

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА



На правах рукописи

Генералов Евгений Александрович

Биохимические основы биомедицинского применения полисахаридов из клубненосных растений

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва – 2025

Работа выполнена на кафедре биофизики физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный консультант: **Синицын Аркадий Пантелеймонович**

доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Бачурин Сергей Олегович**

доктор химических наук, профессор, академик РАН, научный руководитель, главный научный сотрудник Института физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии РАН

Пантелеев Михаил Александрович

доктор физико-математических наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «18» декабря 2025 г. в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.4 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 11Б, аудитория 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3580>

Автореферат разослан «16» октября 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Сакодынская И.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. Иммунотропное действие полисахаридов и их комплексов позволяет создавать на их основе иммуномодулирующие средства, что уже успешно реализуется в разработке противoinфекционных средств различной природы. Более того, полисахариды, регулируя цитокиновые каскады, могут выступать в качестве биологически активных агентов, влияющих на цитокин-опосредованные процессы в силу плеiotропности этих сигнальных молекул, что может быть использовано в различных биомедицинских целях.

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 группу разнообразную по составу 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. В частности, дектин-1 распознает β -глюканы, часто встречающиеся в клеточных стенках растений, грибов и дрожжей, а маннозный рецептор связывает маннозилированные гликопротеины и липополисахариды бактерий, что определяет их роль в противоинфекционном иммунитете. Галектины распознают и связывают разнообразные углеводные структуры, это позволяет им участвовать в процессах клеточной адгезии, дифференцировки и апоптоза, а также в регуляции воспалительных реакций. 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.

Связывание полисахаридов с лектинами (например, Dectin-1, маннозным рецептором, 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. 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. Для полисахаридных комплексов из *Solanum tuberosum* L. (картофеля) также 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. До настоящей 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 карциномы 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, анафилактическая 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, 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 адьювантного 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 Эрне; 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 мышиных 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 субхроническая токсичность, мутагенность, эмбриотоксичность и тератогенность); трансфектирование 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 адьювантную активность – дозозависимо стимулируют антителообразующие клетки и клеточность селезенки в модели Эрне. 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 карциносаркомы Уокера и карциномы легких Льюиса и может быть использован с другими противоопухолевыми средствами в качестве адьюванта. 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. НТЛР и STP не обладают анафилактикогенной и аллергезирующей активностью, острой и субхронической 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 (Наукоград 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, радиоэкологии 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Физико-химические свойства полисахаридов

На Рисунке 1 представлена схема выделения НТЛР и СТР из исходного растительного сырья.

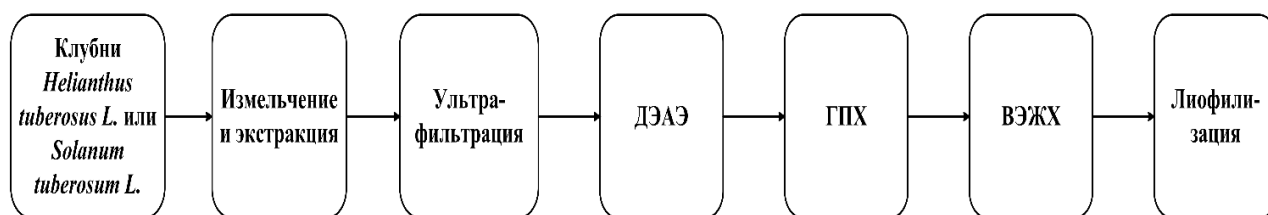


Рисунок 1. Схема выделения полисахаридных комплексов.

Лиофилизат НТЛР представлял собой аморфный порошок беловато-сероватого цвета, без характерного запаха, обладающий хорошей растворимостью в воде (40 г/л) и не растворимый в органических растворителях. Содержание углеводов в НТЛР, определённое с помощью фенол-сернокислотного метода составило 98%. Образец содержал минорные белковые примеси (0,5%, содержание белка определено с помощью метода Лоури).

Лиофилизат СТР получен в виде аморфного порошка желтовато-белого цвета, без запаха, обладал умеренной растворимостью в воде (9 г/л) и не растворялся в органических растворителях. Содержание углеводов составило 90%, содержание белковой компоненты – 9%.

Спектральный анализ позволил выявить характерные особенности структуры исследуемых полисахаридов. Были получены оптический ИК-, КД- и рамановские-спектры НТЛР и СТР. На Рисунке 2 представлены характерные оптические спектры СТР и НТЛР, на которых присутствуют максимум поглощения в области 190–210 нм, типичный для полисахаридных соединений и пик поглощения в области 280 нм, характерный для π – π^* электронных переходов в ароматических и полиароматических соединениях, встречающихся в большинстве сопряженных молекул, в том числе белковой природы.

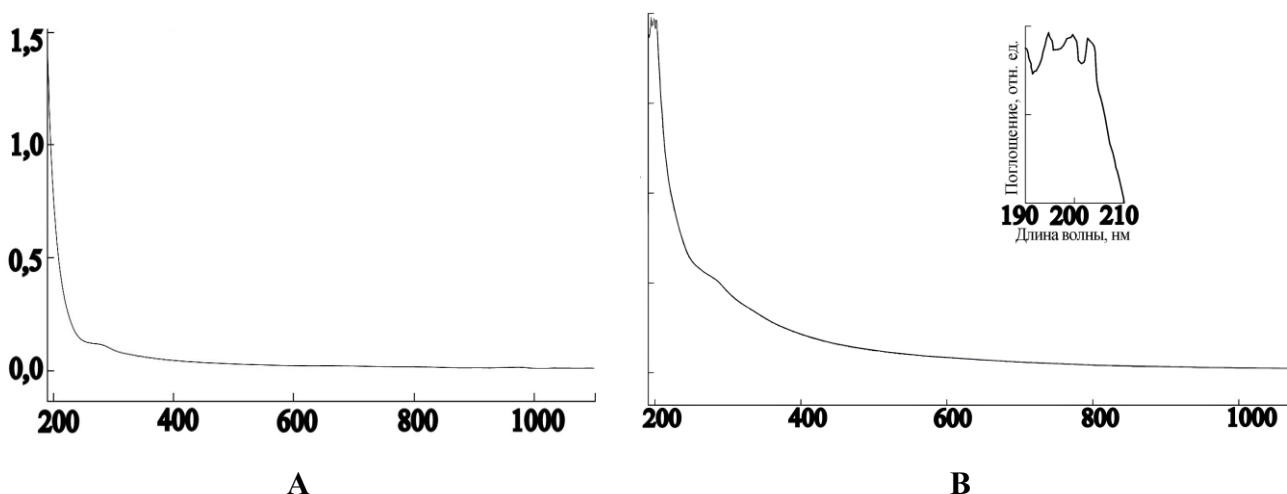


Рисунок 2. Характерные спектры поглощения А) СТР; В) НТЛР. По оси ординат – поглощение в относительных единицах, по оси абсцисс – длина волны в нм.

В ИК-спектрах HTLP и STP наблюдаются, в том числе, общие для всех углеводов пики (Рисунок 3). В инфракрасной области спектра у полисахарида HTLP обнаружены характерные полосы поглощения – пики 1651 и 1645 см^{-1} часто относят к кристаллизованной воде и $\text{C}=\text{C}$, а 1028 , 1076 и 1150 см^{-1} к $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и кольцевым колебаниям пиранозного цикла; поглощение около 1740 см^{-1} соответствует карбоксильной группе, указывающей на существование уроновых кислот в полисахариде; сильные поглощения на 1074 и 1024 см^{-1} , среднее поглощение на 1148 см^{-1} , при наличии колебаний пиранозного кольца, означают структуру, присущую β -гликану. В спектре STP присутствует пик 864 см^{-1} , относящийся к колебаниям растяжения $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ (β -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидной связи). Область $1148\text{--}1041\text{ см}^{-1}$ характерна для колебаний гликозидной связи и углеводного цикла.

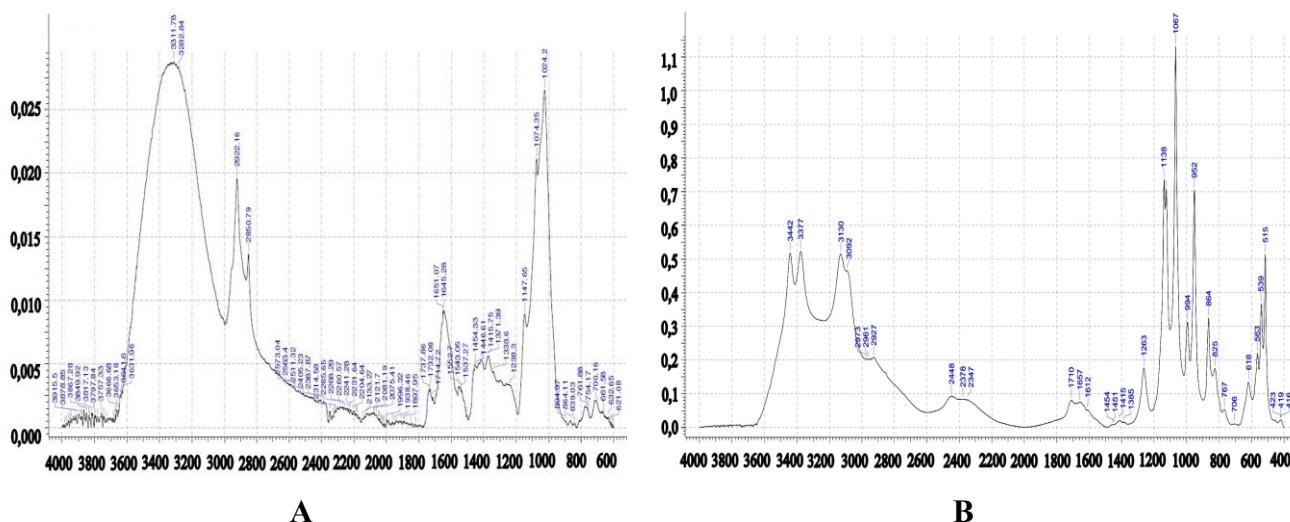


Рисунок 3. Характерные ИК-спектры А) HTLP; В) STP. По оси ординат – поглощение в относительных единицах, по оси абсцисс – волновое число в см^{-1} .

