincle – лектин C-типа, индуцированный макрофагами
 MR – маннозный рецептор
 NFkB – ядерный фактор kB
 NK – натуральные киллеры
 NLR – Nod-подобный рецептор
 NO – оксид азота
 Nox-4 – НАДФН-оксидаза 4
 NRF – ядерный респираторный фактор
 OspA – внешний поверхностный белок A из *Borrelia burgdorferi*
 oxLDL – окисленный липопротеин низкой плотности
 PAF – фактор активации тромбоцитов
 PAMPs – патоген-ассоциированный молекулярный фрагмент молекул
 PBS – фосфатно-солевой буфер
 Phe – фенилаланин
 PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа
 PKC – протеинкиназы C
 PLA2 – рецептор фосфолипазы A2
 PLC γ – фосфолипаза C γ
 PLGA – поли-(D-L-молочно-гликолевая кислота)
 PLNA – анализ подколенных лимфатических узлов
 PRR – паттерн-распознающие рецепторы
 PYD – пириновый домен
 RG – рамногалактуронан
 Rha – рамноза
 RISC – РНК-индуцированный комплекс выключения генов

ROS (АФК) – активные формы кислорода
 RTL – лектин R-типа
 SD – стандартное отклонение
 SEM – стандартная ошибка среднего
 Ser – серин
 SERS – поверхностно-усиленной Рамановской спектроскопии
 shPHK – small hairpin RNA, малая шпилечная РНК
 siRNA – малой интерферирующей РНК
 SOD-1 – супероксиддисмутаза 1
 SR – рецептор «мусорщик»
 SR – рецептор-мусорщик
 STP – полисахарид из *Solanum tuberosum L.*
 Tcyt – Т-цитотоксические
 TGF – трансформирующий фактор роста
 Th – Т-хелперы
 Thr – треонин
 TLR – Toll-подобный рецептор
 TNF – фактор некроза опухоли
 Treg – Т-регуляторные
 Tyr – тирозин
 Tyv – тивелоза
 Val – валин
 VEGF – фактор роста эндотелия сосудов
 Xyl – ксилоза
 β -GlcCer – β -глюкозилцерамид
 АД – артериальное давление
 АОК – антителобразующие клетки
 АСМ – атомно-силовой микроскопии
 АТФ – аденозинтрифосфат
 АФК (ROS) – активные формы кислорода
 ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
 ВМ – внеклеточного матрикса
 ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
 ГЖХ – газожидкостная хроматография
 ГПХ – гельпроникающая хроматография

ДК – дендритные клетки
 ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
 ИК – инфракрасный
 КД – круговой дихроизм
 К_м – массовый коэффициент
 КОЕ-С – клетки: колониеобразующие единицы в селезенке
 К_{ст} – коэффициент стимуляции
 КТР – коэффициент торможения роста опухоли
 ЛД – летальная доза
 ЛПС – липополисахарид
 ЛПК – лимфоциты периферической крови
 ММ – молекулярная масса
 МПК – мононуклеары периферической крови
 МТТ – 3,4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолия
 НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
 ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени
 ПЭ – перестановочная энтропия
 ПЭГ – полиэтиленгликоль
 РСВ – респираторно-синцитиальный вирус
 УФ - ультрафиолетовый
 ЦНС – центральная нервная система
 ЧДД – частота дыхательных движений
 ЭБ – эритроциты барана
 ЭКГ – электрокардиография
 ЭШХ – энтропия Шеннона–Хинчина
 ЯИ – язвенный индекс

Список терминов

GAG – ген структурного белка капсида
 REV – ген регулятора экспрессии вирионных белков
 VSVG – ген гликопротеина G вируса везикулярного стоматита
 RAW 264.7 – макрофагальная клеточная линия (лейкемия макрофагов мыши)
 THP-1 – моноцитарная клеточная линия (острая моноцитарная лейкемия человека)
 DMEM – среда Dulbecco's Modified Eagle Medium

Vero CCL-81 – клеточная линия эпителия почки, взятой у африканской зеленой мартышки

K562 – иммортализованная линия клеток миелогенной лейкемии человека,

ЛХС-1269 – производное N-гликозида индоло[2,3-а]карбазола

HaCaT – спонтанно трансформированная линия анеуплоидных бессмертных кератиноцитов кожи взрослого человека

HT-29 – клетки колоректальной аденокарциномы толстой кишки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abu-Lail, N. I. Polysaccharide properties probed with atomic force microscopy / N. I. Abu-Lail, T. A. Camesano // *J. Microsc.* – 2003. – Vol. 212, Pt 3. – P. 217-238.
2. Afoakwah, N. A. Biological functionality and characteristics of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tuber extracts / N. A. Afoakwah, Y. Zhao, Y. Dong // *Acta Alimentaria.* – 2023. – Vol. 52, № 1. – P. 12-26.
3. Ahmad Raus, R. Alginate and alginate composites for biomedical applications / R. Ahmad Raus, W. M. F. Wan Nawawi, R. R. Nasaruddin // *Asian J. Pharm. Sci.* – 2021. – Vol. 16, № 3. – P. 280-306.
4. Ahmmed, M. K. An Update of Lectins from Marine Organisms: Characterization, Extraction Methodology, and Potential Biofunctional Applications / M. K. Ahmmed, S. Bhowmik, S. G. Giteru [et al.] // *Marine Drugs.* – 2022. – Vol. 20, № 7. – P. 430.
5. Ajithdoss, D. K. A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development / D. K. Ajithdoss; ed. by S. Ali Faqi. – Third Edition. – USA : ASF Scientific Solutions, MI, 2024. – P. 1072.
6. Akaike H. A new look at the statistical model identification / H. Akaike // *IEEE Transactions on Automatic Control.* 1974. Vol. AC-19. P. 716-723.
7. Akhmadullina, Y. R. Study of the DNA Damage in Peripheral Blood Lymphocytes Using Micronucleus Test in Residents of the Techa Riverside Villages Who Were Chronically Exposed in Utero and Postnatally / Y. R. Akhmadullina, A. V. Vozilova, A. V. Akleyev // *Russ. J. Genet.* – 2020. – Vol. 56. – P. 481-487.
8. Akter, A. Seaweed polysaccharides: Sources, structure and biomedical applications with special emphasis on antiviral potentials / A. Akter, M. K. A. Sobuj, M. S. Islam [et al.] // *Future Foods.* – 2024. – Vol. 10. – P. 100440.
9. Aleksanyan, K. V. Polysaccharides for Biodegradable Packaging Materials: Past, Present, and Future (Brief Review) / K. V. Aleksanyan // *Polymers.* – 2023. – Vol. 15, № 2. – P. 451.
10. Alquraini, A. Scavenger receptors / A. Alquraini, J. El Khoury // *Curr. Biol.* – 2020. – Vol. 30, № 14. – P. R790-R795.
11. Amiel, E. Pivotal Advance: toll like receptor regulation of scavenger receptor A mediated phagocytosis / E. Amiel, A. Alonso, S. Uematsu [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2009. – Vol. 85. – P. 595–605.

12. Arnold, J. N. Tinker, tailor, soldier, cell: the role of C-type lectins in the defense and promotion of disease / J. N. Arnold, D. A. Mitchell // *Protein Cell.* – 2022. – Vol. 14, № 1. – P. 4-16.
13. Arora, K. Exploring glycans as vital biological macromolecules: A comprehensive review of advancements in biomedical frontiers / K. Arora, P. M. Sherilraj, K. A. Abutwaibe [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2024. – Vol. 268, Pt 1. – P. 131511.
14. Avni, O. Complement receptor 3 of macrophages is associated with galectin-1-like protein / O. Avni [et al.] // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 160, № 12. – P. 6151-6158.
15. Aziz, T. A Review on the Modification of Cellulose and Its Applications / T. Aziz, A. Farid, F. Haq [et al.] // *Polymers.* – 2022. – Vol. 14, № 15. – P. 3206.
16. Babu, S. Bioactive constituents of the genus Aloe and their potential therapeutic and pharmacological applications: A review ARTICLE INFO / S. Babu, A. Noor // *J. Appl. Pharm. Sci.* – 2020.
17. Bai, Y. A New Biomaterial Derived from Aloe vera-Acemannan from Basic Studies to Clinical Application / Y. Bai, Y. Niu, S. Qin, G. Ma // *Pharmaceutics.* – 2023. – Vol. 15, № 7. – P. 1913.
18. Balch, S. G. Cloning of a Novel C-Type Lectin Expressed by Murine Macrophages* / S. G. Balch, A. J. McKnight, M. F. Seldin, S. Gordon // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 29. – P. 18656–18664.
19. Banerjee, S. Dextran-based scaffolds for in-situ hydrogelation: Use for next generation of bioartificial cardiac tissues / S. Banerjee, M. Szepes, N. Dibbert [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2021. – Vol. 262. – P. 117924.
20. Bangar, N. S. Understanding the role of glycation in the pathology of various non-communicable diseases along with novel therapeutic strategies / N. S. Bangar, A. Gvalani, S. Ahmad [et al.] // *Glycobiology.* – 2022. – Vol. 32, № 12. – P. 1068–1088.
21. Barreto, J. Role of LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1) as a cardiovascular risk predictor / J. Barreto, S. K. Karathanasis, A. Remaley, A. C. Sposito // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2020. – Vol. 41. – P. 153–166.
22. Benalaya, I. A Review of Natural Polysaccharides: Sources, Characteristics, Properties, Food, and Pharmaceutical Applications / I. Benalaya, G. Alves, J. Lopes, L. R. Silva // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol. 25, № 2. – P. 1322.
23. Benhamou, A. A. Elaboration of carboxylated cellulose nanocrystals filled starch-based adhesives for the manufacturing of eco-friendly particleboards /

- A. A. Benhamou, A. Boussetta, Z. Kassab [et al.] // *Constr. Build. Mater.* – 2022. – Vol. 348. – P. 128683.
24. Bernfeld, P. Amylases, α and β / P. Bernfeld // *Methods in Enzymology.* – 1955. – Vol. 1. – P. 149-158.
 25. Berzi, A. Pseudo-Mannosylated DC-SIGN Ligands as Immunomodulants / A. Berzi, S. Ordanini, B. Joosten [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 35373.
 26. Bidula, S. Ficolins and the Recognition of Pathogenic Microorganisms: An Overview of the Innate Immune Response and Contribution of Single Nucleotide Polymorphisms / S. Bidula, D. W. Sexton, S. Schelenz // *J. Immunol. Res.* – 2019. – P. 3205072.
 27. Bilal, M. Polysaccharides-based bio-nanostructures and their potential food applications / M. Bilal, I. Gul, A. Basharat, S. A. Qamar // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2021. – Vol. 176. – P. 540-557.
 28. Biswas, M. C. Recent advancement of biopolymers and their potential biomedical applications / M. C. Biswas, B. Jony, P. K. Nandy [et al.] // *J. Polym. Environ.* – 2022. – Vol. 30. – P. 51-74.
 29. Bohn, J. A. (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships / J. A. Bohn, J. Bemiller // *Carbohydr. Polym.* – 1995. – Vol. 28. – P. 3–14.
 30. Borsani, B. The Role of Carrageenan in Inflammatory Bowel Diseases and Allergic Reactions: Where Do We Stand? / B. Borsani, R. De Santis, V. Perico [et al.] // *Nutrients.* – 2021. – Vol. 13, № 10. – P. 3402.
 31. Bourne, J. H. CLEC-2 Prevents Accumulation and Retention of Inflammatory Macrophages During Murine Peritonitis / J. H. Bourne, N. Beristain-Covarrubias, M. Zuidscherwoude [et al.] // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 693974.
 32. Brosseau, L.M. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Dose, Infection, and Disease Outcomes for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review / L. M. Brosseau, K. Escandón, A. K. Ulrich [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2022. – Vol. 75, № 1. – P. e1195–e1201.
 33. Burgess, M. The Immune and Regenerative Response to Burn Injury / M. Burgess, F. Valdera, D. Varon [et al.] // *Cells.* – 2022. – Vol. 11, № 19. – P. 3073.
 34. Busold, S. Various Tastes of Sugar: The Potential of Glycosylation in Targeting and Modulating Human Immunity via C-Type Lectin Receptors / S. Busold, N. A. Nagy, S. W. Tas [et al.] // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 134.

35. Cai, Y. Exploration of the Dual Role of Dectin-1 in tumor development and its therapeutic potential / Y. Cai, K. Wu // *Curr. Oncol.* – 2024. – Vol. 31, № 11. – P. 7275-7286.
36. Cai, G. Structure of a Pueraria Root Polysaccharide and Its Immunoregulatory Activity on T and B lymphocytes, macrophages, and immunosuppressive mice / G. Cai, C. Wu, T. Zhu [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2023. – Vol. 230. – P. 123386.
37. Caminschi, I. Functional comparison of mouse CIRE/mouse DC-SIGN and human DC-SIGN / I. Caminschi, A. J. Corbett, C. Zahra [et al.] // *Int. Immunol.* – 2006. – Vol. 18, № 5. – P. 741-753.
38. Caprificio, A.E. Advances in Chitosan-Based CRISPR/Cas9 Delivery Systems / P.J.S. Foot, E. Polycarpou, G. Calabrese // *Pharmaceutics.* – 2022. – Vol. 14, № 9. – P. 1840.
39. Caterson, B. Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability / B. Caterson, J. Melrose // *Glycobiology.* – 2018. – Vol. 28, № 4. – P. 182-206.
40. Chaisuwan, W. The Antiviral Activity of Bacterial, Fungal, and Algal Polysaccharides as Bioactive Ingredients: Potential Uses for Enhancing Immune Systems and Preventing Viruses / W. Chaisuwan, Y. Phimolsiripol, T. Chaiyaso [et al.] // *Front. Nutr.* – 2021. – Vol. 8. – P. 772033.
41. Chang, X. Advances in Chemical Composition, Extraction Techniques, Analytical Methods, and Biological Activity of Astragali Radix / X. Chang, X. Chen, Y. Guo [et al.] // *Molecules.* – 2022. – Vol. 27, № 3. – P. 1058.
42. Chatterjee, S. Convergence: Lactosylceramide-Centric Signaling Pathways Induce Inflammation, Oxidative Stress, and Other Phenotypic Outcomes / S. Chatterjee, A. Balram, W. Li // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 4. – P. 1816.
43. Chen, J. Solanum tuberosum lectin-conjugated PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: in vivo and in vitro evaluations / J. Chen, C. Zhang, Q. Liu [et al.] // *J. Drug Target.* – 2012. – Vol. 20, № 2. – P. 174-184.
44. Chen, J-Y. Modulation of calcium oxalate crystal growth and protection from oxidatively damaged renal epithelial cells of corn silk polysaccharides with different molecular weights / J-Y. Chen, X-Y. Sun, J-M. Ouyang // *Oxid. Med. Cell. Longevity.* – 2020. – P. 1-19.
45. Chen, M. H. Antibody blockade of Dectin-2 suppresses house dust mite-induced Th2 cytokine production in dendritic cell- and monocyte-depleted peripheral blood mononuclear cell co-cultures from asthma patients / M. H. Chen, M. T. Huang, W. K. Yu [et al.] // *J. Biomed. Sci.* – 2019. – Vol. 26, № 1. – P. 97.

46. Chen, X. Recent advance in chemistry modified methods of natural polysaccharides and their applications / X. Chen, M. Shen, Q. Yu [et al.] // Trends Food Sci. Technol. – 2024. – Vol. 144. – P. 104317.
47. Chen, Y. J. Preparation, structural characterization, biological activity, and nutritional applications of oligosaccharides / Y. J. Chen, X. Sui, Y. Wang [et al.] // Food Chem. X. – 2024. – Vol. 22. – P. 101289.
48. Chen, Z. Four Decades After the Discovery of Regenerating Islet-Derived (Reg) Proteins: Current Understanding and Challenges / Z. Chen, S. Downing, E. S. Tzanakakis // Front. Cell Dev. Biol. – 2019. – Vol. 7. – P. 235.
49. Chia, K. S. Taking the lead: NLR immune receptor N-terminal domains execute plant immune responses / K. S. Chia, P. Carella // New Phytol. – 2023. – Vol. 240, № 2. – P. 496-501.
50. Chiba, S. Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses / S. Chiba, H. Ikushima, H. Ueki [et al.] // Elife. – 2014. – Vol. 3. – P. e04177.
51. Chiffolleau, E. C-Type Lectin-Like Receptors As Emerging Orchestrators of Sterile Inflammation Represent Potential Therapeutic Targets / E. Chiffolleau // Front. Immunol. – 2018. – Vol. 9. – P. 227.
52. Chiricozzi, E. Direct interaction, instrumental for signaling processes, between LacCer and Lyn in the lipid rafts of neutrophil-like cells / E. Chiricozzi, M. G. Ciampa, G. Brasile [et al.] // J. Lipid Res. – 2015. – Vol. 56, № 1. – P. 129-141.
53. Choi, J. Y. High Galacto-Oligosaccharide Production and a Structural Model for Transgalactosylation of β -Galactosidase II from *Bacillus circulans* / J. Y. Choi, H. Hong, H. Seo [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2020. – Vol. 68, № 47. – P. 13806-13814.
54. Chou, F. C. Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy / F. C. Chou, H. Y. Chen, C. C. Kuo, H. K. Sytwu // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – Vol. 19, № 2. – P. 430.
55. Clark, E. A. CD22: A Regulator of Innate and Adaptive B Cell Responses and Autoimmunity / E. A. Clark, N. V. Giltiay // Front. Immunol. – 2018. – Vol. 9. – P. 2235.
56. Clarke, D. Dectin-2 sensing of house dust mite is critical for the initiation of airway inflammation / D. Clarke, N. Davis, C. Champion [et al.] // Mucosal Immunol. – 2014. – Vol. 7. – P. 558–567.
57. Coënon, L. Natural Killer cells at the frontline in the fight against cancer / L. Coënon, M. Geindreau, F. Ghiringhelli [et al.] // Cell Death Dis. – 2024. – Vol. 15. – P. 614.

58. Colleselli, K. An Update on Toll-like receptor 2, its function and dimerization in pro- and anti-inflammatory processes / K. Colleselli, A. Stierschneider, C. Wiesner // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24, № 15. – P. 12464.
59. Collins, B. E. Sialic acid specificity of myelin-associated glycoprotein binding / B. E. Collins, L. J. Yang, G. Mukhopadhyay [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 2. – P. 1248-1255.
60. Collins, G.S. Transparent reporting of a multivariable prediction model for individual prognosis or diagnosis (TRIPOD): the TRIPOD statement / G. S. Collins, J. B. Reitsma, D. G. Altman, K. G. Moons // *Br J Cancer.* – 2015. – Vol. 112, № 2. – P. 251–259.
61. Córdova-Martínez, A. β -Glucans Could Be Adjuvants for SARS-CoV-2 Virus Vaccines (COVID-19) / A. Córdova-Martínez, A. Caballero-García, E. Roche, D. C. Noriega // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2021. – Vol. 18, № 23. – P. 12636.
62. Cox, D. R.; Oakes, D. *Analysis of Survival Data: монография.* New York: Chapman & Hall, 1984. 201 p. ISBN 978-0412244902.
63. Cramer, J. Medicinal chemistry of the myeloid C-type lectin receptors Mincle, Langerin, and DC-SIGN / J. Cramer // *RSC Med. Chem.* – 2021. – Vol. 12, № 12. – P. 1985–2000.
64. Cui, F. J. A Macromolecular α -Glucan from Fruiting Bodies of *Volvariella volvacea* Activating RAW264. 7 Macrophages through MAPKs Pathway / F. J. Cui, L. H. Jiang, L. S. Qian [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2020. – Vol. 230. – P. 115674.
65. Cummings, R. D. R-Type Lectins / R. D. Cummings, R. L. Schnaar, Y. Ozeki // *Essentials of Glycobiology* [Internet]; ed. by A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko [et al.]. – 4th ed. – Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022.
66. Cummings, R. D. The mannose receptor ligands and the macrophage glycome / R. D. Cummings // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2022. – Vol. 75. – P. 102394.
67. Dahiya, D. Dextran of Diverse Molecular-Configurations Used as a Blood-Plasma Substitute, Drug-Delivery Vehicle and Food Additive Biosynthesized by *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Weissella* / D. Dahiya, P. S. Nigam // *Appl. Sci.* – 2023. – Vol. 13, № 22. – P. 12526.
68. Daley, D. Dectin 1 activation on macrophages by galectin 9 promotes pancreatic carcinoma and peritumoral immune tolerance / D. Daley, V. R. Mani, N. Mohan [et al.] // *Nat. Med.* – 2017. – Vol. 23, № 5. – P. 556–567.

69. Dam, J. E. G. Polysaccharides in human health care / J. E. G. Dam, L. A. M. Van, V. Den Broek, C. G. Boeriu // *Nat. Prod. Commun.* – 2017. – Vol. 12, № 6. – P. 821–830.
70. de la Fuente, D. Oviductin sets the species-specificity of the mammalian zona pellucida / D. de la Fuente, M. Maroto, Y. N. Cajas [et al.] // *bioRxiv.* – 2024. – P. 2024.07.01.601502.
71. Deerhake, M. E. Emerging roles of Dectin-1 in noninfectious settings and in the CNS / M. E. Deerhake, M. L. Shinohara // *Trends Immunol.* – 2021. – Vol. 42, № 10. – P. 891-903.
72. Del Cornò, M. Shaping the Innate Immune Response by Dietary Glucans: Any Role in the Control of Cancer? / M. Del Cornò, S. Gessani, L. Conti // *Cancers.* – 2020. – Vol. 12, № 1. – P. 155.
73. del Fresno, C. Flexible Signaling of Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Inflammation / C. del Fresno, S. Iborra, P. Saz-Leal [et al.] // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 804.
74. Delgado, J.F. Development of innovative biodegradable films based on biomass of *Saccharomyces cerevisiae* / J.F. Delgado, P. Sceni, M. A. Peltzer [et al.] // *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* – 2016. – Vol. 36. – P. 83-91.
75. Delneste, Y. [Innate immunity: structure and function of TLRs] / Y. Delneste, C. Beauvillain, P. Jeannin // *Med. Sci. (Paris).* – 2007. – Vol. 23, № 1. – P. 67–73.
76. den Dunnen, J. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses / J. den Dunnen, S. I. Gringhuis, T. B. Geijtenbeek // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2009. – Vol. 58, № 7. – P. 1149–1157.
77. Dhakal, S. Resistant starch type-4 intake alters circulating bile acids in human subjects / S. Dhakal, M. Dey // *Front. Nutr.* – 2022. – Vol. 9. – P. 930414.
78. Di Sotto, A. Plant-Derived Nutraceuticals and Immune System Modulation: An Evidence-Based Overview / A. Di Sotto, A. Vitalone, S. Di Giacomo // *Vaccines (Basel).* – 2020. – Vol. 8, № 3. – P. 468.
79. Díaz-Montes, E. Polysaccharides: sources, characteristics, properties, and their application in biodegradable films / E. Díaz-Montes // *Polysaccharides.* – 2022. – Vol. 3, № 3. – P. 480–501.
80. Diener, M. Primary, secondary, tertiary and quaternary structure levels in linear polysaccharides: From random coil, to single helix to supramolecular assembly / M. Diener, J. Adamcik, A. Sánchez-Ferrer [et al.] // *Biomacromolecules.* – 2019. – Vol. 20, № 4. – P. 1731–1739.

81. Diller, R. B. The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review / R. B. Diller, A. J. Tabor // *Biomimetics* (Basel). – 2022. – Vol. 7, № 3. – P. 87.
82. Ding, J. β -Glucan enhances cytotoxic T lymphocyte responses by activation of human monocyte-derived dendritic cells via the PI3K/AKT pathway / J. Ding, T. Feng, Y. Ning [et al.] // *Hum. Immunol.* – 2015. – Vol. 76, № 2-3. – P. 146-154.
83. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes [Электронный ресурс] // FAOLEX. – URL: <https://www.fao.org/faolex/results/details/ru/c/LEX-FAOC098296/> (дата обращения: 16.08.2024).
84. Domalik-Pyzik, P. Chitosan-Based Hydrogels: Preparation, Properties, and Applications / P. Domalik-Pyzik, J. Chłopek, K. Pielichowska // *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels* / ed. by M. Mondal. – Cham : Springer, 2019.
85. Du, B. A narrative review on conformational structure characterization of natural polysaccharides / B. Du, S. Nie, F. Peng [et al.] // *Food Frontiers*. – 2022. – Vol. 3. – P. 631–640.
86. Duan, T. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity / T. Duan, Y. Du, C. Xing [et al.] // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 812774.
87. Dubois, M. Colorimetric method of determination of sugars and related substances / M. Dubois, K. A. Giles, J. K. Hamilton [et al.] // *Anal. Chem.* – 1956. – Vol. 28. – P. 350-356.
88. Galun, E. The regenerative activity of interleukin-6 / E. Galun, S. Rose-John // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 982. – P. 59–77.
89. Ebrahim, A. H. Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy / A. H. Ebrahim, Z. Alalawi, L. Mirandola [et al.] // *Ann. Transl. Med.* – 2014. – Vol. 2, № 9. – P. 88.
90. Ehlers, M. R. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity / M. R. Ehlers // *Microbes Infect.* – 2000. – Vol. 2, № 3. – P. 289-294.
91. El-Zayat, S. R. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview / S. R. El-Zayat, H. Sibaii, F. A. Mannaa // *Bull. Natl. Res. Cent.* – 2019. – Vol. 43. – P. 187.
92. Engster, M. / M. Engster, R. Abraham // *Toxicor. Appt. pharmacor.* – 1976. – Vol. 3s. – P. 265-282.
93. Evans, S. E. Primary alveolar epithelial cell surface membrane microdomain function is required for *Pneumocystis* β -glucan-induced inflammatory responses / S. E. Evans,

- T. J. Kottom, R. E. Pagano, A. H. Limper // *Innate Immun.* – 2012. – Vol. 18, № 5. – P. 709-716.
94. Fakhri, V. Polysaccharides as eco-friendly bio-adsorbents for wastewater remediation: Current state and future perspective / V. Fakhri, A. Jafari, F. L. Vahed [et al.] // *J. Water Process Eng.* – 2023. – Vol. 54. – P. 103980.
 95. Falch, B. H. The cytokine stimulating activity of (1→3)-beta-D-glucans is dependent on the triple helix conformation / B. H. Falch, T. Espevik, L. Ryan, B. T. Stokke // *Carbohydr. Res.* – 2000. – Vol. 329, № 3. – P. 587-596.
 96. Fällman, M. Signaling properties of CR3 (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsonized particles / M. Fällman, R. Andersson, T. Andersson // *J. Immunol.* – 1993. – Vol. 151, № 1. – P. 330-338.
 97. Fan, J. Structural Characterization and Immunoenhancing Properties of Polysaccharide CPTM-P1 from *Taxus media* / J. Fan, X. Huang, M. Dou [et al.] // *Molecules.* – 2024. – Vol. 29, № 6. – P. 1370.
 98. Fang, Z. Stimuli-responsive heparin-drug conjugates co-assembled into stable nanomedicines for cancer therapy / Z. Fang, L. Lin, Z. Li [et al.] // *Acta Biomater.* – 2023. – Vol. 164. – P. 422-434.
 99. Feinberg, H. Structural analysis of carbohydrate binding by the macrophage mannose receptor CD206 / H. Feinberg, S. A. F. Jégouzo, Y. Lasanajak [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2021. – Vol. 296. – P. 100368.
 100. Feinberg, H. Common polymorphisms in human langerin change specificity for glycan ligands / H. Feinberg, T. J. Rowntree, S. L. Tan [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, № 52. – P. 36762-36771.
 101. Fellenberg, M. Glycan analysis: scope and limitations of different techniques—a case for integrated use of LC-MS(/MS) and NMR techniques / M. Fellenberg, H. N. Behnken, T. Nagel [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2013. – Vol. 405. – P. 7291–7305.
 102. Feng, S. Astragalus polysaccharide enhances the immune function of RAW264.7 macrophages via the NF-κB p65/MAPK signaling pathway / S. Feng, H. Ding, L. Liu [et al.] // *Exp. Ther. Med.* – 2021. – Vol. 21, № 1. – P. 20.
 103. Feng, X. Structural characterization of polysaccharide from yellow sweet potato and ameliorates DSS-induced mice colitis by active GPR41/MEK/ERK 1/2 signaling pathway / X. Feng, C. Du, C. Wang // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2021. – Vol. 192. – P. 278-288.

104. Feng, Z. The model polysaccharide potato galactan is actually a mixture of different polysaccharides / Z. Feng, Z. Lin, H. Tang [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2023. – Vol. 313. – P. 120889.
105. Fitzgerald, K. A. Toll-like Receptors and the Control of Immunity / K. A. Fitzgerald, J. C. Kagan // *Cell.* – 2020. – Vol. 180, № 6. – P. 1044-1066.
106. Floyd, H. Siglec-8. A novel eosinophil-specific member of the immunoglobulin superfamily / H. Floyd, J. Ni, A. L. Cornish [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, № 2. – P. 861-866.
107. Foote, C. A. Endothelial Glycocalyx / C. A. Foote, R. N. Soares, F. I. Ramirez-Perez [et al.] // *Compr. Physiol.* – 2022. – Vol. 12, № 4. – P. 3781-3811.
108. Fotschki, B. Effects of Dietary Addition of a Low-Pectin Apple Fibre Preparation on Rats / B. Fotschki, A. Jurgoński, J. Juśkiewicz [et al.] // *Pol. J. Food Nutr. Sci.* – 2014. – Vol. 64.
109. Franchi, L. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense / L. Franchi, N. Warner, K. Viani, G. Nuñez // *Immunol. Rev.* – 2009. – Vol. 227, № 1. – P. 106-128.
110. Freier, T. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation / T. Freier, H. S. Koh, K. Kazazian, M. S. Shoichet // *Biomaterials.* – 2005. – Vol. 26, № 29. – P. 5872-5878.
111. Gamage, A. Polysaccharide-Based Bioplastics: Eco-Friendly and Sustainable Solutions for Packaging / A. Gamage, P. Thiviya, A. Liyanapathirana [et al.] // *J. Compos. Sci.* – 2024. – Vol. 8, № 10. – P. 413.
112. Gary-Bobo, M. Mannose 6-phosphate receptor targeting and its applications in human diseases / M. Gary-Bobo, P. Nirdé, A. Jeanjean [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 14, № 28. – P. 2945-2953.
113. Gaudette, S. The endothelial glycocalyx: Structure and function in health and critical illness / S. Gaudette, D. Hughes, M. Boller // *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio).* – 2020. – Vol. 30, № 2. – P. 117-134.
114. Gavanji, S. Cytotoxic Activity of Herbal Medicines as Assessed in Vitro: A Review / S. Gavanji, A. Bakhtari, A. C. Famurewa, E. M. Othman // *Chem. Biodivers.* – 2023. – Vol. 20, № 2. – P. e202201098.
115. Geddes, K. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors / K. Geddes, J. Magalhães, S. Girardin // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2009. – Vol. 8. – P. 465–479.

116. Geijtenbeek, T. B. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses / T. B. Geijtenbeek, R. Torensma, S. J. van Vliet [et al.] // *Cell*. – 2000. – Vol. 100, № 5. – P. 575-585.
117. Generalov, E. A. Antimetastatic and tumor growth inhibition activity of polysaccharide from *Helianthus Tuberosus L.* / E. A. Generalov // *ARC J. Cancer Sci.* – 2015. – Vol. 1, № 1. – P. 5-10.
118. Generalov, E. A. Receptor basis of biological activity of polysaccharides / E. A. Generalov, L. V. Yakovenko // *Biophys. Rev.* – 2023. – Vol. 15., № 5. – P. 1209-1222.
119. Generalov, E. Polysaccharide from *Helianthus tuberosus L.* as a Potential Radioprotector / E. Generalov, A. Dyukina, A. Shemyakov [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2024. – Vol. 733. – P. 150442.
120. Generalov, E. et al. Anti-Inflammatory Effects of *Helianthus Tuberosus L.* Polysaccharide and Its Limited Gene Expression Profile / E. Generalov, L. Yakovenko, A. Sinitsyn [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025a. – Vol. 26., № 16. – P. 7885.
121. Generalov, E. et al. Anti-Inflammatory Effects of *Solanum tuberosum L.* Polysaccharide and Its Limited Gene Expression Profile / E. Generalov, I. Grigoryan, V. Minaichev [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025b. – Vol. 26., № 12. – P. 5562.
122. Generalov, E. et al. Immune Basis of Therapeutic Effects of *Solanum tuberosum L.* Polysaccharide on Chronic Peptic Ulcer Healing / E. Generalov, D. Laryushkin, K. Kritskaya [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2025c. – Vol. 18., № 4. – P. 502.
123. Shevelev, A. et al. siRNA Therapeutics for the Treatment of Hereditary Diseases and Other Conditions: A Review / A. Shevelev, N. Pozdniakova, E. Generalov, O. Tarasova // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – Vol. 26., № 17. – P. 8651.
124. Generalova, L. V. Evaluation of the Polysaccharide “Immeran” Activity in Syrian hamsters’ Model of SARS-CoV-2 / L. V. Generalova, D. P. Laryushkin, I. A. Leneva [et al.] // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16. – P. 423.
125. Geurtsen, J. Microbial Glycobiology. Mannose–fucose recognition by DC-SIGN / J. Geurtsen, N. N. Driessen, B. J. Appelmelk // Amsterdam: Elsevier Inc., 2010. – P. 673–695.
126. Ghahremani-nasab, M. Synergistic effect of chitosan-alginate composite hydrogel enriched with ascorbic acid and alpha-tocopherol under hypoxic conditions on the behavior of mesenchymal stem cells for wound healing / M. Ghahremani-nasab,

- N. Akbari-Gharalari, A. Rahmani Del Bakhshayesh [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2023. – Vol. 14. – P. 326.
127. Gibson, P. G. COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre-COVID-19 ARDS / P. G. Gibson, L. Qin, S. H. Pua // *Med. J. Aust.* – 2020. – Vol. 213, № 2. – P. 54-56.
 128. Gieroba, B. Application of Vibrational Spectroscopic Techniques in the Study of the Natural Polysaccharides and Their Cross-Linking Process / B. Gieroba, G. Kalisz, M. Krysa, M. Khalavka, A. Przekora // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24, № 3. – P. 2630.
 129. Girard, R. Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2 / R. Girard, T. Pedron, S. Uematsu [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2003. – Vol. 116. – P. 293–302.
 130. Gomes, L. C. The Effect of Molecular Weight on the Antimicrobial Activity of Chitosan from *Loligo opalescens* for Food Packaging Applications / L. C. Gomes, S. I. Faria, J. Valcarcel [et al.] // *Mar. Drugs.* – 2021. – Vol. 19, № 7. – P. 384.
 131. Graham, L. M. The C-Type Lectin Receptor CLECSF8 (CLEC4D) Is Expressed by Myeloid Cells and Triggers Cellular Activation Through Syk Kinase / L. M. Graham, V. Gupta, G. Schafer [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, № 31. – P. 25964–25974.
 132. Gringhuis, S. I. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB / S. I. Gringhuis, J. den Dunnen, M. Litjens [et al.] // *Immunity.* – 2007. – Vol. 26, № 5. – P. 605–616.
 133. Gringhuis, S. I. Fungal sensing by dectin-1 directs the non-pathogenic polarization of TH17 cells through balanced type I IFN responses in human DCs / S. I. Gringhuis, T. M. Kaptein, E. B. M. Remmerswaal [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2022. – Vol. 23. – P. 1735–1748.
 134. Gruber, A. D. Standardization of Reporting Criteria for Lung Pathology in SARS-CoV-2-infected Hamsters: What Matters? / A. D. Gruber, N. Osterrieder, L. D. Bertzbach [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2020. – Vol. 63, № 6. – P. 856-859.
 135. Guarnieri, A. Antimicrobial properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect *Hermetia illucens* / A. Guarnieri, M. Triunfo, C. Scieuzo [et al.] // *Sci. Rep.* – 2022. – Vol. 12. – P. 8084.