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 не позволило сделать значимых выводов о структуре вещества. По этой причине проводили SERS-исследование образцов. На Рисунке 4 представлены характерные спектры SERS HTLP и STP. Были обнаружены следующие характерные для углеводов линии: 307 , 364 , 966 и 1128 см^{-1} , колебания при 644 , 659 и 733 см^{-1} относят к связи $\text{C}-\text{O}$. Полоса в 1461 см^{-1} свидетельствует о наличии связи $\text{C}=\text{O}$, а в области $350\text{--}600\text{ см}^{-1}$ – пиранозного кольца.

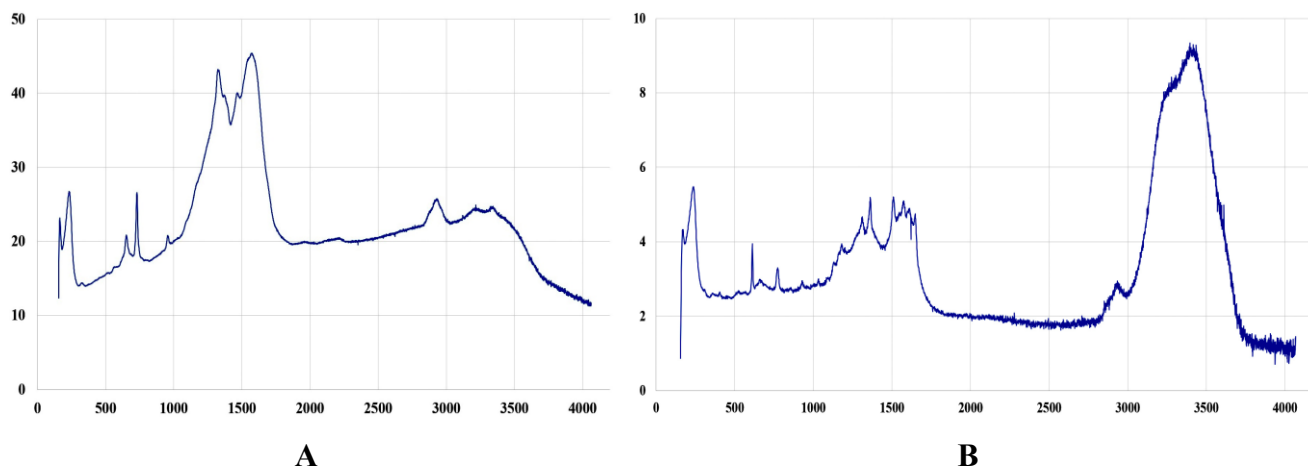


Рисунок 4. Характерные SERS-спектры **А)** HTLP и **В)** STP. По оси ординат – интенсивность комбинационного рассеяния $\times 10^{-3}$, по оси абсцисс – волновое число в см^{-1} .

На основании данных ВЭЖХ и ГЖХ анализа было установлено, что HTLP – глюкогалактан, STP – галактоарабиноглюкан. На Рисунке 5 представлены характерные ВЭЖХ-хроматограммы HTLP и STP.

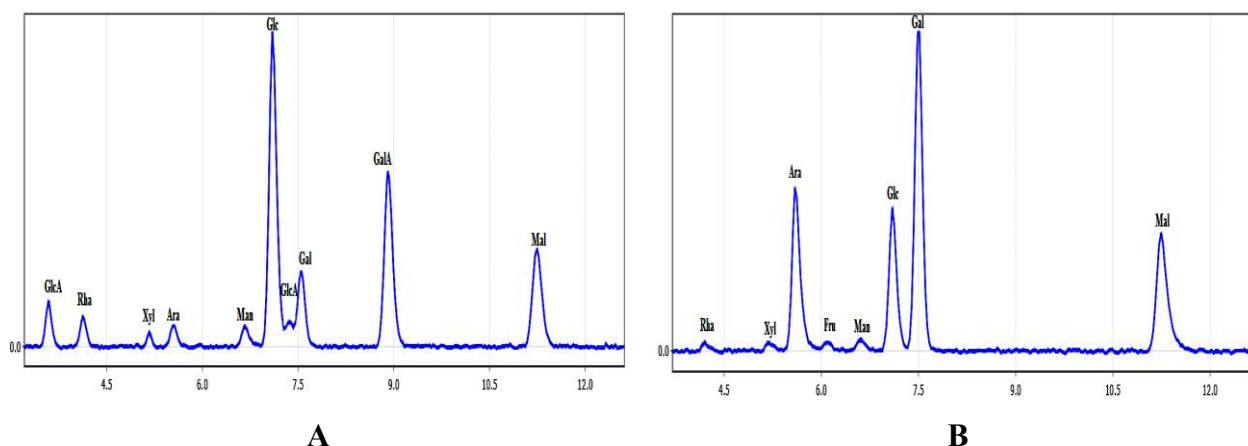


Рисунок 5. Характерные ВЭЖХ-хроматограммы **А)** HTLP и **В)** STP. По оси ординат – сигнал детектора в относительных оптических единицах, по оси абсцисс – времена удержания в минутах.

Аминокислотный состав изучался с использованием аминокислотного анализатора (Рисунок 6А). На основании данных электрофореза STP (Рисунок 6В) определена молекулярная масса (ММ) изучаемого вещества по калибровочной прямой стандартных молекулярных маркеров. Для HTLP стабильной полосы получить не удалось, что вместе с данными по методу Лоури говорит о примесной природе белка.

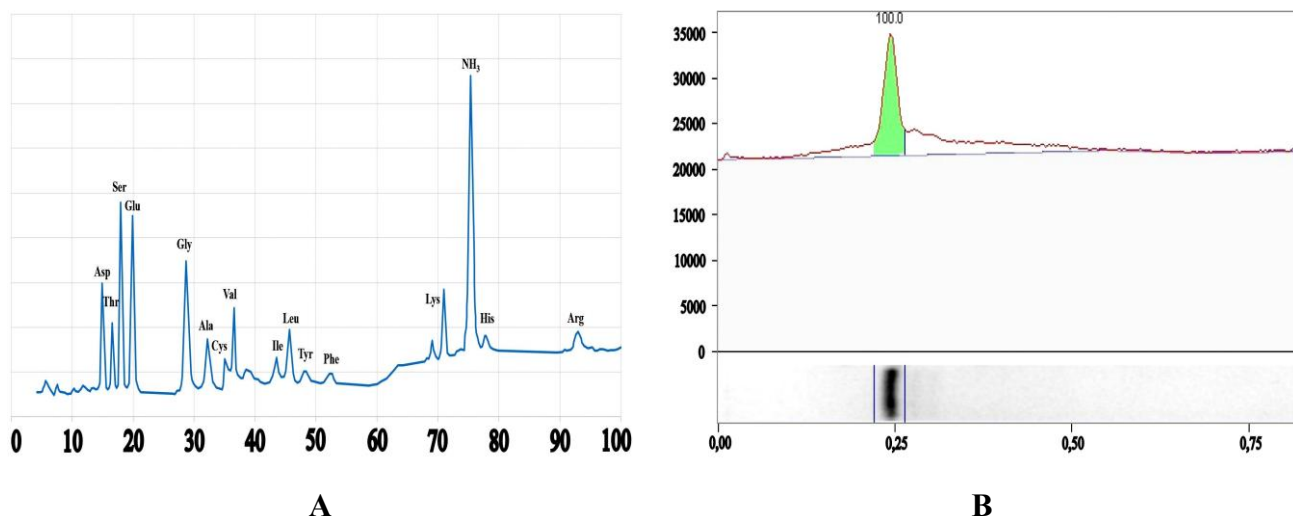


Рисунок 6. Анализ белковой части STP: **А)** аминокрограмма; по оси ординат – поглощение в относительных единицах, по оси абсцисс – время в минутах; **В)** электрофорез. По оси ординат – интенсивность сигнала, по оси абсцисс – коэффициент замедления (R_f).

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

Для выявления роли различных гликозидных связей в проявлении биологической активности была проведена обработка полисахаридов ферментами. После инактивации ферментов гидролизаты НТЛР и STP тестировали методом Эрне. Обработка α -амилазой НТЛР не приводила к изменению в биологической активности НТЛР, что свидетельствует об отсутствии в образце α -(1→4)-гликозидной связи. При обработке литиказой (β -1,3-эндоглюканазой) биологическая активность колебалась в интервале 53–83 антителообразующих клеток (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 НТЛР β -(1→4)- и β -(1→3)-гликозидных связей, необходимых для реализации специфической биологической активности.

Тестирование гидролизатов STP методом Эрне показало, что обработка α -амилазой не приводила к изменению в биологической активности STP, что свидетельствует об отсутствии 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 STP именно β -(1→4)-гликозидных связей, необходимых для реализации его характерной биологической активности. Остаточная биологическая активность может присутствовать в силу распознавания фрагментов гидролизатов иммунокомпетентными клетками мышей, которое приводит к активации спленцитов.