136. Gucciardo, F. uPARAP/Endo180: a multifaceted protein of mesenchymal cells / F. Gucciardo, S. Pirson, L. Baudin [et al.] // *Cell Mol. Life Sci.* – 2022. – Vol. 79, № 5. – P. 255.
137. Guillen, J. FELASA guidelines and recommendations / J. Guillen // *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* – 2012. – Vol. 51. – P. 311–321.
138. Guo, Q. Formulated protein-polysaccharide-surfactant ternary complexes for co-encapsulation of curcumin and resveratrol: Characterization, stability and in vitro digestibility / Q. Guo [et al.] // *Food Hydrocoll.* – 2021. – Vol. 111. – P. 106265.
139. Guo, R. Polysaccharides as Potential Anti-tumor Biomacromolecules -A Review / R. Guo, M. Chen, Y. Ding [et al.] // *Front. Nutr.* – 2022. – Vol. 9. – P. 838179.
140. Guo, X. Triple-helix polysaccharides: Formation mechanisms and analytical methods / X. Guo, J. Kang, Z. Xu [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2021. – Vol. 262. – P. 117962.
141. Gupta, R. K. R-Type Lectin Families / R. K. Gupta, G. S. Gupta // *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications.* – Vienna : Springer, 2012.
142. Li, H. / H. Li, X. Wang, Q. Xiong [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – Vol. 154. – P. 1438–1447.
143. Jiang, H.-H. Cell wall mannoprotein of *Candida albicans* polarizes macrophages and affects proliferation and apoptosis through activation of the Akt signal pathway / H.-H. Jiang, Y.-J. Zhang, Y.-Z. Sun [et al.] // *J. Immunol.* – 2019. – Vol. 72. – P. 308–321.
144. Hanč, P. DNGR-1, an F-actin-binding C-type lectin receptor involved in cross-presentation of dead cell-associated antigens by dendritic cells / P. Hanč, S. Iborra, S. Zelenay [et al.] // *C-Type Lectin Receptors in Immunity* / ed. by S. Yamasaki. – Tokyo : Springer, 2016. – P. 65–81.
145. Hansson, L. E. Risk of stomach cancer in patients with peptic ulcer disease / L. E. Hansson // *World J. Surg.* – 2000. – Vol. 24, № 3. – P. 315–320.
146. Haque, O. I. Secondary infections in critically ill patients with COVID-19: A retrospective single-center study / O. I. Haque, M. Shameem, W. Hashim // *Lung India.* – 2023. – Vol. 40, № 3. – P. 210–214.
147. Hashimoto, K. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1-deficient mice show resistance to age-related knee osteoarthritis / K. Hashimoto, Y. Oda, F. Nakamura [et al.] // *Eur. J. Histochem.* – 2017. – Vol. 61, № 1. – P. 49–56.
148. He, M. Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications / M. He, X. Zhou, X. Wang // *Sig. Transduct. Target Ther.* – 2024. – Vol. 9. – P. 194.

149. Hoang Thi, T. T. The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation / T. T. Hoang Thi, E. H. Pilkington, D. H. Nguyen [et al.] // *Polymers (Basel)*. – 2020. – Vol. 12, № 2. – P. 298.
150. Holzheimer, M. Chemical Synthesis of Cell Wall Constituents of *Mycobacterium tuberculosis* / M. Holzheimer, J. Buter, A. J. Minnaard // *Chem. Rev.* – 2021. – Vol. 121, № 15. – P. 9554-9643.
151. Homaeigohar, S. Antiviral polysaccharide and antiviral peptide delivering nanomaterials for prevention and treatment of SARS-CoV-2 caused COVID-19 and other viral diseases / S. Homaeigohar, X. Liu, M. Elbahri // *J. Control. Release.* – 2023. – Vol. 358. – P. 476-497.
152. Hong, F. Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models / F. Hong, J. Yan, J. T. Baran [et al.] // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 173, № 2. – P. 797-806.
153. Hong, T. Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective / T. Hong, J. Y. Yin, S. P. Nie, M. Y. Xie // *Food Chem. X.* – 2021. – Vol. 12. – P. 100168.
154. Hou, H. C-type Lectin Receptor: Old Friend and New Player / H. Hou, Y. Guo, Q. Chang [et al.] // *Med. Chem.* – 2017. – Vol. 13, № 6. – P. 536-543.
155. Howard, M. J. The C-type lectin receptor Endo180 displays internalization and recycling properties distinct from other members of the mannose receptor family / M. J. Howard, C. M. Isacke // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 32320–32331.
156. Hsieh, P. H. Uncovering the Relationship between Sulphation Patterns and Conformation of Iduronic Acid in Heparan Sulphate / P. H. Hsieh, D. Thieker, M. Guerrini [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 29602.
157. Huang, X. Research progress on Mincle as a multifunctional receptor / X. Huang, Q. Yu, L. Zhang, Z. Jiang // *Int. Immunopharmacol.* – 2023. – Vol. 114. – P. 109467.
158. Huang, Z. The protective effect of small black soybean (*Vigna Mungo L.*) polysaccharide on acetic acid-induced gastric ulcer in SD rats and its impact on gut microbiota and metabolites / Z. Huang, M. Hu, X. Peng [et al.] // *Food Biosci.* – 2023. – Vol. 56. – P. 103187.
159. Huysamen, C. CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes / C. Huysamen, J. A. Willment,

- K. M. Dennehy, G. D. Brown // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 24. – P. 16693-16701.
160. Ikewaki, N. β glucan vaccine adjuvant approach for cancer treatment through immune enhancement (B VACCIEEN) in specific immunocompromised populations (Review) / N. Ikewaki, V. D. Dedeepiya, K. Raghavan [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2022. – Vol. 47, № 1. – P. 14.
 161. Imberty, A. Structural Biology of Glycan Recognition / A. Imberty, J. H. Prestegard // *Essentials of Glycobiology* [Internet]; ed. by A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko [et al.]. – 3rd ed. – Cold Spring Harbor (NY) : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
 162. Iqbal, M. W. Fucoidan-based nanomaterial and its multifunctional role for pharmaceutical and biomedical applications / M. W. Iqbal, T. Riaz, S. Mahmood [et al.] // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2024. – Vol. 64, № 2. – P. 354-380.
 163. Ishikawa, E. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle / E. Ishikawa, T. Ishikawa, Y. S. Morita [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2009. – Vol. 206, № 13. – P. 2879–2888.
 164. Iwabuchi, K. Role of ceramide from glycosphingolipids and its metabolites in immunological and inflammatory responses in humans / K. Iwabuchi, H. Nakayama, A. Oizumi [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2015. – P. 120748.
 165. Iwabuchi, K. Lactosylceramide-enriched glycosphingolipid signaling domain mediates superoxide generation from human neutrophils / K. Iwabuchi, I. Nagaoka // *Blood.* – 2002. – Vol. 100. – P. 1454-1464.
 166. Jack, D. L. Mannose-binding lectin enhances phagocytosis and killing of *Neisseria meningitidis* by human macrophages / D. L. Jack, M. E. Lee, M. W. Turner [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2005. – Vol. 77, № 3. – P. 328-336.
 167. Jame-Chenarboo, Z. Advances in understanding and exploiting Siglec-glycan interactions / Z. Jame-Chenarboo, T. E. Gray, M. S. Macauley // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2024. – Vol. 80. – P. 102454.
 168. Jang, J-Y. Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells / J-Y. Jang, S-Y. Moon, H-G. Joo // *Food Chem. Toxicol.* – 2014. – Vol. 68. – P. 234–238.
 169. Janik, M. Nano-/Microcapsules, Liposomes, and Micelles in Polysaccharide Carriers: Applications in Food Technology / M. Janik, M. Hanula, K. Khachatryan, G. Khachatryan // *Appl. Sci.* – 2023. – Vol. 13, № 21. – P. 11610.

170. Jaroentomeechai, T. Mammalian cell-based production of glycans, glycopeptides and glycomodules / T. Jaroentomeechai, R. Karlsson, F. Goerdeler [et al.] // *Nat. Commun.* – 2024. – Vol. 15. – P. 9668.
171. Jégouzo, S. A. A novel mechanism for binding of galactose-terminated glycans by the C-type carbohydrate recognition domain in blood dendritic cell antigen 2 / S. A. Jégouzo, H. Feinberg, T. Dungarwalla [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290, № 27. – P. 16759–16771.
172. Jégouzo, S. A. Organization of the extracellular portion of the macrophage galactose receptor: a trimeric cluster of simple binding sites for N-acetylgalactosamine / S. A. Jégouzo, A. Quintero-Martínez, X. Ouyang [et al.] // *Glycobiology.* – 2013. – Vol. 23, № 7. – P. 853-864.
173. Jensen, R. K. Complement receptor 3 forms a compact high affinity complex with iC3b / R. K. Jensen, G. Bajic, M. Sen [et al.] // *bioRxiv.* – 2020. – P. 2020.04.15.043133.
174. Jerne, N. K. Plaque formation in agar by single antibody producing cells / N. K. Jerne, A. A. Nordin // *Science.* – 1963. – Vol. 140, № 3565. – P. 405.
175. Jiang, L. Low-molecular-weight polysaccharides from *Agaricus blazei* Murrill modulate the Th1 response in cancer immunity / L. Jiang, Z. Yu, Y. Lin [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2018. – Vol. 15. – P. 3429–3436.
176. Jimenez-Duran, G. Metabolic regulators of enigmatic inflammasomes in autoimmune diseases and crosstalk with innate immune receptors / G. Jimenez-Duran, M. Triantafilou // *Immunology.* – 2021. – Vol. 163, № 4. – P. 348-362.
177. Jiménez-Sánchez, M. Self-assembled high molecular weight inulin nanoparticles: Enzymatic synthesis, physicochemical and biological properties / R. Pérez-Morales, F.M. Goycoolea, M. Mueller [et al.] // *Carb. Polym.* – 2019. – Vol. 215. – P. 160-169.
178. Jin, C. Gp120 binding with DC-SIGN induces reactivation of HIV-1 provirus via the NF- κ B signaling pathway / C. Jin, J. Li, L. Cheng [et al.] // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* – 2016. – Vol. 48, № 3. – P. 275-281.
179. Kalantari, P. CD209a Synergizes with Dectin-2 and Mincle to Drive Severe Th17 Cell-Mediated Schistosome Egg-Induced Immunopathology / P. Kalantari, Y. Morales, E. A. Miller [et al.] // *Cell Rep.* – 2018. – Vol. 22, № 5. – P. 1288-1300.
180. Kalia, N. The ambiguous role of mannose-binding lectin (MBL) in human immunity / N. Kalia, J. Singh, M. Kaur // *Open Med. (Wars).* – 2021. – Vol. 16, № 1. – P. 299-310.

181. Kalia, N. The role of dectin-1 in health and disease / N. Kalia, J. Singh, M. Kaur // *Immunobiology*. – 2021. – Vol. 226, № 2. – P. 152071.
182. Kang, Y. M. Inhibitory effects of *Helianthus tuberosus* ethanol extract on *Dermatophagoides farina* body-induced atopic dermatitis mouse model and human keratinocytes / Y. M. Kang, K. Y. Lee, H. J. An // *Nutrients*. – 2018. – Vol. 10, № 11. – P. 1657.
183. Kaplan, E. L., Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observations: статья / E. L. Kaplan, P. Meier // *J. Amer. Statist. Assoc.* – 1958. – Vol. 53, № 282. – P. 457–481.
184. Karakaş, D. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts / Karakaş, D., Ari F., and Ulukaya, E. // *Turkish Journal of Biology*. – 2017. – Vol. 41, № 6. – P. 919–925.
185. Kasai, A. Systematic synthesis of low-molecular weight fucoidan derivatives and their effect on cancer cells / A. Kasai, S. Arafuka, N. Koshiha [et al.] // *Org. Biomol. Chem.* – 2015. – Vol. 13. – P. 10556–10568.
186. Kataoka, H. Immediate Amelioration of Severe Respiratory Distress in Sjögren's Syndrome with COVID-19 Treated with a Single Dose of Off-label Tocilizumab / H. Kataoka, F. Kodama, T. Tomita [et al.] // *Intern. Med.* – 2021. – Vol. 60, № 4. – P. 639–643.
187. Kawasaki, T. Toll-like receptor signaling pathways / T. Kawasaki, T. Kawai // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 461.
188. Kawsar, S. M. A. Diverse Localization Patterns of an R-Type Lectin in Marine Annelids / S. M. A. Kawsar, I. Hasan, S. Rajia [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 16. – P. 4799.
189. Kervevan, J. Targeting human langerin promotes HIV-1 specific humoral immune responses / J. Kervevan, A. Bouteau, J. S. Lanza [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2021. – Vol. 17, № 7. – P. e1009749.
190. Khan, T. Polysaccharides as potential anticancer agents-A review of their progress / T. Khan, A. Date, H. Chawda, K. Patel // *Carbohydr. Polym.* – 2019. – Vol. 210. – P. 412–428.
191. Khatun, F. Immunology of carbohydrate-based vaccines / F. Khatun, I. Toth, R. J. Stephenson // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2020. – Vol. 165–166. – P. 117–126.
192. Khodadadi Yazdi, M. Tailor-Made Polysaccharides for Biomedical Applications / M. Khodadadi Yazdi, F. Seidi, A. Hejna [et al.] // *ACS Appl. Bio Mater.* – 2024. – Vol. 7, № 7. – P. 4193–4230.

193. Khayrova, A. Evaluation of antibacterial and antifungal properties of low molecular weight chitosan extracted from *Hermetia illucens* relative to crab chitosan / A. Khayrova, S. Lopatin, B. Shagdarova [et al.] // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, No. 2. – P. 577.
194. Kim, H. W. D-galacto-D-mannan-mediated Dectin-2 activation orchestrates potent cellular and humoral immunity as a viral vaccine adjuvant / H. W. Kim, M. K. Ko, S. H. Park [et al.] // *Front. Immunol.* – 2024. – Vol. 15. – P. 1330677.
195. Kim, J. Comprehensive guidelines for appropriate statistical analysis methods in research / J. Kim, D. H. Kim, S. G. Kwak // *Korean J. Anesthesiol.* – 2024. – Vol. 77, № 5. – P. 503-517.
196. Kim, J.-W. Identification of serum glycoprotein ligands for the immunomodulatory receptor blood dendritic cell antigen 2 / J.-W. Kim, J. Budzak, Y. Liu [et al.] // *Glycobiology*. – 2018. – Vol. 28.
197. Kim, S. H. Pharmacological and Therapeutic Activities of Aloe vera and Its Major Active Constituent Acemannan / S. H. Kim, K. S. Shim, Y. Song [et al.] // *Food Suppl. Biomater. Health*. – 2023. – Vol. 3, № 2. – P. e8.
198. Kim, Y. K. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases / Y. K. Kim, J. S. Shin, M. H. Nahm // *Yonsei Med. J.* – 2016. – Vol. 57, № 1. – P. 5-14.
199. Kim, H. J. Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight immune and aging / H. J. Kim, H. Kim, J. H. Lee [et al.] // *Immun Ageing*. – 2023. – Vol. 20. – P. 67.
200. Kirkland, T. N. Innate Immune Receptors and Defense Against Primary Pathogenic Fungi / T. N. Kirkland, J. Fierer // *Vaccines*. – 2020. – Vol. 8, № 2. – P. 303.
201. Kiyotake, R. Human Mincle Binds to Cholesterol Crystals and Triggers Innate Immune Responses / R. Kiyotake, M. Oh-hora, E. Ishikawa [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290, № 42. – P. 25322–25332.
202. Kolya, H. Unveiling enhanced sound absorption in coconut wood through hemicellulose and lignin modification / H. Kolya, C.-W. Kang // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2024. – Vol. 276. – P. 134083.
203. Kolya, H. Effects of chemical and physical treatments on bamboo cell wall structure from engineering perspectives / H. Kolya, H. Masumi, H. Kazuharu, C.-W. Kang // *Wood Res.* – 2024. – Vol. 69. – P. 272-282.
204. Kondeva-Burdina, M. Astragalus glycyphyllos and Astragalus glycyphylloides Derived Polysaccharides Possessing *In vitro* Antioxidant Properties / M. Kondeva-Burdina, V. Vitcheva, R. Simeonova [et al.] // *Eur. J. Med. Plants*. – 2016. – Vol. 17. – P. 1-9.

205. Kotla, N. G. Modulation of Gut Barrier Functions in Ulcerative Colitis by Hyaluronic Acid System / N. G. Kotla, I. L. M. Isa, S. Rasala [et al.] // *Adv. Sci. (Weinh)*. – 2022. – Vol. 9, № 4. – P. e2103189.
206. Koyyada, A. Natural gum polysaccharides as efficient tissue engineering and drug delivery biopolymers / A. Koyyada, P. Orsu // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* – 2021. – Vol. 63. – P. 102431.
207. Kozera, B. Reference genes in real-time PCR / B. Kozera, M. Rapacz // *J. Appl. Genet.* – 2013. – Vol. 54, № 4. – P. 391-406.
208. Krause, K. M. Aminoglycosides: An Overview / K. M. Krause, A. W. Serio, T. R. Kane, L. E. Connolly // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2016. – Vol. 6, № 6. – P. a027029.
209. Krishnan, R. Beta glucan induced immune priming protects against nervous necrosis virus infection in sevenband grouper / R. Krishnan, Y. S. Jang, M. J. Oh // *Fish Shellfish Immunol.* – 2022. – Vol. 121. – P. 163-171.
210. Krzewski, K. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis / K. Krzewski, J. E. Coligan // *Front. Immunol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 335.
211. Kummer, K. K. Role of IL-6 in the regulation of neuronal development, survival and function / K. K. Kummer, M. Zeidler, T. Kalpachidou, M. Kress // *Cytokine*. – 2021. – Vol. 144. – P. 155582.
212. Liang, L. / L. Liang, L. Ao, T. Ma [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 106. – P. 447–455.
213. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
214. Lang, R. Recognition of the mycobacterial cord factor by Mincle: relevance for granuloma formation and resistance to tuberculosis / R. Lang // *Front. Immunol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 5.
215. Läubli, H. Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglecs) detect self-associated molecular patterns to regulate immune responses / H. Läubli, A. Varki // *Cell Mol. Life Sci.* – 2020. – Vol. 77, № 4. – P. 593-605.
216. Launay, B. Flow Properties of Aqueous Solutions and Dispersions of Polysaccharides / B. Launay, J. R. Doublier, G. Cuvelier // *Functional Properties of Food Macromolecules* / ed. by J.R. Mitchell, D.A. Ledward. – London : Elsevier Applied Science, 1986. – P. 1-78.

217. Lee, J. S. Role of CARD9 in Cell- and Organ-Specific Immune Responses in Various Infections / J. S. Lee, C. Kim // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol. 25, № 5. – P. 2598.
218. Lee, R. T. Survey of immune-related, mannose/fucose-binding C-type lectin receptors reveals widely divergent sugar-binding specificities / R. T. Lee, T. L. Hsu, S. K. Huang [et al.] // *Glycobiology*. – 2011. – Vol. 21, № 4. – P. 512-520.
219. Lee, W. B. Neutrophils Promote Mycobacterial Trehalose Dimycolate-Induced Lung Inflammation via the Mincle Pathway / W. B. Lee, J. S. Kang, J. J. Yan [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2012. – Vol. 8, № 4. – P. e1002614.
220. Lee, Y. J. Agrobacterium sp.-derived β -1,3-glucan enhances natural killer cell activity in healthy adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study / Y. J. Lee, D. J. Paik, D. Y. Kwon [et al.] // *Nutr. Res. Pract.* – 2017. – Vol. 11, № 6. – P. 525.
221. Legentil, L. Molecular Interactions of β -(1 $\rightarrow$ 3)-Glucans with Their Receptors / L. Legentil, F. Paris, C. Ballet [et al.] // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, № 6. – P. 9745-9766.
222. Leopold, N. / N. Leopold, B. Lendl // *J. Phys. Chem. B*. – 2003. – Vol. 107. – P. 5723.
223. Lester, S. N. Toll-like receptors in antiviral innate immunity / S. N. Lester, K. Li // *J. Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 426, № 6. – P. 1246–1264.
224. Li, B. Yeast beta-glucan amplifies phagocyte killing of iC3b-opsonized tumor cells via complement receptor 3-Syk-phosphatidylinositol 3-kinase pathway / B. Li, D. J. Allendorf, R. Hansen [et al.] // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177, № 3. – P. 1661-1669.
225. Li, H. From fruit and vegetable waste to degradable bioplastic films and advanced materials: A review / H. Li, M. Zhou, A. E. A. Y. Mohammed [et al.] // *Sustainable Chem. Pharm.* – 2022. – Vol. 30. – P. 100859.
226. Li, K. Structural Characterization and Immune Activity Screening of Polysaccharides With Different Molecular Weights From Astragali Radix / K. Li, Y. X. Cao, S. M. Jiao [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 582091.
227. Li, K. Insights into the interplay between gut microbiota and lipid metabolism in the obesity management of canines and felines / K. Li, X. Xiao, Y. Li [et al.] // *J. Animal Sci. Biotechnol.* – 2024. – Vol. 15. – P. 114.

228. Li, M. The Role of C-Type Lectin Receptor Signaling in the Intestinal Microbiota-Inflammation-Cancer Axis / M. Li, R. Zhang, J. Li, J. Li // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 894445.
229. Li, W. Macrophage regulation in vascularization upon regeneration and repair of tissue injury and engineered organ transplantation / W. Li, Z. Xu, B. Zou [et al.] // *Fundam. Res.* – 2024.
230. Li, Z. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases / Z. Li, J. Guo, L. Bi // *Biomed. Pharmacother.* – 2020. – Vol. 130. – P. 110542.
231. Li, D. C-type lectin receptor Dectin3 deficiency balances the accumulation and function of FoxO1-mediated LOX-1+ M-MDSCs in relieving lupus-like symptoms / D. Li, L. Lu, W. Kong [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2021. – Vol. 12. – P. 829.
232. Li, Y. The effect of Astragalus polysaccharide on growth, gut and liver health, and anti-viral immunity of zebrafish / Y. Li, C. Ran, K. Wei [et al.] // *Aquaculture.* – 2021. – Vol. 540. – P. 736677.
233. Limmer, A. Patients with SARS-CoV-2-Induced Viral Sepsis Simultaneously Show Immune Activation, Impaired Immune Function and a Procoagulatory Disease State / A. Limmer, A. Engler, S. Kattner [et al.] // *Vaccines (Basel).* – 2023. – Vol. 11, № 2. – P. 435.
234. Lin, J.-S. Distinct roles of complement receptor 3, Dectin-1, and sialic acids in murine macrophage interaction with histoplasma yeast / J.-S. Lin, J. H. Huang, L.-Y. Hung [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2010. – Vol. 88, № 1. – P. 95-106.
235. Litchfield, J. T., Jr. A simplified method of evaluating dose-effect experiments / J. T. Litchfield, Jr, F. Wilcoxon // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1949. – Vol. 96, № 2. – P. 99-113.
236. Liu, C. F. Complement Receptor 3 Has Negative Impact on Tumor Surveillance through Suppression of Natural Killer Cell Function / C. F. Liu, X. Y. Min, N. Wang [et al.] // *Front. Immunol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1602.
237. Liu, F. Improved hydrophobicity, antibacterial and mechanical properties of polyvinyl alcohol/quaternary chitosan composite films for antibacterial packaging / F. Liu, X. Zhang, X. Xiao [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2023. – Vol. 312. – P. 120755.
238. Liu, J. Different extraction methods bring about distinct physicochemical properties and antioxidant activities of Sargassum fusiforme fucoidans / J. Liu, S. Y. Wu, L. Chen [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – Vol. 155. – P. 1385-1392.

239. Liu, M. Oligosaccharides from Traditional Chinese Herbal Medicines: A Review of Chemical Diversity and Biological Activities / M. Liu, M. Cai, P. Ding // *Am. J. Chin. Med.* – 2021. – Vol. 49, № 3. – P. 577-608.
240. Liu, F. T. The role of galectins in immunity and infection / F. T. Liu, S. R. Stowell // *Nat. Rev. Immunol.* – 2023. – Vol. 23. – P. 479–494.
241. Lopez Robles, M. D. Cell-surface C-type lectin-like receptor CLEC-1 dampens dendritic cell activation and downstream Th17 responses / M. D. Lopez Robles, A. Pallier, V. Huchet [et al.] // *Blood Adv.* – 2017. – Vol. 1, № 9. – P. 557–568.
242. Lowry, O. H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.
243. Lu, J. Astragalus polysaccharide induces anti-inflammatory effects dependent on AMPK activity in palmitate-treated RAW264.7 cells / J. Lu, X. Chen, Y. Zhang [et al.] // *Int. J. Mol. Med.* – 2013. – Vol. 31, № 6. – P. 1463-1470.
244. Lukova, P. Application of Starch, Cellulose, and Their Derivatives in the Development of Microparticle Drug-Delivery Systems / P. Katsarov, B. Pilicheva // *Polymers.* – 2023. – Vol. 15. – P. 3615.
245. Luz, S. M. Cellulose and cellulignin from sugarcane bagasse reinforced polypropylene composites: Effect of acetylation on mechanical and thermal properties / S. M. Luz, J. Del Tio, G. J. M. Rocha [et al.] // *Compos. Part A: Appl. Sci. Manuf.* – 2008. – Vol. 39, № 9. – P. 1362-1369.
246. Lv, H. Microgravity and immune cells / H. Lv, H. Yang, C. Jiang [et al.] // *J. R. Soc. Interface.* – 2023. – Vol. 20, № 199. – P. 20220869.
247. Marasco, M. R. Interleukin-6 reduces β -cell oxidative stress by linking autophagy with the antioxidant response / M. R. Marasco, A. M. Conteh, C. A. Reissaus [et al.] // *Diabetes.* – 2018. – Vol. 67. – P. 1576–1588.
248. Macauley, M. S. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease / M. S. Macauley, P. R. Crocker, J. C. Paulson // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014. – Vol. 14, № 10. – P. 653-666.
249. Mahara, G. Breakthrough of glycobiology in the 21st century / G. Mahara, C. Tian, X. Xu, J. Zhu // *Front. Immunol.* – 2023. – Vol. 13. – P. 1071360.
250. Malamud, M. The Dectin-1 and Dectin-2 clusters: C-type lectin receptors with fundamental roles in immunity / M. Malamud, G. D. Brown // *EMBO Rep.* – 2024. – Vol. 25, № 12. – P. 5239-5264.

251. Manabe, N. 3D Structural Insights into β -Glucans and Their Binding Proteins / N. Manabe, Y. Yamaguchi // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22, № 4. – P. 1578.
252. Mariadoss, A. V. A. Ethyl acetate fraction of *Helianthus tuberosus* L. induces anti-diabetic, and wound-healing activities in insulin-resistant human liver cancer and mouse fibroblast cells / A. V. A. Mariadoss, S. Park, K. Saravanakumar [et al.] // Antioxidants. – 2021. – Vol. 10, № 1. – P. 99.
253. Martinez-Lopez, M. Microbiota Sensing by Mincle-Syk Axis in Dendritic Cells Regulates Interleukin-17 and-22 Production and Promotes Intestinal Barrier Integrity / M. Martinez-Lopez, S. Iborra, R. Conde-Garrosa [et al.] // Immunity. – 2019. – Vol. 50, № 2. – P. 446-462.
254. Másson, M. The quantitative molecular weight-antimicrobial activity relationship for chitosan polymers, oligomers, and derivatives / M. Másson // Carbohydr. Polym. – 2024. – Vol. 337. – P. 122159.
255. Matsuoka, Y. IL-6 controls resistance to radiation by suppressing oxidative stress via the Nrf2-antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma / Y. Matsuoka, H. Nakayama, R. Yoshida [et al.] // Br. J. Cancer. – 2016. – Vol. 115. – P. 1234–1244.
256. Matsushita, M. Ficolins in complement activation / M. Matsushita // Mol. Immunol. – 2013. – Vol. 55, № 1. – P. 22-26.
257. McCarthy, C. The effects of cereal β -glucans on cardiovascular risk factors and the role of the gut microbiome / C. McCarthy, E. Papada, A. Z. Kalea // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 2024. – P. 1-17.
258. Meier, M. Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the H1 subunit of the asialoglycoprotein receptor / M. Meier, M. D. Bider, V. N. Malashkevich [et al.] // J. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 300, № 4. – P. 857-865.
259. Méndez-Yañez, A. Human Health Benefits through Daily Consumption of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) Tubers / A. Méndez-Yañez, P. Ramos, L. Morales-Quintana // Horticulturae. – 2022. – Vol. 8. – P. 620.
260. Meng, P. Cellulose-based materials in the treatment of wastewater containing heavy metal pollution: Recent advances in quantitative adsorption mechanisms / P. Meng, T. Zhang, Y. Su [et al.] // Ind. Crops Prod. – 2024. – Vol. 217. – P. 118825.
261. Meudt, M. Comprehensive analysis and characterization of glycan pairing in therapeutic antibodies and Fc-containing biotherapeutics: Addressing current limitations and implications for N-glycan impact / M. Meudt, J. Baumeister, B. Mizaikoff [et al.] // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2024. – Vol. 200. – P. 114325.

262. Micsonai A. BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy / A. Micsonai, M. Éva, W. Frank [et al.] // *Nuc. Ac. Res.* – 2022. – Vol. 50, № W1. P. W90–W98.
263. Miguel, A. S. Enzymes in Bakery: Current and Future Trends / A. S. Miguel, T. S. Martins-Meyer, E. V. Figueiredo [et al.]. – 2013.
264. Miles, A. J. CDtoolX, a downloadable software package for processing and analyses of circular dichroism spectroscopic data / A. J. Miles, B. A. Wallace // *Protein Sci.* – 2018. – Vol. 27, № 9. – P. 1717-1722.
265. Minzanova, S. T. Biological Activity and Pharmacological Application of Pectic Polysaccharides: A Review / S. T. Minzanova, V. F. Mironov, D. M. Arkhipova [et al.] // *Polymers.* – 2018. – Vol. 10, № 12. – P. 1407.
266. Mirzaei, A. Biomedical and Environmental Applications of Carrageenan-Based Hydrogels: A Review / A. Mirzaei, M. Esmkhani, M. Zallaghi [et al.] // *J. Polym. Environ.* – 2023. – Vol. 31. – P. 1679–1705.
267. Mishra, V. Beta glucan as an immune stimulant in tumor microenvironment - Insight into lessons and promises from past decade / V. Mishra, V. Tripathi, P. Yadav, M. P. Singh // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2023. – Vol. 234. – P. 123617.
268. Mitchell, D. A. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands / D. A. Mitchell, A. J. Fadden, K. Drickamer // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 31. – P. 28939-28945.
269. Mittal, M. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury / M. Mittal, M. R. Siddiqui, K. Tran [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014. – Vol. 20, № 7. – P. 1126-1167.
270. Miyake, Y. C-Type Lectin MCL Is an Fcγ-Coupled Receptor That Mediates the Adjuvanticity of Mycobacterial Cord Factor / Y. Miyake, K. Toyonaga, D. Mori [et al.] // *Immunity.* – 2013. – Vol. 38, № 5. – P. 1050–1062.
271. Mizushima, T. Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase / T. Mizushima, T. Hirao, Y. Yoshida [et al.] // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 11, № 4. – P. 365-370.
272. Modenutti, C. P. The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design / C. P. Modenutti, J. I. B. Capurro, S. Di Lella, M. A. Martí // *Front. Chem.* – 2019. – Vol. 7. – P. 823.