Биологическая активность

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

Было исследовано влияние HTLP *in vitro* на уровень экспрессии цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α в культуре клеток мононуклеаров периферической крови (МПК). HTLP вносили в разных концентрациях, при этом в группе положительного контроля вносили ЛПС в концентрации 10 нг/мл (Рисунок 7). Концентрацию цитокинов в надосадочной жидкости анализировали по стандартному протоколу производителей наборов ELISA Kit.

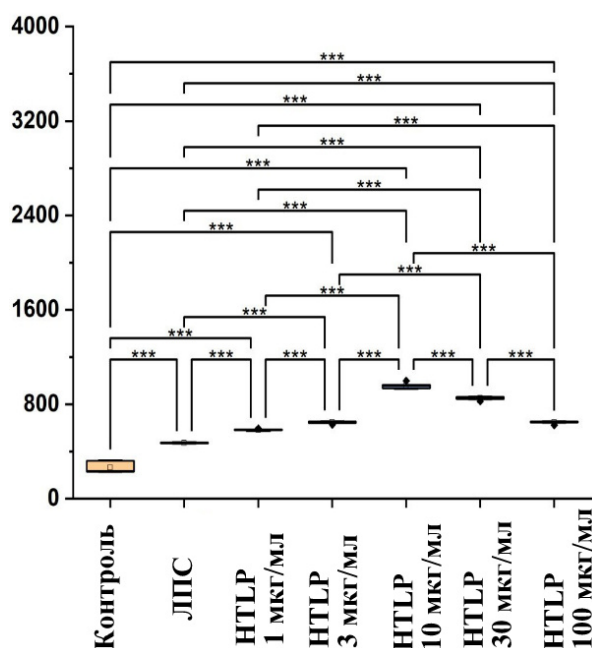


Рисунок 7. Уровень продукции TNF- α (пг/мл) мононуклеарами периферической крови после 12-часовой инкубации с HTLP. По оси ординат – концентрация TNF- α в пг/мл, по оси абсцисс – группы. *** $p \leq 0,001$.

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

Экспериментальные данные показали, что в клеточных культурах с высокой спонтанной или ЛПС-индуцированной продукцией IL-1 β , добавление HTLP приводило к снижению уровней высвобождаемого IL-1 β . Напротив, в условиях низкой продукции цитокина HTLP стимулировал секрецию IL-1 β . Аналогичная закономерность наблюдалась и в ЛПС-стимулированных культурах МПК. Таким образом, HTLP обладает плеiotропным действием на продукцию IL-1 β *in vitro*, подавляя повышенные уровни и стимулируя пониженные уровни как спонтанной, так и ЛПС-индуцированной продукции этого цитокина (Рисунок 8). Это свидетельствует о комплексном регуляторном действии HTLP, направленном на модуляцию иммунного ответа.

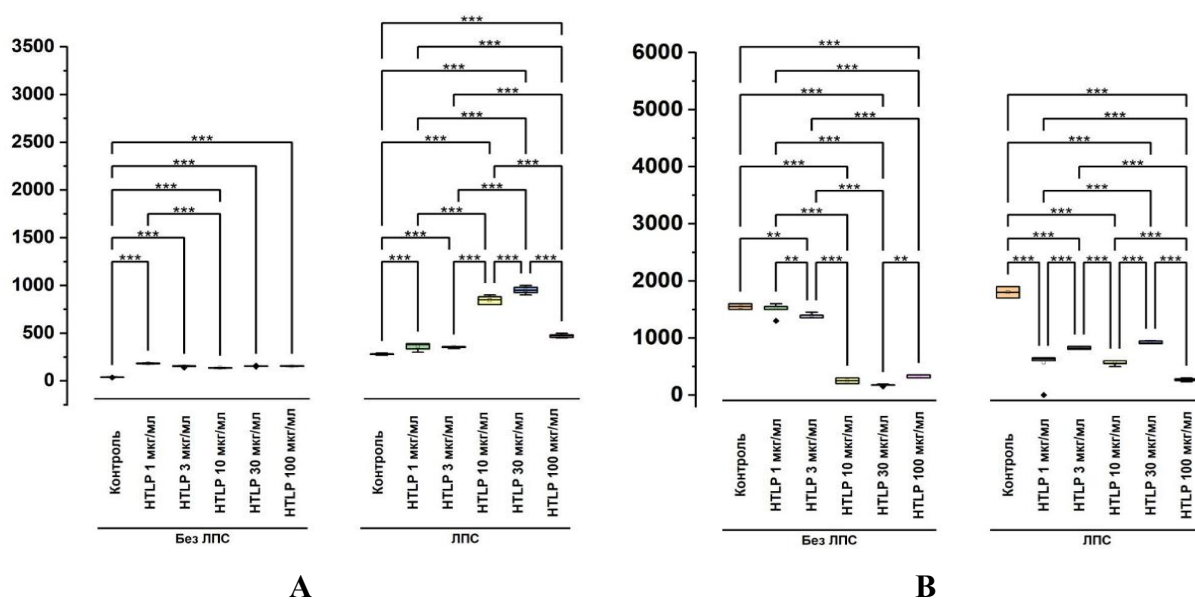


Рисунок 8. Изменение концентрации IL-1 β при добавлении HTLP со стимуляцией ЛПС и без нее при начальной **А)** низкой продукции и **В)** высокой продукции цитокина. По оси ординат – концентрация IL-1 β в пг/мл, по оси абсцисс – группы. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Продукция IL-6 была исследована *in vitro* в культурах МПК в присутствии и отсутствии ЛПС. Анализ исходных уровней IL-6 показал отсутствие значимых различий между культурами (на Рисунке 9).

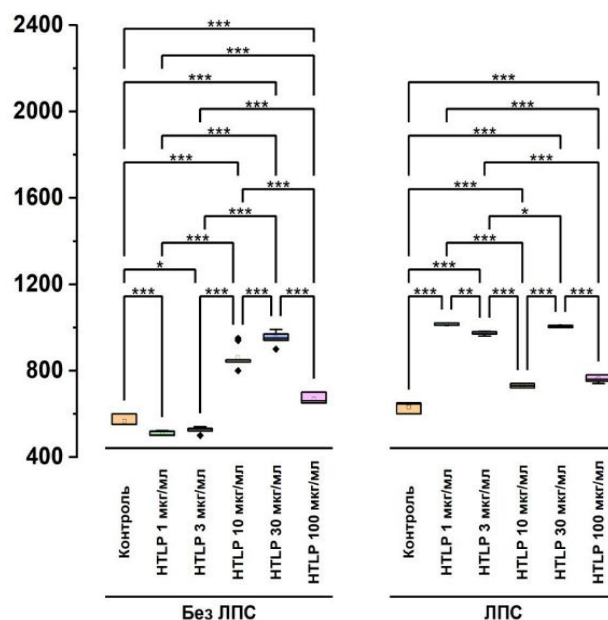


Рисунок 9. Изменение концентрации IL-6 при добавлении HTLP со стимуляцией ЛПС и без нее при начальной высокой продукции цитокина. По оси ординат – концентрация IL-6 в пг/мл, по оси абсцисс – группы. * $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Внесение HTLP вызывало стимуляцию выработки IL-6 в обеих группах, за исключением нестимулированных культур, где стимуляция наблюдалась только при использовании высоких

доз HTLP. Интенсивность стимуляции продукции IL-6 демонстрировала дозозависимый характер.

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

Метод Ерне

В результате исследования иммуномодулирующих свойств HTLP и STP на мышах линии F₁(CBA $\times$ C₅₇Bl/6) было установлено их дозозависимое стимулирующее влияние на антителогенез. При совместном введении мышам полисахарида HTLP с эритроцитами барана (ЭБ) в количестве 2×10^6 клеток наблюдалось значимое увеличение количества АОК в селезенке экспериментальных животных. Как показано на Рисунке 10, увеличение дозировки HTLP от 1 до 1000 мкг/животное приводило к прогрессивному возрастанию количества АОК с высокой статистической значимостью различий между группами ($p < 0,001$).

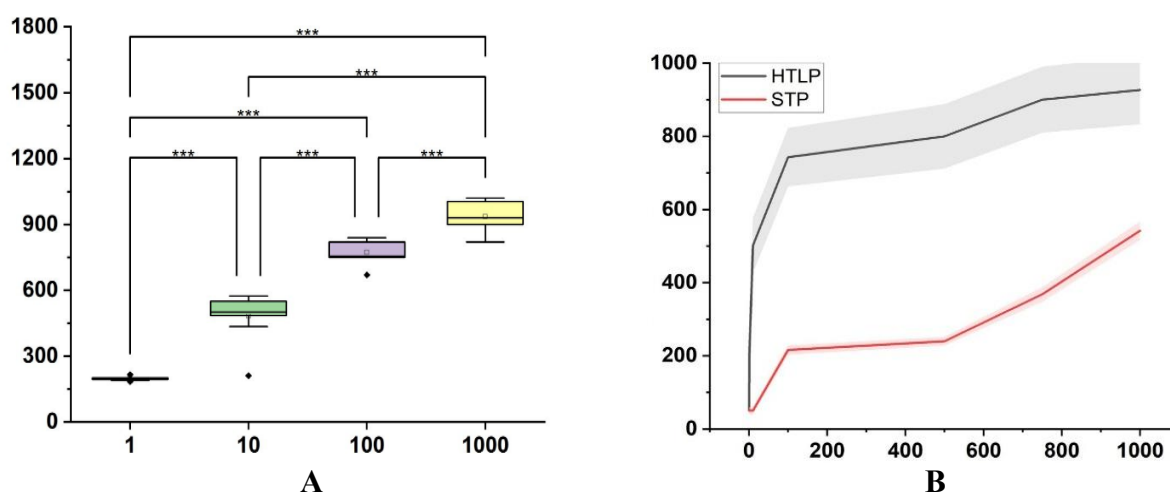


Рисунок 10. Влияние полисахаридных комплексов на количество АОК у мышей (в каждой группе по 10 животных): **А)** HTLP; **В)** сравнение HTLP и STP. По оси абсцисс– дозировка в мкг/животное, по оси ординат – количество АОК на селезенку. Статистические сравнения между группами проводились с использованием непарного t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. *** $p \leq 0,001$.