273. Mohammed, A. S. A. Polysaccharides; Classification, Chemical Properties, and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities) / A. S. A. Mohammed, M. Naveed, N. Jost // *J. Polym. Environ.* – 2021. – Vol. 29, № 8. – P. 2359-2371.
274. Moore, K. H. The glycocalyx: a central regulator of vascular function / K. H. Moore, H. A. Murphy, E. M. George // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2021. – Vol. 320, № 4. – P. R508-R518.
275. Motta, V. N. Identification of the inflammasome Nlrp1b as the candidate gene conferring diabetes risk at the Idd4.1 locus in the nonobese diabetic mouse / V. N. Motta, J. G. Markle, O. Gulban [et al.] // *J. Immunol.* – 2015. – Vol. 194, № 12. – P. 5663-5673.
276. Munday, J. Identification, characterization and leucocyte expression of Siglec-10, a novel human sialic acid-binding receptor / J. Munday, S. Kerr, J. Ni [et al.] // *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 355, № 2. – P. 489–497.
277. Murphy, E. J. Polysaccharides-Naturally Occurring Immune Modulators / E. J. Murphy, G. W. Fehrenbach, I. Z. Abidin [et al.] // *Polymers (Basel)*. – 2023. – Vol. 15, № 10. – P. 2373.
278. Muthana, S. M. Modifications of glycans: biological significance and therapeutic opportunities / S. M. Muthana, C. T. Campbell, J. C. Gildersleeve // *ACS Chem. Biol.* – 2012. – Vol. 7. – P. 31–43.
279. Nagae, M. Crystal structure of human dendritic cell inhibitory receptor C-type lectin domain reveals the binding mode with N-glycan / M. Nagae, A. Ikeda, S. Hanashima [et al.] // *FEBS Lett.* – 2016. – Vol. 590, № 8. – P. 1280-1288.
280. Nagata, M. Intracellular Metabolite Beta-Glucosylceramide Is an Endogenous Mincle Ligand Possessing Immunostimulatory Activity / M. Nagata, Y. Izumi, E. Ishikawa [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2017. – Vol. 114. – P. E3285–E3294.
281. Fujita, N. Starch biosynthesis in rice endosperm requires the presence of either starch synthase I or IIIa / N. Fujita, R. Satoh, A. Hayashi [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2011. – Vol. 62, № 14. – P. 4819–4831.
282. Naor, D. Editorial: interaction between hyaluronic acid and its receptors (CD44, RHAMM) regulates the activity of inflammation and cancer / D. Naor // *Front. Immunol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 39.
283. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory

- Animals [Электронный ресурс] / National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. – 8th ed. – Washington (DC) : National Academies Press (US), 2011. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/> (дата обращения: 21.04.2024).
284. Nazario-Toole, A. E. Phagocytosis in Insect Immunity / A. E. Nazario-Toole, L. P. Wu // *Advances in Insect Physiology* / ed. by P. Ligoxygakis. – Academic Press, 2017. – Vol. 52. – P. 35-82.
 285. Nduko, J. M. Microbial production of biodegradable lactate-based polymers and oligomeric building blocks from renewable and waste resources / J. M. Nduko, S. Taguchi // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2021. – Vol. 8. – P. 618077.
 286. Nechipurenko, Y. D. The Role of Acidosis in the Pathogenesis of Severe Forms of COVID-19 / Y. D. Nechipurenko, D. A. Semyonov, I. A. Lavrinenko, D. A. [et al.] // *Biology.* – 2021. – Vol. 10. – P. 852.
 287. Nia, H. T. AggreCan: Approaches to Study Biophysical and Biomechanical Properties / H. T. Nia, C. Ortiz, A. Grodzinsky // *Glycosaminoglycans* / ed. by K. Balagurunathan, H. Nakato, U. Desai. – New York, NY : Humana Press, 2015. – P. 1-21
 288. Nizioł-Łukaszewska, Z. Antioxidant activity and cytotoxicity of Jerusalem artichoke tubers and leaves extract on HaCaT and BJ fibroblast cells / Z. Nizioł-Łukaszewska, D. Furman-Toczek, M. Zagórska-Dziok // *Lipids Health Dis.* – 2018. – Vol. 17, № 1. – P. 280.
 289. Noorbakhsh Varnosfaderani, S. M. Potential promising anticancer applications of β -glucans: a review / S. M. Noorbakhsh Varnosfaderani, F. Ebrahimzadeh, M. Akbari Oryani [et al.] // *Biosci. Rep.* – 2024. – Vol. 44, № 1. – P. BSR20231686.
 290. Norimoto, A. Dectin-2 promotes house dust mite-induced T helper type 2 and type 17 cell differentiation and allergic airway inflammation in mice / A. Norimoto, K. Hirose, A. Iwata [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 51, № 2. – P. 201-209.
 291. O'Neill, L. A. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity / L. A. O'Neill, D. Golenbock, A. G. Bowie // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 13, № 6. – P. 453–460.
 292. Okabe, S. An overview of acetic acid ulcer models—the history and state of the art of peptic ulcer research / S. Okabe, K. Amagase // *Biol. Pharm. Bull.* – 2005. – Vol. 28, № 8. – P. 1321-1341.

293. Olin, A. I. The proteoglycans aggrecan and Versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding / A. I. Olin, M. Mörgelin, T. Sasaki [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 2. – P. 1253-1261.
294. Oomen, R. J. F. J. Towards Unravelling the Biological Significance of the Individual Components of Pectic Hairy Regions in Plants / R. J. F. J. Oomen [et al.] // *Advances in Pectin and Pectinase Research* / ed. by F. Voragen, H. Schols, R. Visser. – Dordrecht : Springer, 2003.
295. Ostash, B. Structural diversity, bioactivity, and biosynthesis of phosphoglycolipid family antibiotics: Recent advances / B. Ostash, R. Makitrynsky, O. Yushchuk, V. Fedorenko // *BBA Adv.* – 2022. – Vol. 2. – P. 100065.
296. Oszmiański, J. Evaluation of Innovative Dried Purée from Jerusalem Artichoke—In Vitro Studies of Its Physicochemical and Health-Promoting Properties / J. Oszmiański, S. Lachowicz, P. Nowicka [et al.] // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26, № 9. – P. 2644.
297. Otulak-Kozieł, K. Spatiotemporal Changes in Xylan-1/Xyloglucan and Xyloglucan Xyloglucosyl Transferase (XTH-Xet5) as a Step-In of Ultrastructural Cell Wall Remodelling in Potato–Potato Virus Y (PVYNTN) Hypersensitive and Susceptible Reaction / K. Otulak-Kozieł, E. Kozieł, J. J. Bujarski // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 8. – P. 2287.
298. Ouasti, S. Hyaluronic Acid (HA) Receptors and the Motility of Schwann Cell(-Like) Phenotypes / S. Ouasti, A. Faroni, P. J. Kingham [et al.] // *Cells.* – 2020. – Vol. 9, № 6. – P. 1477.
299. Panjagari, N. R. Starch-Chitosan based Composite Edible Antimicrobial Film: Modelling the Growth of Selected Food Spoilage Microbiota / N. R. Panjagari // *IJDS.* – 2015. – Vol. 68, № 4.
300. Pataki, Z. Herpes Simplex Virus 1 Entry Glycoproteins Form Complexes before and during Membrane Fusion / Z. Pataki, A. Rebolledo Viveros, E. E. Heldwein // *mBio.* – 2022. – Vol. 13. – P. e0203922.
301. Paurević, M. Mannose Ligands for Mannose Receptor Targeting / M. Paurević, M. Šrajter Gajdošik, R. Ribić // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol. 25, № 3. – P. 1370.
302. Pedro, A. R. V. Dectin-1-Mediated Production of Pro-Inflammatory Cytokines Induced by Yeast β -Glucans in Bovine Monocytes / A. R. V. Pedro, T. Lima, R. Fróis-Martins [et al.] // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 689879.
303. Pei, G. NOD-Like Receptors: Guards of Cellular Homeostasis Perturbation during Infection / G. Pei, A. Dorhoi // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 13. – P. 6714.

304. Peiffer, A. L. Soluble Human Lectins at the Host-Microbe Interface / A. L. Peiffer, A. E. Dugan, L. L. Kiessling // *Annu. Rev. Biochem.* – 2024. – Vol. 93, № 1. – P. 565-601.
305. Pellerin, A. Anti-BDCA2 monoclonal antibody inhibits plasmacytoid dendritic cell activation through Fc-dependent and Fc-independent mechanisms / A. Pellerin, K. Otero, J. M. Czerkowiec [et al.] // *EMBO Mol. Med.* – 2015. – Vol. 7, № 4. – P. 464-476.
306. Peng, L. C. Layer-by-layer structured polysaccharides-based multilayers on cellulose acetate membrane: Towards better hemocompatibility, antibacterial and antioxidant activities / L. C. Peng, H. Li, Y. H. Meng // *Appl. Surf. Sci.* – 2017. – Vol. 401. – P. 25-39.
307. Pieters, R. The popliteal lymph node assay: a tool for predicting drug allergies / R. Pieters // *Toxicology.* – 2001. – Vol. 158, № 1-2. – P. 65-69.
308. Pieters, R. Popliteal Lymph Node Assay / R. Pieters // *Encyclopedia of Immunotoxicology* / ed. by H. W. Vohr. – Berlin, Heidelberg : Springer, 2014.
309. Pifferi, C. Natural and synthetic carbohydrate-based vaccine adjuvants and their mechanisms of action / C. Pifferi, R. Fuentes, A. Fernández-Tejada // *Nat. Rev. Chem.* – 2021. – Vol. 5, № 3. – P. 197-216.
310. Platnich, J. M. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways / J. M. Platnich, D. A. Muruve // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2019. – Vol. 670. – P. 4-14.
311. Popay, I. *Helianthus tuberosus* (Jerusalem artichoke) / I. Popay // *CABI Compendium.* – 2014.
312. Porcaro, I. Mannose receptor contribution to *Candida albicans* phagocytosis by murine E-clone J774 macrophages / I. Porcaro, M. Vidal, S. Jouvert [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2003. – Vol. 74, № 2. – P. 206-215.
313. Präbst, K. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin / K. Präbst, H. Engelhardt, S. Ringgeler, H. Hübner // *Cell Viability Assays* / ed. by D. Gilbert, O. Friedrich. – New York, NY : Humana Press, 2017. – P. 1-21
314. Pustynnikov, S. Inhibition of DC-SIGN-Mediated HIV-1 Infection by Complementary Actions of Dendritic Cell Receptor Antagonists and Env-Targeting Virus Inactivators / S. Pustynnikov, R. Dave, V. Porkolab [et al.] // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 2016. – Vol. 32.
315. Rabinovich, G. A. Glycobiology of immune responses / G. A. Rabinovich, Y. van Kooyk, B. A. Cobb // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2012. – Vol. 1253. – P. 1-15.

316. Radosavljević, M. Production, Modification and Degradation of Fructans and Fructooligosaccharides by Enzymes Originated from Plants / M. Radosavljević, M. Belović, A. C. Kljakić, A. Torbica // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2024. – Vol. 269. – P. 131668.
317. Ralet, M.-C. Cell Wall Polysaccharides of Potato / M.-C. Ralet, F. Buffetto, I. Capron, F. Guillon // *Advances in Potato Chemistry and Technology* / ed. by J. Singh, L. Kaur. – Academic Press, 2016. – P. 33-56.
318. Raposo, C. D. Human Lectins, Their Carbohydrate Affinities and Where to Find Them / C. D. Raposo, A. B. Canelas, M. T. Barros // *Biomolecules.* – 2021. – Vol. 11, № 2. – P. 188.
319. Rashki, S. Chitosan-based nanoparticles against bacterial infections / S. Rashki, K. Asgarpour, H. Tarrahimofrad [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2021. – Vol. 251. – P. 117108.
320. Ravichandran, M. Recent developments in Polymer Matrix Composites -A review / M. Ravichandran, M. Balasubramanian, C. Anand Chairman [et al.] // *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* – 2020. – Vol. 988. – P. 012096.
321. Redondo-Cuenca, A. Inulin Extraction from Common Inulin-Containing Plant Sources / A. Redondo-Cuenca, S. E. Herrera-Vázquez, L. Condezo-Hoyos [et al.] // *Ind. Crops Prod.* – 2021. – Vol. 170. – P. 113726.
322. Ren, Q. Astragalus polysaccharide alleviates LPS-induced inflammation injury by regulating miR-127 in H9c2 cardiomyoblasts / Q. Ren, S. Zhao, C. Ren, Z. Ma // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 32.
323. Riboldi, E. Human C-type lectin domain family 4, member C (CLEC4C/BDCA-2/CD303) is a receptor for asialo-galactosyl-oligosaccharides / E. Riboldi, R. Daniele, C. Parola [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 41. – P. 35329-35333.
324. Rizqi, J. Low-dose Indonesian Aloe vera Increases Viability and Migration of the Fibroblast: An In Vitro Study / J. Rizqi, A. S. Fitriawan // *Open Access Maced. J. Med. Sci.* – 2022. – Vol. 10. – P. 256-261.
325. Röck, J. CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLCgamma2 / J. Röck, E. Schneider, J. R. Grün [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2007. – Vol. 37, № 12. – P. 3564–3575.
326. Rodrigues, C. R. TLR10: An Intriguing Toll-Like Receptor with Many Unanswered Questions / C. R. Rodrigues, Y. Balachandran, G. K. Aulakh, B. Singh // *J. Innate Immun.* – 2024. – Vol. 16, № 1. – P. 96-104.

327. Rubel, I. A. In vitro prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei* / I. A. Rubel, E. E. Perez, D. B. Genovese, G. D. Manrique // *Food Res. Int.* – 2014. – Vol. 62. – P. 59–65.
328. Suzuki, R. Considering branching of polysaccharides – from research on starch structure and branching enzymes / R. Suzuki, E. Suzuki // *Glycoforum.* – 2021. – Vol. 24, № 3. – P. A7.
329. Tang, S. / S. Tang, T. Wang, C. Huang [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2019. – Vol. 215. – P. 207–212.
330. Wu, S. / S. Wu, Y. Liu, P. Jiang [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – Vol. 164. – P. 2062–2072.
331. Safonova, E. A. Modification of the Myelotoxic and Antitumor Effects of Polychemotherapy by Polysaccharides from *Tussilago farfara* L. / E. A. Safonova, K. A. Lopatina, T. G. Razina [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2018. – Vol. 166, № 2. – P. 197–200.
332. Saikh, K. U. MyD88 and beyond: a perspective on MyD88-targeted therapeutic approach for modulation of host immunity / K. U. Saikh // *Immunol. Res.* – 2021. – Vol. 69, № 2. – P. 117–128.
333. Salave, S. Polysaccharide based implantable drug delivery: development strategies, regulatory requirements, and future perspectives / S. Salave, D. Rana, A. Sharma [et al.] // *Polysaccharides.* – 2022. – Vol. 3. – P. 625–654.
334. Salazar, F. Antifungal Innate Immunity: A Perspective from the Last 10 Years / F. Salazar, G. D. Brown // *J. Innate Immun.* – 2018. – Vol. 10, № 5–6. – P. 373–397.
335. Salehi, M. Multifaceted roles of plant-derived bioactive polysaccharides: A review of their biological functions, delivery, bioavailability, and applications within the food and pharmaceutical sectors / M. Salehi, A. Rashidinejad // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2024. – Vol. 290. – P. 138855.
336. Sales Pereira, L. H. Soluble DC-SIGN isoforms: Ligands with unknown functions - A mini-review / L. H. Sales Pereira, A. D. C. Alves, J. M. Siqueira Ferreira, L. L. Dos Santos // *Microb. Pathog.* – 2021. – Vol. 150. – P. 104731.
337. Salkeni, M. A. A phase 1/2 study of BDC-3042, a novel dectin-2 agonistic antibody, in patients with advanced cancers / M. A. Salkeni [et al.] // *JCO.* – 2024. – Vol. 42. – P. TPS2695.

338. Sándor, N. CD11c/CD18 dominates adhesion of human monocytes, macrophages and dendritic cells over CD11b/CD18 / N. Sándor, S. Lukácsi, R. Ungai-Salánki [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, № 9. – P. e0163120.
339. Santos-López, J. Structural biology of complement receptors / J. Santos-López, K. de la Paz, F. J. Fernández, M. C. Vega // *Front. Immunol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1239146.
340. Sasaki, D. Glycosidic linkage structures influence dietary fiber fermentability and propionate production by human colonic microbiota in vitro / D. Sasaki, K. Sasaki, A. Kondo // *Biotechnol. J.* – 2020. – Vol. 15. – P. e1900523.
341. Sassaki, G. L. Human ($\alpha 2 \rightarrow 6$) and avian ($\alpha 2 \rightarrow 3$) sialylated receptors of influenza A virus show distinct conformations and dynamics in solution / G. L. Sassaki, S. Elli, T. R. Rudd [et al.] // *Biochemistry*. – 2013. – Vol. 52, № 41. – P. 7217-7230.
342. Savych, A. Analysis of Inulin and Fructans in *Taraxacum officinale* L. Roots as the Main Inulin-Containing Component of Antidiabetic Herbal Mixture / A. Savych, O. Bilyk, V. Vaschuk, I. Humeniuk // *Pharmacia*. – 2021. – Vol. 68. – P. 527–532.
343. Saxena, M. NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer / M. Saxena, G. Yeretssian // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 327.
344. Schick, J. Cutting Edge: TNF Is Essential for Mycobacteria-Induced MINCLE Expression, Macrophage Activation, and Th17 Adjuvanticity / J. Schick, J. Schäfer, C. Alexander [et al.] // *J. Immunol.* – 2020. – Vol. 205, № 2. – P. 323-329.
345. Schiff, H. Mittheilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: Eine neue Reihe organischer Basen / H. Schiff // *Justus Liebigs Ann. Chem.* – 1864. – Vol. 131. – P. 118-119.
346. Schimpl, M. Human YKL-39 is a pseudo-chitinase with retained chitooligosaccharide-binding properties / M. Schimpl, C. L. Rush, M. Betou [et al.] // *Biochem. J.* – 2012. – Vol. 446, № 1. – P. 149-157.
347. Schmid, W. The micronucleus test / W. Schmid // *Mutat. Res.* – 1975. – Vol. 31. – P. 9–15.
348. Schneider, M. The innate immune sensor NLRC3 attenuates Toll-like receptor signaling via modification of the signaling adaptor TRAF6 and transcription factor NF-kappaB / M. Schneider, A. G. Zimmermann, R. A. Roberts [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2012. – Vol. 13. – P. 823–831.
349. Schneider, C. A. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis / C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri // *Nat. Methods*. – 2012. – Vol. 9. – P. 671-675.