HTLP и STP статистически значимо стимулируют и количество АОК, и клеточность селезенки. Как видно из Рисунков 11А и 11В, HTLP стимулировал колониеобразование сильнее, чем STP во всех дозировках. ЛПС тоже 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 для отбора биологически активной фракции.

Противовирусная активность

STP тестировали в противовирусной модели коронавирусной инфекции SARS-CoV-2. Использовали самок золотистых сирийских хомяков и клетки Vero CCL-81 для культивирования вируса SARS-CoV-2. 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. Вирусные стоки ($22,4 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$) были приготовлены после серийных пассажей в клетках Vero CCL-81.

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 $3,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$. 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. Изменение массы тела животных оценивали отдельно для каждого хомяка в процентах. Через пять дней животных умерщвляли после анестезии путем цервикальной дислокации. Животных использовали для оценки реакции нейтрализации и титра вируса в легких (Рисунок 11), взвешивали и оценивали динамику массы животных (Рисунок 12).

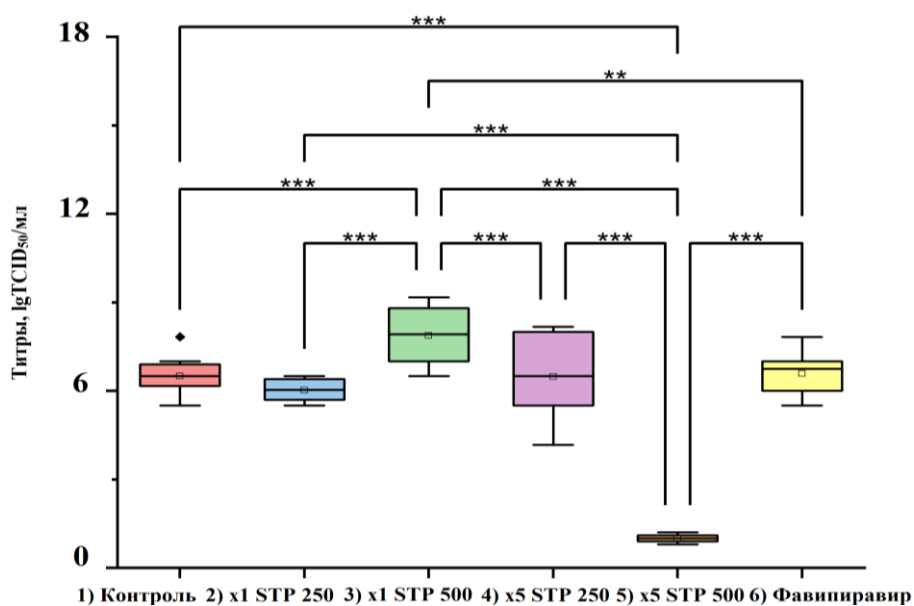


Рисунок 11. Титры вируса в легочной ткани через 5 дней после лечения у мышей, инфицированных вирусом. По оси абсцисс – группы, по оси ординат – титры вируса $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$. Группы (по 5 животных): 1 – контрольная группа получала физиологический раствор в/б через 1 ч после заражения 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 по 0,5 мл 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 ($p < 0,05$, $n=30$). ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

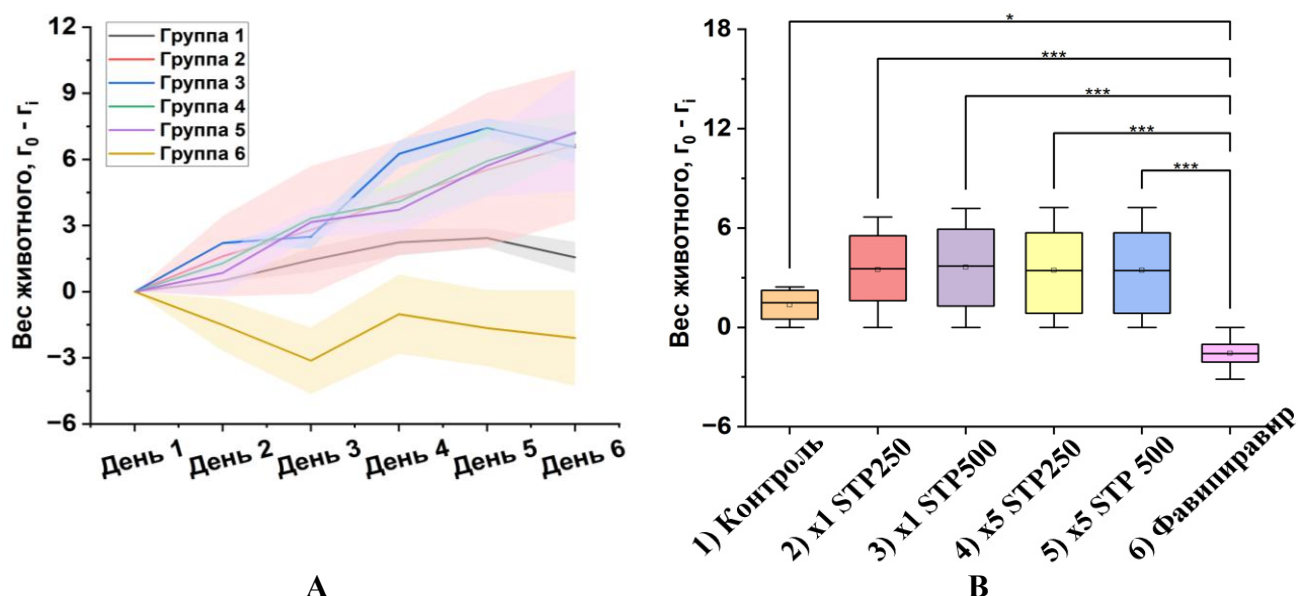


Рисунок 12. Изменения массы тела у мышей в 6 группах лечения через 6 дней после заражения. **А)** Изменения массы тела сирийских хомяков, инфицированных SARS-CoV-2, в зависимости от схемы лечения в первой серии экспериментов. **В)** Ежедневные измерения массы тела животных нормализовали, при этом исходный 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. * $p < 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

Гистологическое исследование легких золотистых хомяков 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 13А).

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 13В–Е).

Результаты статистической обработки морфологического анализа интерстициальной пневмонии, ассоциированной с SARS-CoV-2, у золотистых хомяков представлены на Рисунке 14.

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 хомяка № 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 группы 4 гистоструктура легких была нормальной. В группе 5 только у 2 из 5 животных имелись признаки вирусной пневмонии, а у

трех отклонений от нормы не выявлено. В группе 6 (лечение Фавипиравиром) морфологическая картина 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 долевой 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).

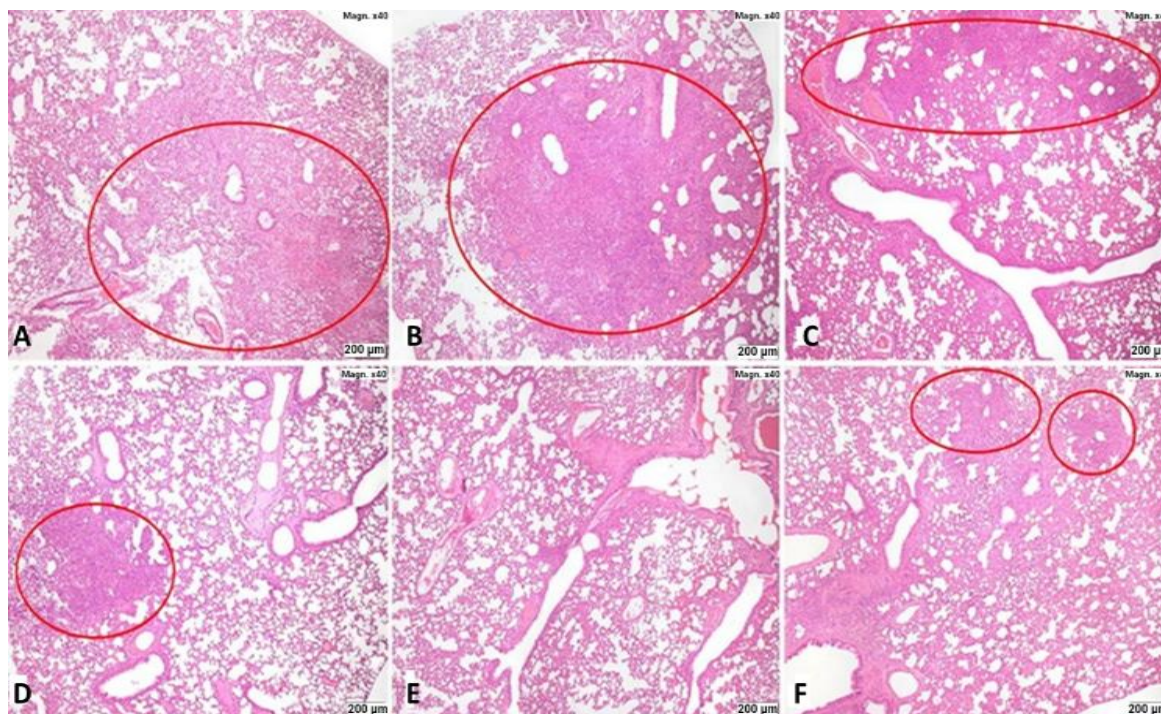


Рисунок 13. Гистопатология легких хомяков на 4-й день после заражения SARS-CoV-2. Очаги интерстициальной пневмонии (красные овалы). Увеличение $\times 40$. Окраска гематоксилином и эозином. Группы (по 5 животных): (А) – контрольная группа получала физиологический раствор в/б через 1 ч после заражения и четыре дня ежедневно; (В) – одну инъекцию в/б 250 мкг/кг STP за 24 ч до заражения; (С) – одну инъекцию в/б 500 мкг/кг STP за 24 ч до заражения; (D) – одну инъекцию в/б 250 мкг/кг STP через 1 ч после заражения и четыре дня один раз в день через день; (Е) – одну инъекцию в/б по 500 мкг/кг STP через 1 ч после заражения и четыре дня один раз в день через день; (F) – Фавипиравир перорально 1200 мг/кг за 1 ч до заражения, затем 500 мг/кг два раза в день в течение четырех дней.

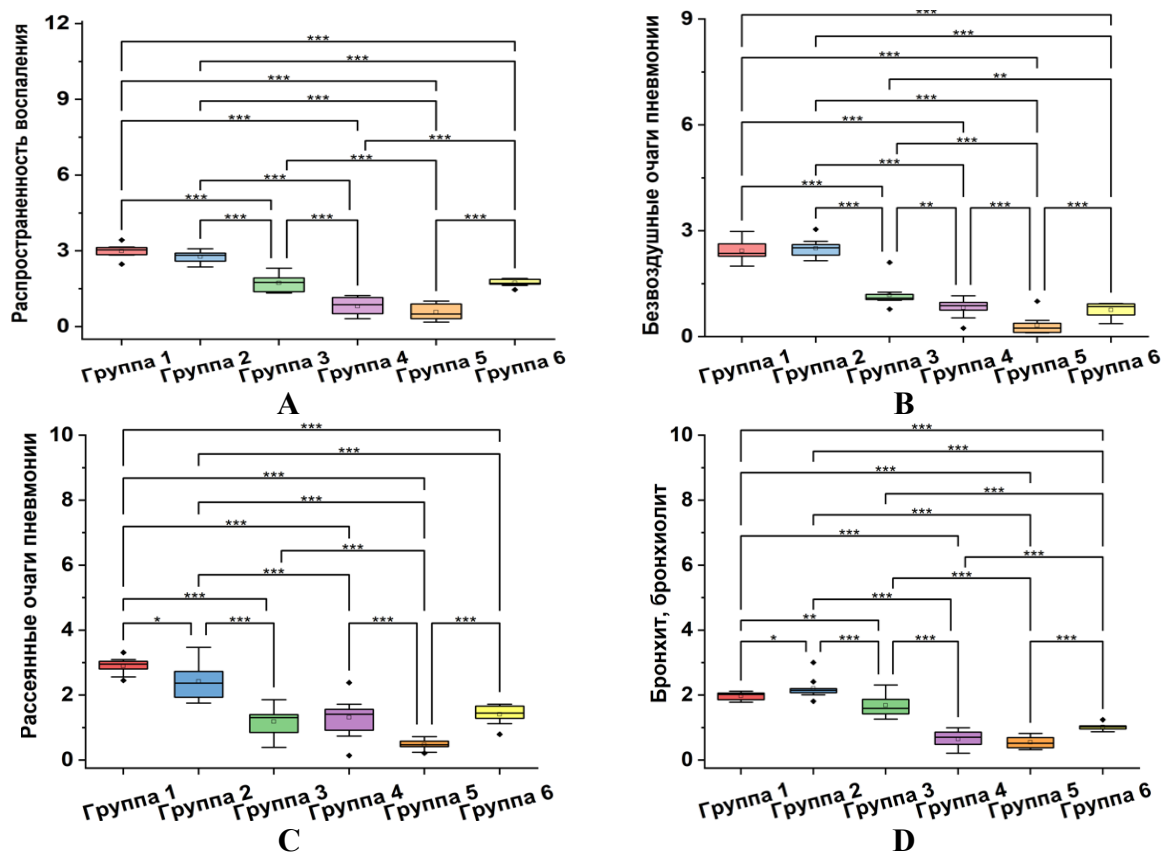


Рисунок 14. Статистический анализ данных патоморфологического исследования поражения паренхимы легких экспериментальных животных с SARS-CoV-2: **А)** Распространенность воспаления; **В)** Безвоздушные очаги пневмонии; **С)** Рассеянные очаги пневмонии; **Д)** Бронхит. Группы (по 5 животных): 1 – контрольная 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 ($p < 0,05$, $n = 30$). * $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

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 15). 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

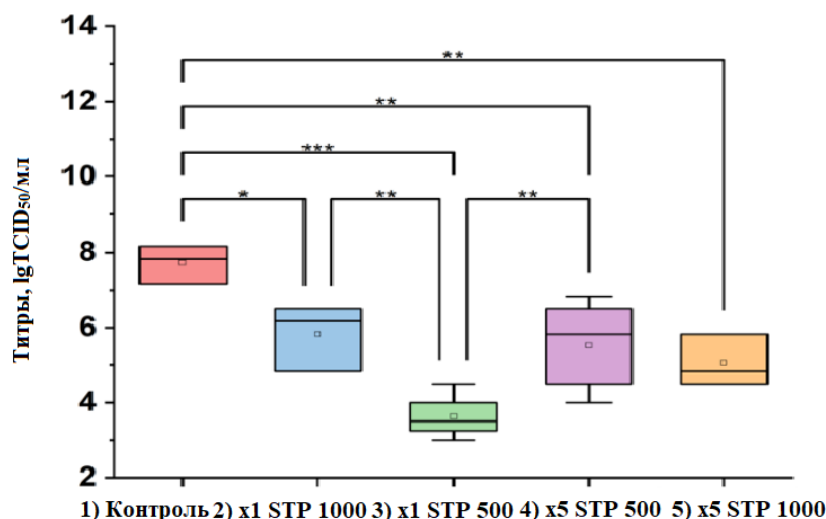


Рисунок 15. Титры вируса в легочной ткани через 5 дней после лечения у мышей, инфицированных вирусом SARS-CoV-2. По оси абсцисс – группы, по оси ординат – титры вируса lgTCID₅₀/мл. Группа 1 —контроль — мыши получали в/б инъекцию физиологического раствора через 1 час после заражения и ежедневно в течение 4 дней. Группа 2 — одну в/б инъекцию 1000 мкг/кг STP за 24 часа до заражения. Группа 3 — одну в/б инъекцию 500 мкг/кг STP через 1 час после заражения и ежедневно в течение 4 дней. Группа 4 – одну в/б инъекцию 500 мкг/кг STP через 1 час после заражения и один раз через день в течение 4 дней. Группа 5 — одну в/б инъекцию 1000 мкг/кг STP через 1 час после заражения и один раз через день в течение 4 дней. ($p < 0,05$, тест Краскела–Уоллиса, $n = 35$). * $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

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 16).

Исследования выявили наличие антител в значительном титре (выше 1:10) к обоим штаммам вируса у всех инфицированных животных. 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.

По данным второго эксперимента лечение препаратом внутривенно 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.

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 лечение стимулировало образование антител, что дает возможность предположить наличие адъювантных свойств препарата.

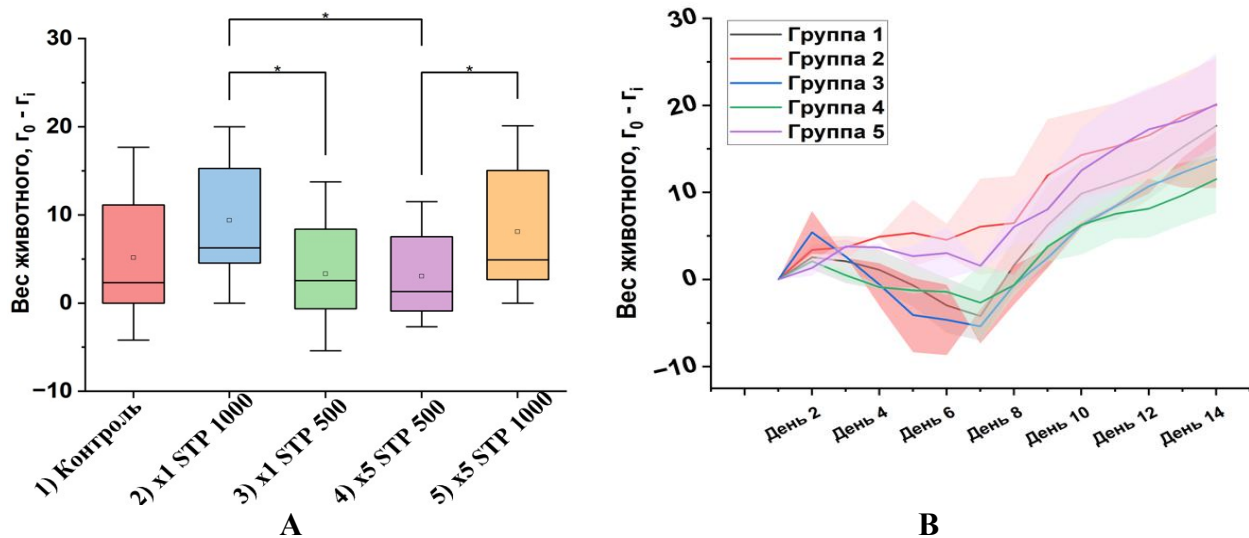


Рисунок 16. Динамика массы тела животных. Группа 1 — контроль — мыши получали в/б инъекцию физиологического раствора через 1 час после заражения и ежедневно в течение 4 дней. Группа 2 — одну в/б инъекцию 1000 мкг/кг STP за 24 часа до заражения. Группа 3 — одну в/б инъекцию 500 мкг/кг STP через 1 час после заражения и ежедневно в течение 4 дней. Группа 4 — одну в/б инъекцию 500 мкг/кг STP через 1 час после заражения и один раз через день в течение 4 дней. Группа 5 — одну в/б инъекцию 1000 мкг/кг STP через 1 час после заражения и один раз через день в течение 4 дней. **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%. **Б)** 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. * $p < 0,05$.