350. Scholler, N. CD83 is an I-type lectin adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8⁺ T cells / N. Scholler, M. Hayden-Ledbetter, K. E. Hellström [et al.] // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 166, № 6. – P. 3865-3872.
351. Schorey, J. S. The pattern recognition receptor Dectin-1: from fungi to mycobacteria / J. S. Schorey, C. Lawrence // *Curr. Drug Targets.* – 2008. – Vol. 9, № 2. – P. 123-129.
352. Schreibelt, G. The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3⁺ myeloid dendritic cells / G. Schreibelt, L. J. Klinkenberg, L. J. Cruz [et al.] // *Blood.* – 2012. – Vol. 119, № 10. – P. 2284-2292.
353. Schreiber, F. Border Control: The Role of the Microbiome in Regulating Epithelial Barrier Function / F. Schreiber, I. Balas, M. J. Robinson, G. Bakdash // *Cells.* – 2024. – Vol. 13, № 6. – P. 477.
354. Scur, M. The diverse roles of C-type lectin-like receptors in immunity / M. Scur, B. D. Parsons, S. Dey, A. P. Makrigiannis // *Front. Immunol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1126043.
355. Seifert, L. Dectin-1 Regulates Hepatic Fibrosis and Hepatocarcinogenesis by Suppressing TLR4 Signaling Pathways / L. Seifert, M. Deutsch, S. Alothman [et al.] // *Cell Rep.* – 2015. – Vol. 13, № 9. – P. 1909-1921.
356. Serrano-Sevilla, I. Natural Polysaccharides for siRNA Delivery: Nanocarriers Based on Chitosan, Hyaluronic Acid, and Their Derivatives / Á. Artiga, S.G. Mitchell, L. De Matteis, J.M. de la Fuente // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24. – P. 2570.
357. Shah, M. Advances in agar-based composites: A comprehensive review / M. Shah, A. Hameed, M. Kashif [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2024. – Vol. 346. – P. 122619.
358. Shao, T. Preparation and characterization of sulfated inulin-type fructans from Jerusalem artichoke tubers and their antitumor activity / T. Shao, P. Yuan, W. Zhang [et al.] // *Carbohydr. Res.* – 2021. – Vol. 509. – P. 108422.
359. Shariati, M. A. Topinambur (The Jerusalem Artichoke): nutritional value and its application in food products: an updated treatise / M. A. Shariati, M. U. Khan, L. Hleba [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* – 2021. – Vol. 10, № 6. – P. e4737.
360. Shen, Y. Unraveling the web of defense: the crucial role of polysaccharides in immunity / Y. Shen, H. Zhao, X. Wang [et al.] // *Front. Immunol.* – 2024. – Vol. 15. – P. 1406213.

361. Shiao, S. L. Commensal bacteria and fungi differentially regulate tumor responses to radiation therapy / S. L. Shiao, K. M. Kershaw, J. J. Limon [et al.] // *Cancer Cell*. – 2021. – Vol. 39, № 9. – P. 1202-1213.e6.
362. Shoaib, M. Inulin: properties, health benefits and food applications / M. Shoaib, A. Shehzad, M. Omar [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2016. – Vol. 147. – P. 444–454.
363. Sier, C. F. Beta-glucan enhanced killing of renal cell carcinoma micrometastases by monoclonal antibody G250 directed complement activation / C. F. Sier, K. A. Gelderman, F. A. Prins, A. Gorter // *Int. J. Cancer*. – 2004. – Vol. 109, № 6. – P. 900-908.
364. Silva, T. H. Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches / T. H. Silva, A. Alves, E. G. Popa [et al.] // *Biomatter*. – 2012. – Vol. 2, № 4. – P. 278–289.
365. Simsek, M. Progress in Bioactive Polysaccharide-Derivatives: A Review / M. Simsek, T. T. Asiyanbi-Hammed, N. Rasaq, A. M. Hammed // *Food Rev. Int.* – 2023. – Vol. 39, № 3. – P. 1612–1627.
366. Singh, S. K. Characterization of murine MGL1 and MGL2 C-type lectins: distinct glycan specificities and tumor binding properties / S. K. Singh, I. Streng-Ouwehand, M. Litjens [et al.] // *Mol. Immunol.* – 2009. – Vol. 46, № 6. – P. 1240-1249.
367. Slørdal, L. Radioprotection by murine and human tumor-necrosis factor: dose-dependent effects on hematopoiesis in the mouse / L. Slørdal, M. O. Muench, D. J. Warren, M. A. Moore // *Eur. J. Haematol.* – 1989. – Vol. 43, № 5. – P. 428-434.
368. Smith, B. A. H. The clinical impact of glycobiology: targeting selectins, Siglecs and mammalian glycans / B. A. H. Smith, C. R. Bertozzi // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2021. – Vol. 20. – P. 217–243.
369. Solanki, H. K. Evaluation of anti-inflammatory activity of probiotic on carrageenan-induced paw edema in Wistar rats / H. K. Solanki, D. A. Shah, P. M. Maheriya, C. A. Patel // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2015. – Vol. 72. – P. 1277-1282.
370. Spence, S. Targeting Siglecs with a sialic acid-decorated nanoparticle abrogates inflammation / S. Spence, M. K. Greene, F. Fay [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 7, № 303. – P. 303ra140.
371. Springer, A.D. GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics / S.F. Dowdy // *Nucleic Acid Ther.* – 2018. – Vol. 28, № 3. – P. 109-118.
372. Stein, S. C. Sensing adenovirus infection: activation of interferon regulatory factor 3 in RAW 264.7 cells / S. C. Stein, E. Falck-Pedersen // *J. Virol.* – 2012. – Vol. 86, № 8. – P. 4527-4537.

373. Stone, B. A. Chemistry and biology of (1→3)- β -glucans / B. A. Stone, A. E. Clarke. – B. : Vic. La Trobe University Press, 1992.
374. Strasser, D. Syk kinase-coupled C-type lectin receptors engage protein kinase C- δ to elicit Card9 adaptor-mediated innate immunity / D. Strasser, K. Neumann, H. Bergmann [et al.] // *Immunity*. – 2012. – Vol. 36, № 1. – P. 32-42.
375. Sun, L. Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* / L. Sun, L. Wang, Y. Zhou // *Carbohydr. Polym.* – 2012. – Vol. 87, № 2. – P. 1206–1210.
376. Sun, Y. Impact of acidic, water and alkaline extraction on structural features, antioxidant activities of *Laminaria japonica* polysaccharides / Y. Sun, S. Hou, S. Song [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 112. – P. 985-995.
377. Sundaram, B. The NLR family of innate immune and cell death sensors / B. Sundaram, R. E. Tweedell, S. P. Kumar, T. Kanneganti // *Immunity*. – 2024. – Vol. 57, № 4. – P. 674-699.
378. Sunila, E. Effect of *Thuja occidentalis* and its polysaccharide on cell-mediated immune responses and cytokine levels of metastatic tumor-bearing animals / E. Sunila, T. P. Hamsa, G. Kuttan // *Pharm. Biol.* – 2011. – Vol. 49. – P. 1065-1073.
379. Szczykutowicz, J. Ligand Recognition by the Macrophage Galactose-Type C-Type Lectin: Self or Non-Self?-A Way to Trick the Host's Immune System / J. Szczykutowicz // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24, № 23. – P. 17078.
380. Taban, Q. Scavenger receptors in host defense: from functional aspects to mode of action / Q. Taban, P. T. Mumtaz, K. Z. Masoodi [et al.] // *Cell Commun. Signal.* – 2022. – Vol. 20. – P. 2.
381. Takeuchi, O. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6 / O. Takeuchi, T. Kawai, P. F. M hlradt [et al.] // *Int. Immunol.* – 2001. – Vol. 13, № 7. – P. 933–940.
382. Takeuchi, O. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins / O. Takeuchi, S. Sato, T. Horiuchi [et al.] // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 169, № 1. – P. 10–14.
383. Tavares, A. H. Turning Up the Heat: Inflammasome Activation by Fungal Pathogens / A. H. Tavares, P. H. B rgel, A. L. Bocca // *PLoS Pathog.* – 2015. – Vol. 11, № 7. – P. e1004948.
384. Than, N. G. Placental Protein 13 (PP13) - A Placental Immunoregulatory Galectin Protecting Pregnancy / N. G. Than, A. Balogh, R. Romero [et al.] // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 348.

385. Thunyakitpisal, P. Acemannan increases NF- κ B/DNA binding and IL-6/-8 expression by selectively binding Toll-like receptor-5 in human gingival fibroblasts / P. Thunyakitpisal, V. Ruangpornvisuti, P. Kengkwasing [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2017. – Vol. 161. – P. 149-157.
386. Tian, W. Study on the preparation and biological activities of low molecular weight squid ink polysaccharide from *Sepiella maindroni* / W. Tian, X. Song, F. Wang, W. Jiang // Int. J. Biol. Macromol. – 2023. – Vol. 237. – P. 124040.
387. Ting-jian, J. A study of surface enhanced Raman scattering for furfural adsorbed on silver surface / J. Ting-jian, P. Li-wei, S. Zhi-guo [et al.] // J. Mol. Struct. – 2008. – Vol. 873, № 1–3. – P. 1-4.
388. Toffoli, E. C. Natural Killer Cells and Anti-Cancer Therapies: Reciprocal Effects on Immune Function and Therapeutic Response / E. C. Toffoli, A. Sheikhi, Y. D. Höppner [et al.] // Cancers (Basel). – 2021. – Vol. 13, № 4. – P. 711.
389. Tolle, F. Neutrophils in Tumorigenesis: Missing Targets for Successful Next Generation Cancer Therapies? / F. Tolle, V. Umansky, J. Utikal, S. Kreis, S. Bréhard // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22, № 13. – P. 6744.
390. Toniasso, D. P. W. Collagen extracted from rabbit: Meat and by-products: Isolation and physicochemical assessment / D. P. W. Toniasso, C. Giacomelli da Silva, B. de Souza Brum Junior [et al.] // Food Res. Int. – 2022. – Vol. 162, Pt A. – P. 111967.
391. Usov, A. I. A new chemical tool for characterization and partial depolymerization of red algal galactans / A. I. Usov // Hydrobiologia. – 1993. – Vol. 260/261. – P. 641-645.
392. Usov, A. I. Polysaccharides of algae. Polysaccharides composition of several calcareous red algae – isolation of alginate from *Corallina pilulifera* (Rhodophyta, Corallinaceae) / A. I. Usov, M. I. Bilan, N. G. Klochkova // Botanica Marina. – 1995. – Vol. 38. – P. 43–51.
393. Valentino, C. Current Status of Polysaccharides-Based Drug Delivery Systems for Nervous Tissue Injuries Repair / C. Valentino, B. Vigani, G. Sandri, F. Ferrari, S. Rossi // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15, № 2. – P. 400.
394. van de Veerdonk, F. L. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans* / F. L. van de Veerdonk, R. J. Marijnissen, B. J. Kullberg [et al.] // Cell Host Microbe. – 2009. – Vol. 5, № 4. – P. 329-340.
395. van den Berg, L. M. Caveolin-1 mediated uptake via langerin restricts HIV-1 infection in human Langerhans cells / L. M. van den Berg, C. M. S. Ribeiro, E. M. Zijlstra-Willems [et al.] // Retrovirology. – 2014. – Vol. 11. – P. 123.

396. van der Zande, H. The mannose receptor: from endocytic receptor and biomarker to regulator of (meta)inflammation / H. van der Zande, D. Nitsche, L. Schlautmann [et al.] // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 765034.
397. van Kooyk, Y. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses / Y. van Kooyk, G. A. Rabinovich // *Nat. Immunol.* – 2008. – Vol. 9. – P. 593–601.
398. van Kooyk, Y. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens / Y. van Kooyk, T. Geijtenbeek // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 3. – P. 697–709.
399. Van Lint, S. A bispecific Clec9A-PD-L1 targeted type I interferon profoundly reshapes the tumor microenvironment towards an antitumor state / S. Van Lint, A. Van Parys, B. Van Den Eeckhout [et al.] // *Mol. Cancer.* – 2023. – Vol. 22. – P. 191.
400. van Noordwijk, A. J. An accurate method for estimating an approximate lethal dose with few animals, tested with a Monte Carlo procedure / A. J. van Noordwijk, J. van Noordwijk // *Arch. Toxicol.* – 1988. – Vol. 61, № 5. – P. 333-343.
401. Vandanjon, L. The Use of FTIR Spectroscopy as a Tool for the Seasonal Variation Analysis and for the Quality Control of Polysaccharides from Seaweeds / L. Vandanjon, A. S. Burlot, E. F. Zamanileha [et al.] // *Mar. Drugs.* – 2023. – Vol. 21, № 9. – P. 482.
402. Vandendriessche, S. Complement Receptors and Their Role in Leukocyte Recruitment and Phagocytosis / S. Vandendriessche, S. Cambier, P. Proost, P. E. Marques // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2021. – Vol. 9. – P. 624025.
403. Varki, A. Essentials of Glycobiology [Internet] / A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko [et al.] ; editors. – 4th ed. – Cold Spring Harbor (NY) : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022.
404. Varki, A. Biological roles of glycans / A. Varki // *Glycobiology.* – 2017. – Vol. 27, № 1. – P. 3-49.
405. Vasta, G. R. F-Type Lectins: A Highly Diversified Family of Fucose-Binding Proteins with a Unique Sequence Motif and Structural Fold, Involved in Self/Non-Self-Recognition / G. R. Vasta, L. M. Amzel, M. A. Bianchet [et al.] // *Front. Immunol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1648.
406. Vasta, G. R. F-Type Lectins: Structure, Function, and Evolution / G. R. Vasta, C. Feng // *Methods Mol. Biol.* – 2020. – Vol. 2132. – P. 225-239.
407. Verkerke, H. Galectins: An Ancient Family of Carbohydrate Binding Proteins with Modern Functions / H. Verkerke, M. Dias-Baruffi, R. D. Cummings, C. M. Arthur, S. R. Stowell // *Methods Mol. Biol.* – 2022. – Vol. 2442. – P. 1-40.

408. Vidya, M. K. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals / M. K. Vidya, V. G. Kumar, V. Sejian [et al.] // *Int. Rev. Immunol.* – 2018. – Vol. 37, № 1. – P. 20-36.
409. Vijay, U. Microbial Mutagenicity Assay: Ames Test / U. Vijay, S. Gupta, P. Mathur, P. Suravajhala, P. Bhatnagar // *Bio Protoc.* – 2018. – Vol. 8, № 6. – P. e2763.
410. Villar, J. C-type lectin receptors MR and DC-SIGN are involved in recognition of hemocyanins, shaping their immunostimulatory effects on human dendritic cells / J. Villar, M. L. Salazar, J. M. Jiménez [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2021. – Vol. 51, № 7. – P. 1715-1731.
411. Villela, K. S. V. Stability of starch-folic acid/ polyethylene glycol particles for gastrointestinal drug delivery / K. S. V. Villela, R. B. Galindo, R. E. Neira [et al.] // *Food Hydrocoll.* – 2024. – Vol. 157. – P. 110318.
412. Vladimirovich, P. V. Study of embryotoxic and teratogenic properties of Medicine No. 60 and evaluation of its effect on the reproductive function of rats / P. V. Vladimirovich // *J. Popul. Ther. Clin. Pharmacol.* – 2022. – Vol. 29, № 1. – P. e40-e49.
413. Wagener, M. Dectin-1-Syk-CARD9 Signaling Pathway in TB Immunity / M. Wagener, J. Hoving, H. Ndlovu, M. J. Marakalala // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 225.
414. Wagner, R. Carrageenan and insulin resistance in humans: a randomised double-blind cross-over trial / R. Wagner, J. Buettner, M. Heni [et al.] // *BMC Med.* – 2024. – Vol. 22, № 1. – P. 558.
415. Wakshull, E. PGG-glucan, a soluble beta-(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF-kappa B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid beta-(1,3)-glucan receptor / E. Wakshull, D. Brunke-Reese, J. Lindermuth [et al.] // *Immunopharmacol.* – 1999. – Vol. 41, № 2. – P. 89-107.
416. Wallace, W. A. Inflammation-associated remodelling and fibrosis in the lung - a process and an end point / W. A. Wallace, P. M. Fitch, A. J. Simpson, S. E. Howie // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2007. – Vol. 88, № 2. – P. 103-110.
417. Wan, F. Highly sensitive and reproducible CNTs@Ag modified Flower-Like silver nanoparticles for SERS situ detection of transformer Oil-dissolved furfural / F. Wan, Y. Lei, C. Wang [et al.] // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2022. – Vol. 273. – P. 121067.

418. Wan, X. Antiviral activity against respiratory syncytial virus of polysaccharide from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) / X. Wan, Z. Liu, Y. Wang [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2022. – P. 1809879.
419. Wang, H. Study on the Structural Features of Eight *Dendrobium* Polysaccharides and Their Protective Effects on Gastric Mucosa / H. Wang, Y. Wang, Y. Liu [et al.] // *Foods.* – 2024. – Vol. 13, № 18. – P. 3011.
420. Wang, J. Biosorbents for heavy metals removal and their future / J. Wang, C. Chen // *Biotechnol. Adv.* – 2009. – Vol. 27, № 2. – P. 195-226.
421. Wang, X. The role of IL-6 in coronavirus, especially in COVID-19 / X. Wang, G. Tang, Y. Liu [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 1033674.
422. Wang, X. F. The Therapeutic Potential of Plant Polysaccharides in Metabolic Diseases / X. F. Wang, X. Chen, Y. Tang [et al.] // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2022. – Vol. 15, № 11. – P. 1329.
423. Wang, Y. Astragalus polysaccharides protect against inactivated *Vibrio alginolyticus*-induced inflammatory injury in macrophages of large yellow croaker / Y. Wang, Z. Wu, H. Chen [et al.] // *Fish Shellfish Immunol.* – 2022. – Vol. 131. – P. 95-104.
424. Wang, Y. X. Revealing the architecture and solution properties of polysaccharide fractions from *Macrolepiota albuminosa* (Berk.) Pegler / Y. X. Wang, Y. Xin, J. Y. Yin [et al.] // *Food Chem.* – 2022. – Vol. 368. – P. 130772.
425. Wang, Z. Regulation strategy, bioactivity, and physical property of plant and microbial polysaccharides based on molecular weight / Z. Wang, X. Zhou, Z. Shu [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2023. – Vol. 244. – P. 125360.
426. Wang, Z. Immunomodulatory effect of APS and PSP is mediated by Ca²⁺(+)-cAMP and TLR4/NF- κ B signaling pathway in macrophage / Z. Wang, Z. Liu, L. Zhou [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2016. – Vol. 94.
427. Wang, Q. β -Glucans: Relationships between modification, conformation, and functional activities / Q. Wang, X. Sheng, A. Shi [et al.] // *Molecules.* – 2017. – Vol. 22, № 2. – P. 257.
428. Weber, K. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis / K. Weber, M. Osborn // *J. Biol. Chem.* – 1969. – Vol. 244, № 16. – P. 4406-4412.
429. Wei, J. Toll-like receptor 4: A potential therapeutic target for multiple human diseases / J. Wei, Y. Zhang, H. Li, F. Wang, S. Yao // *Biomed. Pharmacother.* – 2023. – Vol. 166. – P. 115338.

430. Weigle, W. O. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in the guinea pig and rabbit / W. O. Weigle, C. G. Cochrane, F. J. Dixon // *J. Immunol.* – 1960. – Vol. 85. – P. 469-477.
431. Wettschureck, N. Passing the Vascular Barrier: Endothelial Signaling Processes Controlling Extravasation / N. Wettschureck, B. Strilic, S. Offermanns // *Physiol. Rev.* – 2019. – Vol. 99, № 3. – P. 1467-1525.
432. Wheeler-Aceto, H. Neurogenic and tissue-mediated components of formalin-induced edema: Evidence for supraspinal regulation / H. Wheeler-Aceto, A. Cowan // *Agents Actions.* – 1991. – Vol. 34. – P. 264–269.
433. Wiederschain, G. Y. Glycobiology: progress, problems, and perspectives / G. Y. Wiederschain // *Biochemistry.* – 2013. – Vol. 78. – P. 679–696.
434. Wienke, D. The Collagen Receptor Endo180 (CD280) Is Expressed on Basal-like Breast Tumor Cells and Promotes Tumor Growth In vivo / D. Wienke, G. C. Davies, D. A. Johnson [et al.] // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67, № 21. – P. 10230–10240.
435. Wiercigroch, E. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review / E. Wiercigroch, E. Szafraniec, K. Czamara [et al.] // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2017. – Vol. 185. – P. 317-335.
436. Wilkinson, H. Current Methods for the Characterization of O-Glycans / H. Wilkinson, R. Saldoval // *J. Proteome Res.* – 2020. – Vol. 19, № 10. – P. 3890-3905.
437. Williams, S. J. Sensing Lipids With Mincle: Structure and Function / S. J. Williams // *Front. Immunol.* – 2017. – Vol. 8.
438. Wilson, K. Principles and Techniques of Practical Biochemistry / K. Wilson, J. Walker. – 7th ed. – C. : Cambridge University Press, 2010.
439. Wu, T. H. Long-term suppression of tumor growth by TNF requires a Stat1- and IFN regulatory factor 1-dependent IFN-gamma pathway but not IL-12 or IL-18 / T. H. Wu, C. N. Pabin, Z. Qin [et al.] // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172, № 5. – P. 3243-3251.
440. Xu, Y. CD44 and its implication in neoplastic diseases / Y. Xu, Z. Bai, T. Lan, C. Fu, P. Cheng // *MedComm (2020).* – 2024. – Vol. 5, № 6. – P. e554.
441. Xu, X. Immunomodulatory Mechanisms of an Acidic Polysaccharide from the Fermented Burdock Residue by *Rhizopus Nigricans* in RAW264.7 Cells and Cyclophosphamide-Induced Immunosuppressive Mice / X. Xu, T. Shao, Y. Meng [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2023. – Vol. 252. – P. 126462.
442. Xuan, S. Langerin-expressing dendritic cells in pulmonary immune-related diseases / S. Xuan, Y. Li, Y. Wu [et al.] // *Front. Med. (Lausanne).* – 2022. – Vol. 9. – P. 909057.

443. Han, Y. / Y. Han, K. Ouyang, J. Li [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – Vol. 159. – P. 108–116.
444. Matsuoka, Y. IL-6 controls resistance to radiation by suppressing oxidative stress via the Nrf2-antioxidant pathway in oral squamous // *Br J Cancer.* – 2016. – Vol. 115. – P. 1234–1244.
445. Yamada, K. Recent advances in the analysis of carbohydrates for biomedical use / K. Yamada, K. Kakehi // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2011. – Vol. 55, № 4. – P. 702-727.
446. Yamamoto, S. Role of Nod2 in the development of Crohn's disease / S. Yamamoto, X. Ma // *Microbes Infect.* – 2009. – Vol. 11, № 12. – P. 912-918.
447. Yamamoto, Y. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages / Y. Yamamoto, T. W. Klein, H. Friedman // *Infect. Immun.* – 1997. – Vol. 65, № 3. – P. 1077-1082.
448. Yamasaki, S. Mincle is an ITAM-Coupled Activating Receptor That Senses Damaged Cells / S. Yamasaki, E. Ishikawa, M. Sakuma [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2008. – Vol. 9, № 10. – P. 1179–1188.
449. Yamasaki, S. C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia* / S. Yamasaki, M. Matsumoto, O. Takeuchi [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2009. – Vol. 106, № 6. – P. 1897–1902.
450. Yan, Y. Preparation and characterization of Konjac glucomannan and pullulan composite films for strawberry preservation / Y. Yan, S. Duan, H. Zhang [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2020. – Vol. 243. – P. 116446.
451. Yang, K. Host Langerin (CD207) is a receptor for *Yersinia pestis* phagocytosis and promotes dissemination / K. Yang, C. G. Park, C. Cheong [et al.] // *Immunol. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 93, № 9. – P. 815-824.
452. Yang, K. The effect mechanism of polysaccharides inhibit tumor immune escape: A review / K. Yang, J. Chen, J. Chen [et al.] // *J. Funct. Foods.* – 2023. – Vol. 107. – P. 105638.
453. Yang, L. Q. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources / L. Q. Yang, L. M. Zhang // *Carbohydr. Polym.* – 2009. – Vol. 76. – P. 349–361.
454. Yee, E. J. Group XIV C-type lectins: emerging targets in tumor angiogenesis / E. J. Yee, I. Vigil, Y. Sun [et al.] // *Angiogenesis.* – 2024. – Vol. 27. – P. 173–192.

455. Yin, M. Advances in Research on Immunoregulation of Macrophages by Plant Polysaccharides / M. Yin, Y. Zhang, H. Li // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 145.
456. Yoshida, H. Identification of the Lectin-Like Receptor for Oxidized Low-Density Lipoprotein in Human Macrophages and its Potential Role as a Scavenger Receptor / H. Yoshida, N. Kondratenko, S. Green [et al.] // *Biochem. J.* – 1998. – Vol. 334. – P. 9–13.
457. Yu, H. Scavenger receptor A (SR-A) is required for LPS-induced TLR4 mediated NF- κ B activation in macrophages / H. Yu, T. Ha, L. Liu [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1823, № 7. – P. 1192-1198.
458. Yu, Q. D. Autonomous tetramerization domains in the glycan-binding receptors DC-SIGN and DC-SIGNR / Q. D. Yu, A. P. Oldring, A. S. Powlesland [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 387, № 5. – P. 1075-1080.
459. Yu, Y. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review / Y. Yu, M. Shen, Q. Song, J. Xie // *Carbohydr. Polym.* – 2018. – Vol. 183. – P. 91-101.
460. Zacharius, R. M. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels / R. M. Zacharius, T. E. Zell, J. H. Morrison, J. J. Woodlock // *Anal. Biochem.* – 1969. – Vol. 30. – P. 148-152.
461. Zaheer-ul-Haq. Family 18 chitolectins: comparison of MGP40 and HUMGP39 / Zaheer-ul-Haq, P. Dalal, N. N. Aronson Jr, J. D. Madura // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 359, № 2. – P. 221-226.
462. Zahm, J. M. The effect of hyaluronan on airway mucus transport and airway epithelial barrier integrity: potential application to the cytoprotection of airway tissue / J. M. Zahm, M. Milliot, A. Bresin [et al.] // *Matrix Biol.* – 2011. – Vol. 30, № 7-8. – P. 389-395.
463. Zaichkina, S. I. Induction of the Adaptive Response in Mice Exposed to He-Ne Laser and X-Ray Radiation / S. I. Zaichkina, A. R. Dyukina, O. M. Rozanova [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2016. – Vol. 161. – P. 24–27.
464. Zappe, A. State-of-the-art glycosaminoglycan characterization / A. Zappe, R. L. Miller, W. B. Struwe, K. Pagel // *Mass Spectrom. Rev.* – 2022. – Vol. 41, № 6. – P. 1040-1071.
465. Zargarzadeh, M. Biomedical applications of laminarin / M. Zargarzadeh, A. J. R. Amaral, C. A. Custódio, J. F. Mano // *Carbohydr. Polym.* – 2020. – Vol. 232. – P. 115774.

466. Zhang, B. Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate-Protein Interactions and Their Biological Functions in Human Diseases: Implications and Analytical Tools / B. Zhang, L. Chi // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2021. – Vol. 9. – P. 693563.
467. Zhang, C. Correlation of conformational changes and immunomodulatory activity of lentinan under different subcritical water temperature / C. Zhang, F. Qian, Y. Hua [et al.] // *Food Biosci.* – 2022. – Vol. 50, Pt A. – P. 102061.
468. Zhang, C. H. Purification, partial characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Glycyrrhiza uralensis* / C. H. Zhang, Y. Yu, Y. Z. Liang, X. Q. Chen // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2015. – Vol. 79. – P. 681–686.
469. Zhang, J. A Comprehensive Review of Small Interfering RNAs (siRNAs): Mechanism / B. Chen, C. Gan, H. Sun [et al.] // *Therapeutic Targets, and Delivery Strategies for Cancer Therapy. Int. J. Nanomedicine.* – 2023. – Vol. 18. – P. 7605-7635.
470. Zhang, J. Enabling tumor-specific drug delivery by targeting the Warburg effect of cancer / T. Pan, J. Lee, S. Goldberg [et al.] // *Cell. Rep. Med.* – 2025. – Vol. 6, № 1. – P. 101920.
471. Zhang, J. Microglial CR3 activation triggers long-term synaptic depression in the hippocampus via NADPH oxidase / J. Zhang, A. Malik, H. B. Choi [et al.] // *Neuron.* – 2014. – Vol. 82, № 1. – P. 195-207.
472. Zhang, X. Protective effect of Astragalus polysaccharide on endothelial progenitor cells injured by thrombin / X. Zhang, K. Yao, L. Ren [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2015. – Vol. 82.
473. Zhang, Y. Astragalus polysaccharides alleviate DSS-induced ulcerative colitis in mice by restoring SCFA production and regulating Th17/Treg cell homeostasis in a microbiota-dependent manner / Y. Zhang, W. Ji, H. Qin [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2025. – Vol. 349, Pt A. – P. 122829.
474. Zhao, C. Influence of Host Sialic Acid Receptors Structure on the Host Specificity of Influenza Viruses / C. Zhao, J. Pu // *Viruses.* – 2022. – Vol. 14, № 10. – P. 2141.
475. Zhao, L. Natural Polymer-Based Hydrogels: From Polymer to Biomedical Applications / Y. Zhou, J. Zhang, H. Liang [et al.] // *Pharmaceutics.* – 2023. – Vol. 15, № 10. – P. 2514.
476. Zhao, T. Schisandra polysaccharide evokes immunomodulatory activity through TLR 4-mediated activation of macrophages / T. Zhao, Y. Feng, J. Li [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2014. – Vol. 65. – P. 33–40.

477. Zhao, X. Mannose receptor mediated phagocytosis of bacteria in macrophages of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in a Ca(2+)-dependent manner / X. Zhao, L. Liu, A. M. Hegazy [et al.] // *Fish Shellfish Immunol.* – 2015. – Vol. 43, № 2. – P. 357-363.
478. Zhao, X. Sustainable bioplastics derived from renewable natural resources for food packaging / X. Zhao, Y. Wang, X. Chen [et al.] // *Matter.* – 2023. – Vol. 6, № 1. – P. 97-127.
479. Zhao, X. Q. C-type lectin receptor dectin-3 mediates trehalose 6,6'-dimycolate (TDM)-induced Mincle expression through CARD9/Bcl10/MALT1-dependent nuclear factor (NF)- κ B activation / X. Q. Zhao, L. L. Zhu, Q. Chang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, № 43. – P. 30052-30062.
480. Zhao, Z. Prognostic and immunotherapeutic significance of mannose receptor C type II in 33 cancers: an integrated analysis / Z. Zhao, Y. Yang, Z. Liu [et al.] // *Front. Mol. Biosci.* – 2022. – Vol. 9. – P. 951636.
481. Zheng, D. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms / D. Zheng, T. Liwinski, E. Elinav // *Cell Discov.* – 2020. – Vol. 6. – P. 36.
482. Zheng, M. TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines / M. Zheng, R. Karki, E. P. Williams [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2021. – Vol. 22. – P. 829–838.
483. Zhong, X. Immunomodulatory Effect and Biological Significance of β -Glucans / X. Zhong, G. Wang, F. Li [et al.] // *Pharmaceutics.* – 2023. – Vol. 15, № 6. – P. 1615.
484. Zhou, J. Y. Integration of IL-2 and IL-4 signals coordinates divergent regulatory T cell responses and drives therapeutic efficacy / J. Y. Zhou, C. A. Alvarez, B. A. Cobb // *Elife.* – 2021. – Vol. 10. – P. e57417.
485. Zhu, L. L. C-type lectin receptors Dectin-3 and Dectin-2 form a heterodimeric pattern-recognition receptor for host defense against fungal infection / L. L. Zhu, X. Q. Zhao, C. Jiang [et al.] // *Immunity.* – 2013. – Vol. 39, № 2. – P. 324-334.
486. Zhu, Z. Yeast β -glucan modulates macrophages and improves antitumor NK-cell responses in cancer / Z. Zhu, L. He, Y. Bai [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 2023. – Vol. 214, № 1. – P. 50-60.
487. Zou, X. Isolation, Structure Characterization and in Vitro Immune-Enhancing Activity of a Glucan from the Peels of Stem Lettuce (*Lactuca sativa*) / X. Zou, M. Shen, J. Li [et al.] // *J. Sci. Food Agric.* – 2024. – Vol. 104. – P. 2097–2109.

488. Zumbo, P. Phenol-chloroform extraction / P. Zumbo. – New York, NY : Weill Cornell Medical College, 1979.
489. Усов, А. И. Количественное определение производных 3,6-ангидрогалактозы и специфическое расщепление галактанов красных водорослей в условиях восстановительного гидролиза / А. И. Усов, М. Я. Элашвили // Биоорган. химия. – 1991. – Т. 17, № 6. – С. 839-848.
490. Агапов, А. В. Формирование высокоинтенсивного пучка протонов для исследования флэш-эффекта в радиотерапии / А. В. Агапов [и др.] // Медицинская физика. – 2023. – № 4. – С. 29–39.
491. Адельянов, А. М. Использование энтропии в анализе временных рядов (обзор) / А. М. Адельянов, Е. А. Генералов, Ч. Вэнь, Л. В. Яковенко // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3: Физика, астрономия. – 2024. – Т. 79, № 4. – С. 2440701-1 - 2440701-11.
492. Ахмадуллина, Ю. Р. Изучение возрастной зависимости спонтанной частоты лимфоцитов с микроядрами у жителей Южного Урала / Ю. Р. Ахмадуллина // Социально-экологические технологии. – 2021. – Т. 11, № 2. – С. 230–245.
493. Белошапко, В. А. Модель активации клеток через TLR4 и TNFR2 рецепторы / В. А. Белошапко, Е. А. Генералов, Л. В. Яковенко // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физ. Астрон. – 2019. – Т. 6. – С. 866.
494. Генералов, Е. А. Биологические эффекты сигналинга полисахаридов / Е. А. Генералов, Л. В. Яковенко // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2018. – Т. 3, № 3. – С. 588-597.
495. Генералов, Е. А. Структура и радиопротекторные свойства нетоксичного полисахарида из *Heliantnus Tuberosus L.* / Е. А. Генералов // Биофизика. – 2014. – Т. 59, № 3. – С. 439-445.
496. Генералов, Е. А. влияние полисахаридов на течение COVID-19 / Е. А. Генералов, Л. В. Генералова // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – Севастополь: Севастопольский государственный университет, 2020. – Т. 5, № 4. – С. 693 696.
497. Генералов, Е. А. Возможные молекулярные механизмы действия полисахаридов при вирусных заболеваниях / Е. А. Генералов, Е. Ю. Симоненко, Л. В. Яковенко // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – Севастополь: Севастопольский государственный университет, 2022. – Т. 7, № 4. – С. 613-618.