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 внутривнутрибрюшинно 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.

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.

Противоязвенная активность

Противоязвенная активность в модели Окабэ

Для изучения регенераторно-репараторной активности STP была выбрана классическая модель Окабэ «хронической» «ацетатной» язвенной болезни. Индукцию язвенного дефекта проводили у крыс линии Wistar обоего пола. Влияние STP на динамику концентрации цитокинов IL-1 β , IL-4 и IFN- γ 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.

Значительное снижение язвенного индекса наблюдалось (Рисунок 17) в группах, получавших полисахарид, особенно максимальные дозы, и стандартные противоязвенные препараты (Омепразол и Ранитидин) по сравнению с контрольной группой (физиологический раствор).

Исследование включало первичную макроскопическую оценку состояния слизистой оболочки с использованием оптического увеличения и количественную оценку язвенного индекса. По завершении макроскопического анализа слизистой желудка проводилось микроскопическое исследование. После стандартной гистологической обработки изготавливались срезы с последующим окрашиванием гематоксилин-эозином по методике Ван Гизона и альциановым синим для световой микроскопии.

Как показано на Рисунке 18, введение 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.

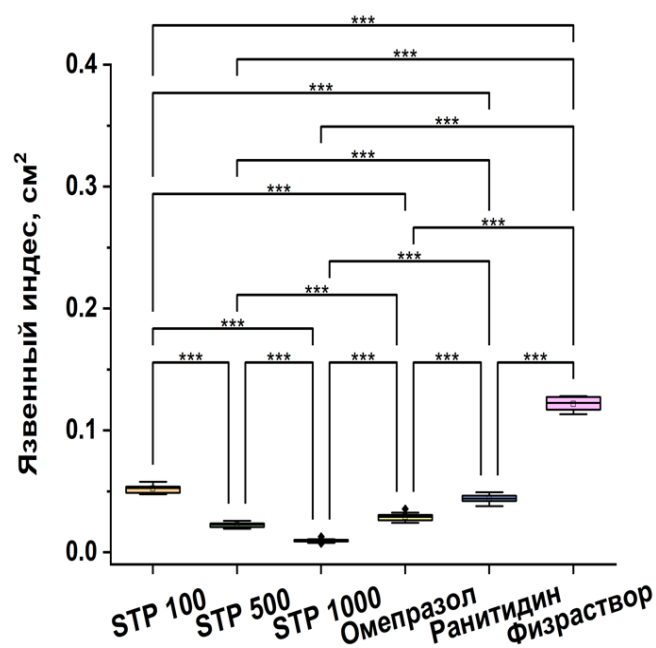


Рисунок 17. Влияние различных доз STP, Омепразола, ранитидина и физиологического раствора на индекс язвы у экспериментальных животных (по 10 животных в каждой группе). Группы: 1 – экспериментальная, в/в введение 100 мкг/200 г STP на 1, 4 и 7 сутки; 2 – экспериментальная, в/в 500 мкг/200 г STP на 1, 4 и 7 сутки; 3 – экспериментальная, в/в 1000 мкг/200 г STP на 1, 4 и 7 сутки; 4 – контрольная, введение Омепразола 60 мкг/200 г по инструкции; 5 – контрольная, введение Ранитидина 200 мкг/200 г по инструкции; 6 – контрольная, животным в/в физиологический раствор на 1, 4 и 7. 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 проценти. Анализ проводился с использованием непараметрического теста Краскела-Уоллиса с последующей поправкой Бонферрони для множественных сравнений. *** $p < 0,001$.

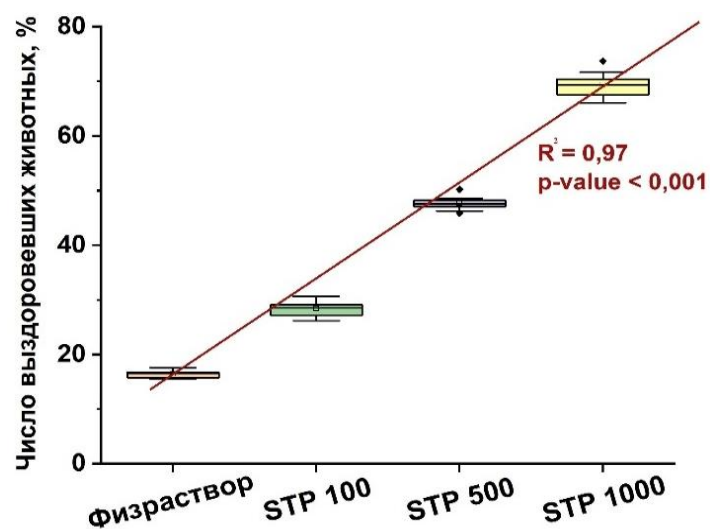


Рисунок 18. Анализ «доза-реакция» для STP. На графике приведен процент выздоровевших животных (по 10 животных в каждой группе) на 10-ый день в зависимости от дозы препарата. Красная линия представляет собой линейный тренд. Прямоугольники показывают распределение данных для каждой дозы, где горизонтальная линия внутри прямоугольника является медианой, границы прямоугольника являются первым и третьим квартилями, а вертикальные линии являются минимальным и максимальным значениями.

Была построена кривая зависимости доза-эффект для оценки терапевтической эффективности препарата при различных дозировках. На Рисунке 18 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 20 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 20А показаны уровни цитокинов на четвертые сутки эксперимента, на Рисунке 20В — 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 (Рисунок 20А) в группе STP по сравнению с контрольной группой отмечено достоверное снижение уровней провоспалительных цитокинов IL-1b и IFN- γ , тогда как уровень противовоспалительного цитокина IL-4 достоверно возрос.

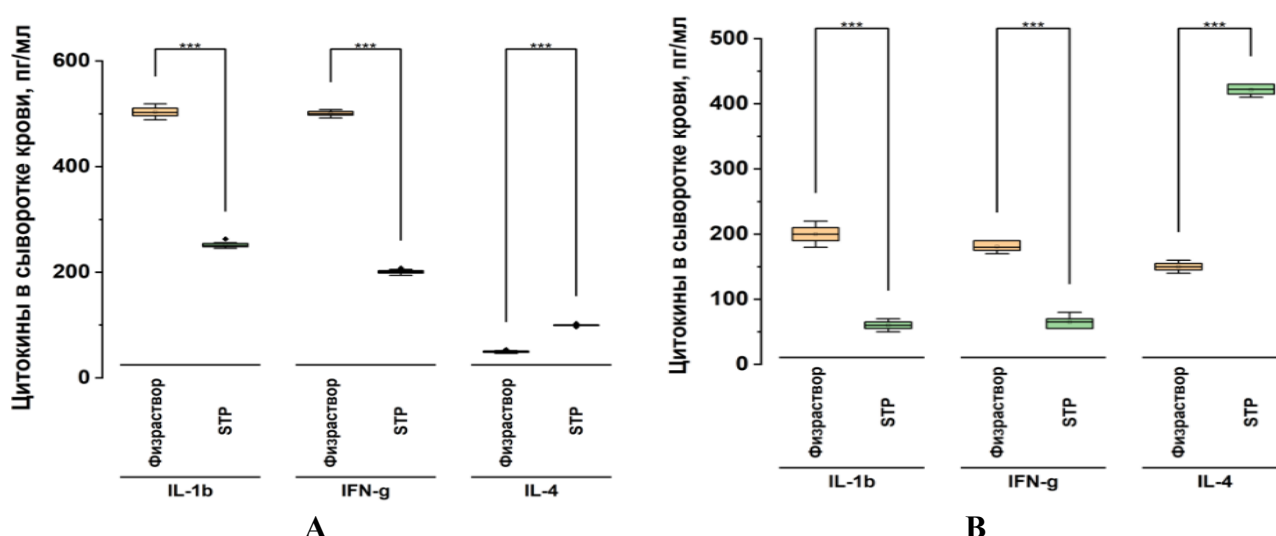


Рисунок 20. Влияние STP на уровень цитокинов в сыворотке крови у подопытных животных (по 10 животных в каждой группе). **А** – уровень цитокинов на 4-й день и **В** – уровень цитокинов на 10-й день эксперимента. Показаны концентрации IL-1b, IFN- γ и IL-4 (пг/мл) в основных группах, получавших физиологический раствор и STP. Анализ проводился с использованием непараметрического теста Краскела-Уоллиса. *** $p < 0,001$.

Подобная тенденция сохранялась и на десятые сутки эксперимента (Рисунок 20В), 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.

Участков некроза слизистой не было обнаружено ни у одного животного в опытной группе STP. Гистологический анализ образцов стенки желудка подтвердил (Рисунок 21), 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.

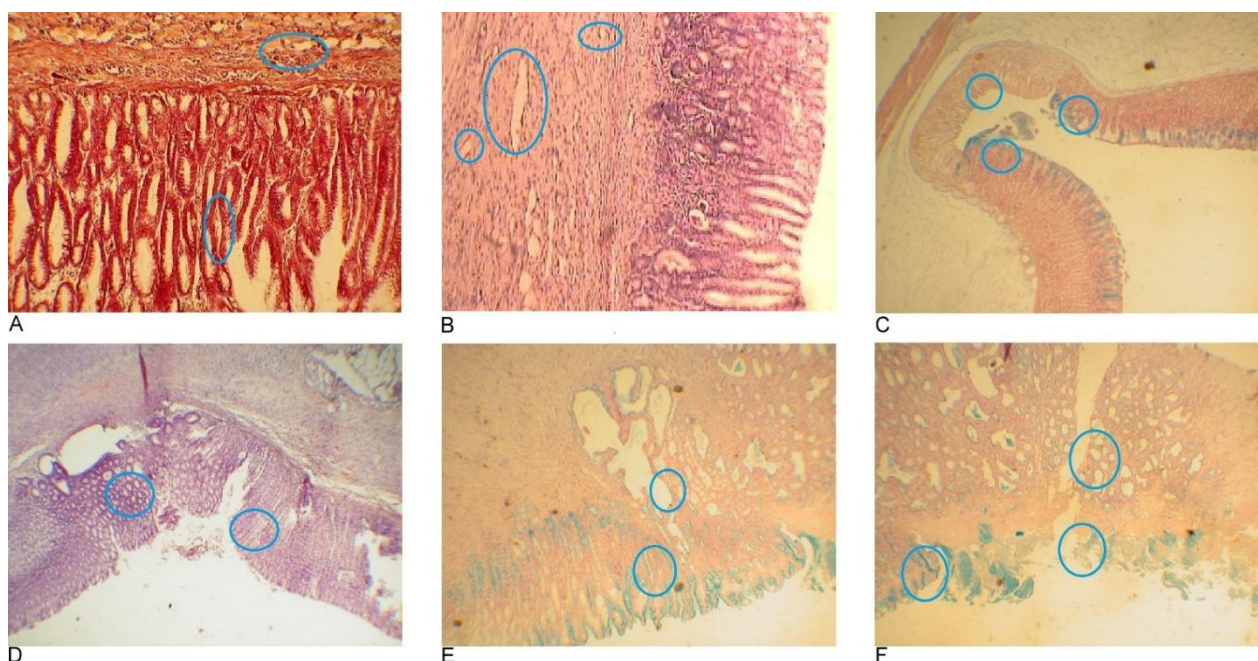


Рисунок 21. Гистология желудка крыс на 10-е сутки после язвообразования по методу Окабе. **А)** Группа 1, окраска по Ван-Гизону, $\times 200$. **В)** Группа 2, окраска гематоксилином и эозином, $\times 180$. **С)** Группа 3, окраска альциановым синим $\times 140$. **Д)** Группа 4, окраска гематоксилином и эозином $\times 140$. **Е)** Группа 5, окраска альциановым синим, $\times 200$. **Ф)** Группа 6, окраска альциановым синим, $\times 200$. Синими кружками обозначены описанные зоны интереса.

Рисунок 21А (группа 1 с введением STP 1000 мкг/200 г) свидетельствует о том, что наблюдается полная регенерация хронической язвы, восстановленная слизистая желудка, без деструкции эпителия, с глубокими желудочными ямками; подслизистые фибробласты расположены параллельно поверхности слизистой. На Рисунке 21В (группа 2 с введением STP 500 мкг/200 г) видно, что имеется зажившая язва с дифференцировкой формирующейся слизистой оболочки тела желудка, восстановленная слизистая желудка, без деструкции эпителия. На Рисунке 21С (группа 3 с введением STP 100 мкг/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 21D 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 21Е 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 21F, 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 гликозаминогликанов. Таким образом, 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. 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.

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 H_2 -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.

Таким образом был продемонстрирован терапевтический эффект инъекций STP при лечении пептических язв. Полученные результаты свидетельствуют о том, 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. 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. Результаты также 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.

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 демонстрирует его преимущество перед Омепразолом

и Ранитидином, что может снижать риск рецидивов и развития рака, связанного с патологическими изменениями тканей. Мы предполагаем, что механизм действия STP включает несколько факторов.

Помимо прямого противовоспалительного эффекта через модуляцию цитокинового профиля, STP 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. 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.

Противоязвенная активность в модели Селье

Для изучения специфической активности STP по методу Селье использовали крыс линии Август. 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. Проводили измерение площади повреждения, определяли язвенный индекс и оценивали воспаление.

Для оценки воспалительных изменений в слизистой были определены такие параметры, как гиперемия, отек и внутреннее кровотечение. На Рисунке 22 представлены пирамидальные графики (А, В, С) и таблицы значений (А', В', С'), демонстрирующие влияние различных доз STP на три показателя: гиперемия (А, А'), отек (В, В') и внутреннее кровотечение (С, С') у экспериментальных животных по сравнению с контрольной группой. Как видно из Рисунка 22, 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.

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, обуславливающих 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.

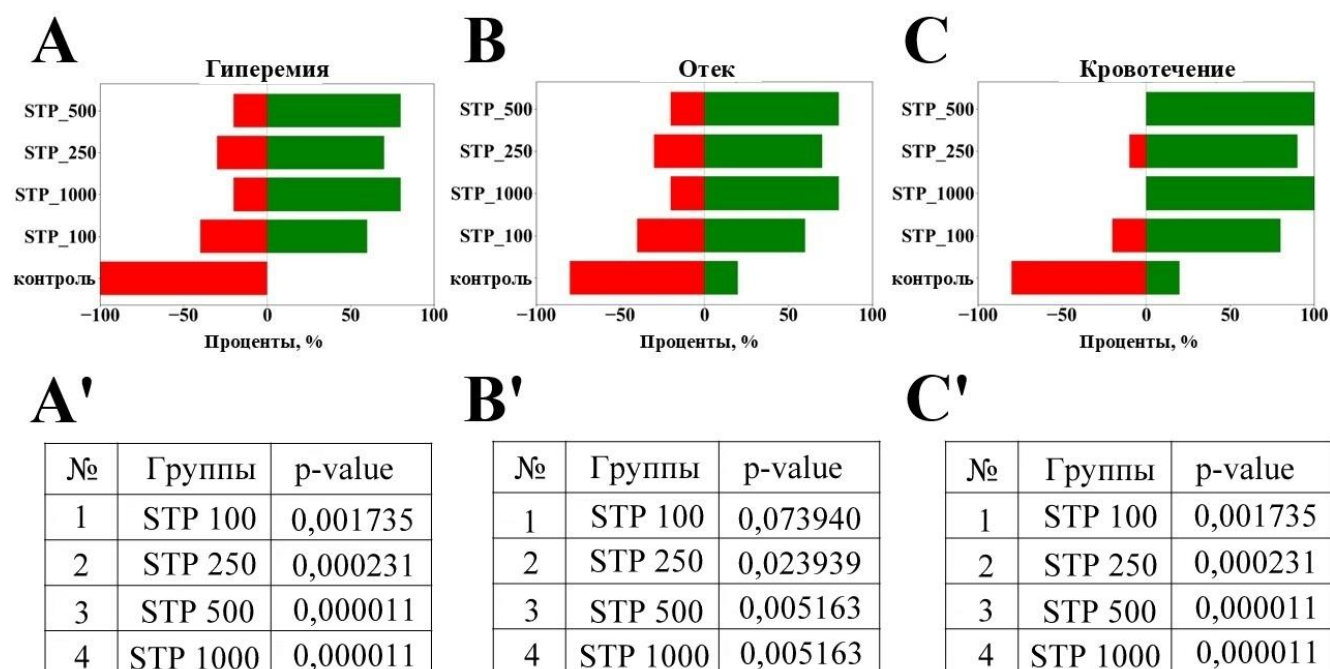


Рисунок 22. Влияние STP на гиперемию (А, А'), отек (В, В') и внутреннее кровотечение (С, С') у экспериментальных животных (в каждой группе 10 животных). Зеленые графики показывают процент животных без патологических изменений, а красные — с патологическими изменениями. А', В', С' демонстрируют статистическую значимость изменений по каждому показателю по сравнению с контрольной группой, χ^2 -статистики и уровня значимости $p \leq 0,05$.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют 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.

Противоопухолевая активность

В исследованиях противоопухолевой активности были использованы крысы обоего пола линии Август, которым перевивали опухоль Уокера, и мыши обоего пола линии C₅₇BL/6 (n=84), которым перевивали карциному легких Льюиса (LLC). Животным вводили HTLP в различных

дозах (Уокера – 15, 100 и 1000 мкг/кг; LLC – 500 мкг/кг и 5000 мкг/кг, соответственно) и по разным схемам. После эвтаназии животных производили удаление легких, их взвешивание и подсчет количества колоний метастазов. 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.

HTLP проявляет антиметастатическую активность в модели карциносаркомы Уокера. Данная биологическая активность, скорее всего, обусловлена взаимодействием с иммунокомпетентными клетками и их активацией, что приводит к уменьшению циркулирующих опухолевых клеток и, как следствие, количества метастазов.

Таблица 1 и Рисунок 23 демонстрируют влияние HTLP на процесс метастазирования. К 14-му дню после введения LLC обнаруживалось до 11-ти колоний раковых клеток в легких контрольной группы. Уже начиная с 14-го дня, введение HTLP эффективно тормозит процесс метастазирования. Введение HTLP в дозах 25 и 5 мг/кг однократно тормозит процесс метастазирования на 60–75% по сравнению с контролем.

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%.