498. Генералов, Е. А. Спектральные характеристики и моносахаридный состав противовирусного полисахаридного индуктора интерферона из *Helianthus Tuberosus L.* / Е. А. Генералов // Биофизика. – 2015. – Т. 60, № 1. – С. 65-72.
499. Генералов, Е. А. Водно-растворимый полисахарид из *Helianthus tuberosus L.*: радиозащитная, колониестимулирующая и иммуномодулирующая активность / Е. А. Генералов // Биофизика. – 2015. – Т. 60, № 1. – С. 73-79.
500. Генералов, Е. А. Молекулярный механизм действия полисахарида из *Helianthus tuberosus L.* / Е. А. Генералов, А. И. Афремова // Биофизика. – 2016. – Т. 61, № 4. – С. 660-668.
501. Генералов, Е. А. Автоволновая модель бифуркационного поведения трансформированных клеток под действием полисахарида / Е. А. Генералов, Н. Т. Левашова, А. Э. Сидорова [и др.] // Биофизика. – 2017. – Т. 62, № 5. – С. 660-668.
502. Генералов, Е. А. Биофизические характеристики и взаимодействие с рецепторами Dectin-1 и TLR-6 природных полисахаридов из *Helianthus tuberosus L.* : дис. канд. физ.-мат. наук: 03.01.02, 03.01.08 / Генералов Евгений Александрович. – М., 2017. – 192 с.
503. Генералов, Е. А. Изучение структуры и иммуноадьювантной активности глюкана «АДВА» / Е. А. Генералов // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ. – 2013. – Т. 68, № 6. – С. 35-41.
504. Генералов, Е. А. Молекулярные основы биологической активности полисахаридов при ассоциированных с COVID-19 состояниях / Е. А. Генералов, Е. Ю. Симоненко, Н. Г. Кульченко, Л. В. Яковенко // Биомедицинская химия. – 2022. – Т. 68, № 5. – С. 403-418.
505. Генералов, Е. А. Состав и митогенная активность полисахарида из *Solanum tuberosum L.* / Е. А. Генералов, Л. В. Яковенко // Биофизика. – 2023. – Т. 68, № 5. – С. 856-862.
506. Генералов, Е. А. Физико-химические подходы к анализу природных полисахаридов / Е. А. Генералов // AUDITORIUM. – 2015. – № 4. – С. 1-17.
507. Генералова, Л. В. Полисахарид из *Solanum tuberosum L.* как потенциальных противоязвенный препарат / Л. В. Генералова, К. А. Крицкая, Д. П. Ларюшкин, Е. А. Генералов // Биофизика. – 2024. – Т. 69, № 6.
508. ГОСТ 33044-2014. Межгосударственный стандарт. Принципы надлежащей лабораторной практики. – М. : Стандартинформ, 2015. – 16 с.

509. Калмыкова, Е. Н. Структура О-специфического полисахарида из липополисахарида *Yersinia enterocolitica* серовара О : 6,31 / Е. Н. Калмыкова, Р. П. Горшкова, В. В. Исаков, Ю. С. Оводов // Биоорг. химия. – 1988. – Т. 14, № 5. – С. 652-657.
510. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. Н. Миронов [и др.]. – М. : Гриф и К, 2012. – 944 с.
511. Мурзина, Е. В. Влияние бета-D-глюкана на выживаемость и гемопоэтические показатели мышц после воздействия рентгеновского излучения / Е. В. Мурзина, Г. А. Софронов, А. С. Симбирцев [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2023. – Т. 23, № 1. – С. 53-66.
512. Попучиев, В. В. Влияние ингибирования стероидогенеза на структурные повреждения эндокринных клеток после у-облучения / В. В. Попучиев, А. Г. Конопляников, Л. Н. Михина // Молекулярная медицина. – 2014. – № 5. – С. 61-64.
513. Решение Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» [Электронный ресурс] // Евразийский экономический союз. – URL: <https://www.eaeunion.org/> (дата доступа: 21.07.2024).
514. Сеницын, А. П. Биоконверсия возобновляемой растительной биомассы на примере биоэтанола: сырьё, предобработка, ферменты, процессы, экономика (Обзор) / А. П. Сеницын, О. А. Сеницына // Успехи биологической химии. — 2021. — Т. 61. — С. 347–414.
515. Сеницын, А. П. Возможности экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum* для получения промышленно важных ферментов (Обзор) / А. П. Сеницын, О. А. Сеницына, А. М. Рожкова // Биотехнология. — 2020. — Т. 36, № 6. — С. 24–41.
516. Трещалина, Е. М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств / Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 642-657.
517. Чулкин, А. М. Влияние моно- и олигосахаридов на транскрипцию гена *cbh1* в мицелиальном грибе *Penicillium verruculosum* / А. М. Чулкин, И. Н. Зоров, И. А. Шашков [и др.] // Биотехнология. — 2021. — Т. 37, № 1. — С. 45–53.

518. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / под ред. З. П. Софьиной, А. Б. Сыркина (СССР), А. Голдина, А. Кляйна (США). – М.: Медицина, 1980. – 295 с.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus:

A1. **Генералов Е.А.** Изучение структуры и иммуноадаптивной активности глюкана «АДВА» / **Е.А. Генералов** // Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия. – 2013. – N 6. – С. 35-41. (Объем 0,8 п.л.). EDN: RRQKQD. [**Generalov E.A.** Study of the structure and immunoenhancing activity of glucan ADVA / **E.A. Generalov** // Moscow University Physics Bulletin. – 2013. – Vol. 68. – N 6. – P. 470-477. Импакт-фактор 0,17 (JIF). (Объем 0,9 п.л., вклад 100%). EDN: SLLXZV].

A2. Белошапко В.А. и др. Модель активации клеток через TLR4 и TNFR2 рецепторы / В.А. Белошапко, **Е.А. Генералов**, Л.В. Яковенко // Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия. – 2019. – N 6. – С. 86-92. (Объем 0,7 п.л., вклад 60%). EDN: HPKRRN. [Beloshapko V.A. et al. Model of Cell Activation through TLR4 and TNFR2 Receptors / V.A. Beloshapko, **E.A. Generalov**, L.V. Yakovenko // Moscow University Physics Bulletin. – 2019. – Vol. 74. – N 6. – P. 662–668. Импакт-фактор 0,17 (JIF). (Объем 0,8 п.л., вклад 60%). EDN: RWQHRD].

A3. Nechipurenko Y.D. et al. The Role of Acidosis in the Pathogenesis of Severe Forms of COVID-19 / Y.D. Nechipurenko, D.A. Semyonov, I.A. Lavrinenko, D.A. Lagutkin, **E.A. Generalov**, A.Y. Zaitceva, O.V. Matveeva, Y.E. Yegorov // Biology. – 2021. – Vol. 10. – N 9. – P. 852. (IF 3,6). (Объем 1,7 п.л., вклад 50%). EDN: AOOUCS.

A4. **Генералов Е.А.** и др. Молекулярные основы биологической активности полисахаридов при ассоциированных с COVID-19 состояниях / **Е.А. Генералов**, Е.Ю. Симоненко, Н.Г. Кульченко, Л.В. Яковенко // Биомедицинская химия. – 2022. – Т. 68. – N 6. – С. 403-418. (Объем 1,9 п.л., вклад 80%). (**Generalov E.A.** et al. Molecular basis of biological activity of polysaccharides in COVID-19 associated conditions / **E.A. Generalov**, E.Yu. Simonenko, N.G. Kulchenko, L.V. Yakovenko // Biomeditsinskaya Khimiya. – 2022. – Vol. 68. – N 6. – P. 403-418. Импакт-фактор 0,18 (JIF). (Объем 1,9 п.л., вклад 80%). EDN: TABMCP].

A5. **Generalov E.A.** et al. Receptor basis of biological activity of polysaccharides / **E.A. Generalov**, L.V. Yakovenko // Biophysical Reviews – 2023. – Vol. 15. – N 5. – P. 1209-1222. Импакт-фактор 4,9 (JIF). (Объем 1,6 п.л., вклад 90%). EDN: RPTDFM.

A6. **Генералов Е.А.** и др. Состав и митогенная активность полисахарида из *Solanum tuberosum* L. / **Е.А. Генералов**, Л.В. Яковенко // Биофизика. – 2023. – Т. 68. – N 5. – С. 856-862. (Объем 0,8 п.л., вклад 90%). EDN: PGFGGA. [**Generalov E.A.** et al. The Composition and Mitogenic Activity of Polysaccharide from *Solanum tuberosum* L. / **E.A. Generalov**, L.V. Yakovenko // Biophysics. – 2023. – Vol. 68. – N 5. – P. 698–704. Импакт-фактор 0,25 (JIF). (Объем 0,8 п.л., вклад 90%). EDN: IQJWPA].

A7. Generalova L.V. et al. Evaluation of the Polysaccharide “Immeran” Activity in Syrian hamsters’ Model of SARS-CoV-2 / L.V. Generalova, D.P. Laryushkin, I.A. Leneva, A.V. Ivanina, G.V. Trunova, S.V. Dolinnyi, **E.A. Generalov** // Viruses. – 2024. – Vol. 16. – N 3. – P. 423. Импакт-фактор 3,8 (JIF). (Объем 1,7 п.л., вклад 80%). EDN: DLVGNE.

A8. **Generalov E.** et al. Polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L. as a Potential Radioprotector / **E. Generalov**, A. Dyukina, A. Shemyakov, G. Mytsin, A. Agapov, K. Kritskaya, A. Kosenkov, S. Gaidin, S. Maiorov, L. Generalova, D. Laryushkin // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2024. – Vol. 733. – P. 150442. Импакт-фактор 2,5 (JIF). (Объем 0,8 п.л., вклад 70%). EDN: DJWXIF.

A9. Адельянов А.М. и др. Использование энтропии в анализе временных рядов / А.М. Адельянов, **Е.А. Генералов**, Ч. Вэнь, Л.В. Яковенко // Вестник Московского Университета. Серия 3. Физика. Астрономия. – 2024. – N 4. – С. 24407011–244070111. (Объем 1,3 п.л., вклад 50%). EDN: CKHHNA. [Adelyanov A. et al. Using Entropy in Time Series Analysis / A. Adelyanov, **E. Generalov**, W. Zhen, L. Yakovenko // Moscow University Physics Bulletin. – 2024. – Vol. 79. – N 4. – P. 415–425. (Объем 1,2 п.л., вклад 50%). Импакт-фактор 0,17 (JIF). EDN: HXARBE].

A10. Киселева М.П. и др. Влияние полисахарида из *Helianthus tuberosus* L. на антипролиферативную активность производного п-гликозида индоло[2,3-а] карбазола ЛХС-1269 / М.П. Киселева, И.С. Голубева, В.П. Дерягина, А.В. Ланцова, Л.В. Эктова, Е.А. Корнюшенков, Л.М. Борисова, **Е.А. Генералов** // Биофизика. – 2024. – Т. 69. – N 5. – С. 1109-1117. (Объем 1,0 п.л., вклад 60%). EDN: MIXHCU. [Kiseleva M.P. et al. Influence of Polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L. on Antiproliferative Activity of N-Glycoside Indolo[2,3-a]carbazole Derivative LCS-1269 / M.P. Kiseleva, I.S. Golubeva, V.P. Deryagina, A.V. Lantsova, L.V. Ektova, E.A. Kornushenkov, L.M. Borisova, **E.A. Generalov** // Biophysics. – 2024. – Vol. 69. – N 5. – P. 1109–1117. (Объем 0,9 п.л., вклад 60%). Импакт-фактор 0,25 (JIF). EDN: BSHEJI].

A11. Генералова Л.В. и др. Полисахарид из *Solanum tuberosum* L. как потенциальный противоязвенный препарат / Л.В. Генералова, К.А. Крицкая, Д.П. Ларюшкин, **Е.А. Генералов** // Биофизика. – 2024. – Т. 69. – N 6. – С. 1376-1381. (Объем 0,7 п.л., вклад

70%). EDN: NJKCQE. [Generalova L.V. et al. Polysaccharide from *Solanum tuberosum* L. as a Potential Antiulcer Drug / L.V. Generalova, K.A. Kritskaya, D.P. Laryushkin, **E.A. Generalov** // Biophysics. – 2024. – Vol. 69. – N 6. – P. 1376-1381. (Объем 0,6 п.л., вклад 70%). Импакт-фактор 0,25 (JIF). EDN: UYDIEL].

A12. **Generalov E.** et al. Immune Basis of Therapeutic Effects of *Solanum tuberosum* L. Polysaccharide on Chronic Peptic Ulcer Healing / **E. Generalov**, D. Laryushkin, K. Kritskaya, N. Kulchenko, A. Sinitsyn, L. Yakovenko, L. Generalova, N. Belostotsky // Pharmaceuticals. – 2025. – Vol. 18. – N 4. – P. 502. Импакт-фактор 4,8 (JIF). (Объем 1,4 п.л., вклад 80%). EDN: MOYMGC.

A13. **Generalov E.** et al. Anti-Inflammatory Effects of *Solanum tuberosum* L. Polysaccharide and Its Limited Gene Expression Profile / **E. Generalov**, I. Grigoryan, V. Minaichev, O. Sinitsyna, L. Yakovenko, A. Sinitsyn, L. Generalova // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26. – N 12. – P. 5562. Импакт-фактор 4,9 (JIF). (Объем 1,4 п.л., вклад 80%). doi: 10.3390/ijms26125562.

A14. **Generalov E.** et al. Anti-Inflammatory Effects of *Helianthus Tuberosus* L. Polysaccharide and Its Limited Gene Expression Profile / **E. Generalov**, L. Yakovenko, A. Sinitsyn, A. Alekseev, O. Sinitsyna, K. Abduvosidov, V. Minaichev, L. Generalova // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26. – N 16. – P. 7885. Импакт-фактор 4,9 (JIF). (Объем 2,0 п.л., вклад 80%). doi: 10.3390/ijms26167885.

A15. Shevelev A. et al. siRNA Therapeutics for the Treatment of Hereditary Diseases and Other Conditions: A Review / A. Shevelev, N. Pozdniakova, **E. Generalov**, O. Tarasova // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26. – N 17. – P. 8651. Импакт-фактор 4,9 (JIF). (Объем 2,1 п.л., вклад 50%). doi: 10.3390/ijms26178651.

Патент

A16. **Генералов Е.А.** // Патент РФ № 2537033, 29.10.2013, Способ применения растительного полисахарида в качестве радиопротектора и стимулятора колониобразования стволовых клеток селезенки облученных животных. (Объем 0,9 п.л.). EDN: QVVUZJ.

Прочие публикации

Статьи в других рецензируемых научных журналах

17. **Генералов Е.А.** и др. Биологические эффекты сигналинга полисахаридов / **Е.А. Генералов**, Л.В. Яковенко // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2018. – Т. 3. – N 3. – С. 588-597. (Объем 1,0 п.л., вклад 80%). Импакт-фактор 0,18 (РИНЦ). EDN: VJRICM.

18. **Генералов Е.А.** Влияние полисахаридного препарата "Иммеран" на течение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки/ **Е.А. Генералов** // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2019. – Т. 4. – N 1. – С. 85-89. (Объем 0,5 п.л.). Импакт-фактор 0,18 (РИНЦ). EDN: PWEOVO.

19. **Генералов Е.А.** и др. Влияние полисахаридов на течение COVID-19 / **Е.А. Генералов**, Л.В. Генералова // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2020. – Т. 5. – N 4. – С. 693-696. (Объем 0,5 п.л., вклад 80%). Импакт-фактор 0,18 (РИНЦ). EDN: PNZZSP.

20. **Генералов Е.А.** и др. Возможные молекулярные механизмы действия полисахаридов при вирусных заболеваниях / **Е.А. Генералов**, Е.Ю. Симоненко, Л.В. Яковенко // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2022. – Т. 7. – N 4. – С. 613-618. (Объем 0,6 п.л., вклад 80%). Импакт-фактор 0,18 (РИНЦ). EDN: OQTLJJ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен профессорам д.х.н. Синицыну А.П. и д.ф.-м.н. Яковенко Л.В. за помощь, критику, советы, идеи и поддержку. Автор признателен за совместную научную работу к.х.н. Субекину А.Ю, к.б.н. Ларюшкину Д.П., к.б.н. Голубевой И.С., к.б.н. Борисовой Л.М. и к.б.н. Крицкой К.А. Автор благодарен ныне покойному д.ф.-м.н. Рууге Э.К., внесшему неоценимый вклад в работу на раннем этапе. Автор выражает глубокую благодарность за совместную работу и советы профессоров д.б.н. Мухину И.В. и д.б.н. Леневу И.А.