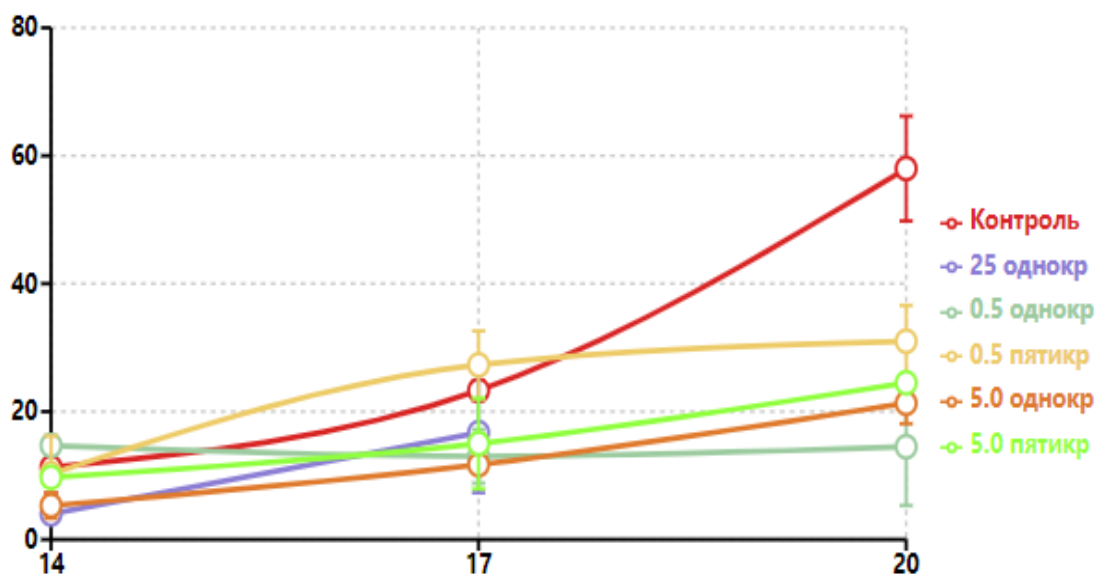


Рисунок 23. Влияние HTLP на процесс метастазирования в LLC у мышей (n=84). По оси ординат – количество колоний метастазов в легких, по оси абсцисс – день исследования.

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 HTLP, как в малой 0,5 мг/кг (2-ая группа), так и в высокой дозе 25 мг/кг (1-ая группа). В указанных дозах HTLP ингибирует процесс метастазирования в легкие на

75 и 65% (соответственно на 20-ые и 14-ые 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.

Таблица 1. Влияние HTLP на процесс метастазирования LLC (прямой подсчет колоний).

Группа	Доза и курс введения HTLP	Количество колоний опухолевых клеток в легких после трансплантации LLC (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

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.

Использовали самок мышей линии F1(C57Bl/6×DBA/2), которым перевивали клетки LLC подкожно. В каждой экспериментальной группе было по 16 животных, 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 показателей на гематологическом анализаторе. Подсчет лейкоцитарной формулы проводили стандартным гематологическим методом.

Данные, представленные на Рисунке 24, демонстрируют, что пролонгированный противоопухолевый эффект ЛХС-1269 наблюдали только при совместном с HTLP однократном или пятикратном введении (торможение роста опухоли (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 HTLP и ЛХС-1269 приводило к уменьшению опухолевого роста LLC (Рисунок 24).

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 HTLP, а также в когорте, получавшей комбинированное применение обоих препаратов, уровни лейкоцитов были повышены по сравнению с контрольной группой. Наблюдалось заметное увеличение относительной популяции лимфоцитов в кровотоке у подопытных, получавших HTLP в качестве монотерапии в сравнении с контрольной группой.

ЛХС-1269 вызывает прямое химиотерапевтическое повреждение трансформированных клеток, что приводит к усилению местных воспалительных реакций, тогда как HTLP способствует пролиферации и миграции лимфоцитов к опухолевому узлу. Применение HTLP привело к увеличению общего количества клеток крови, включая лейкоциты, лимфоциты и фагоцитарные клетки, которые играют важную роль в противоопухолевом иммунном ответе хозяина.

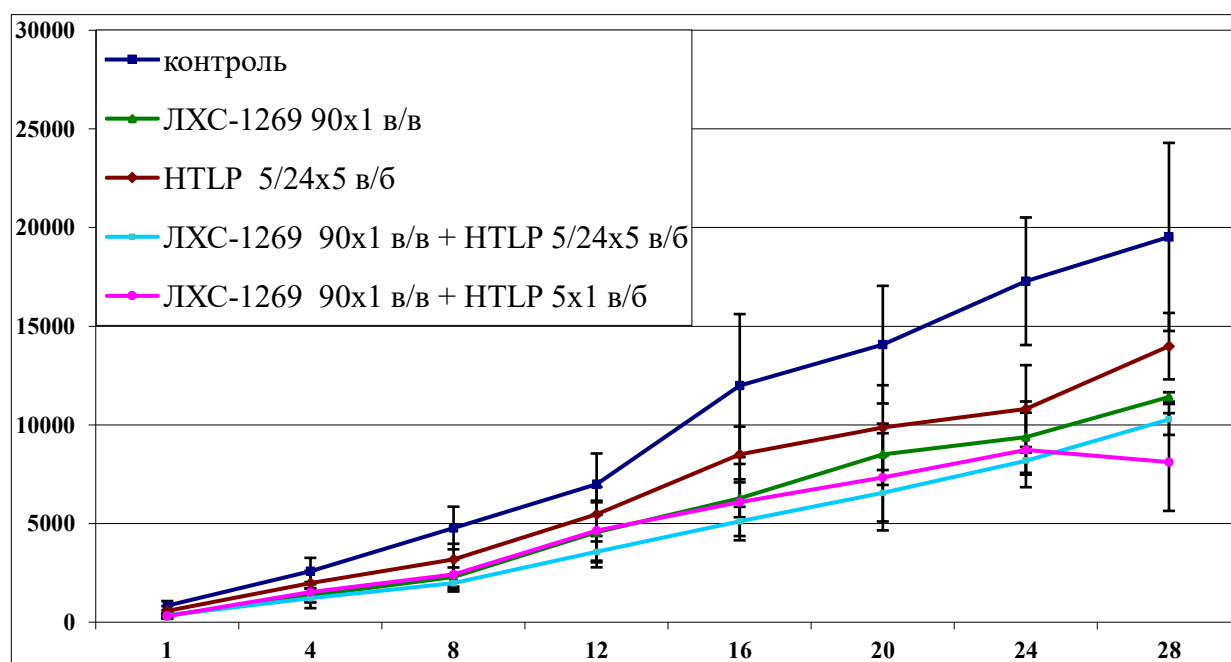


Рисунок 24. Динамика роста LLC у мышей (n=84) при введении ЛХС-1269 или HTLP в монотерапии и в комбинации. В/б – внутрибрюшинное введение, в/в – внутривенное введение. По оси ординат – объем опухолей в мм³, по оси абсцисс – дни после окончания лечения. Для оценки достоверности различий использовали t-тест, статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Противолучевая активность

Оценку радиопротекторных свойств HTLP проводили в различных моделях и при разных типах облучения. В случае протонного облучения использовались беспородные мыши SHK.

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 и 6,5 Гр для теста на выживаемость. 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).

На Рисунке 25 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 200 мкл раствора HTLP концентрацией 200 мкг/мл, 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.

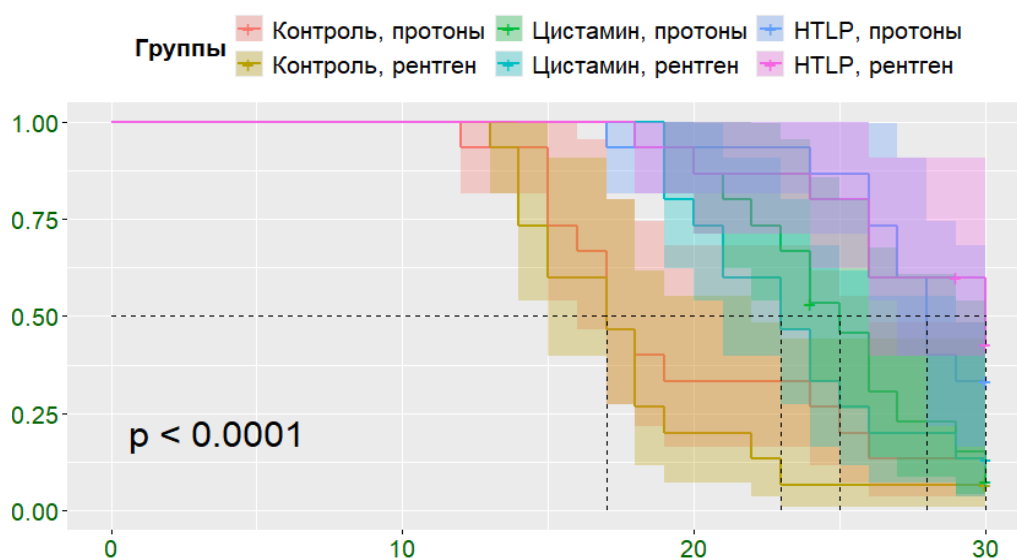


Рисунок 25. Кривые выживания Каплана-Майера для 30-дневной смертности мышей (n=90) штамма SHK. По оси ординат – функция выживаемости, по оси абсцисс – дни. Каждая кривая демонстрирует влияние различных методов лечения на выживаемость после облучения, медианное время выживания отмечено пунктирной линией. Группы: 1 – контрольная, подвергшаяся воздействию протонов; 2 – контрольная, подвергшаяся воздействию рентгеновского излучения; 3 – группа цистеамина после воздействия протонов; 4 – группа цистеамина после воздействия рентгеновского излучения; 5 – группа HTLP после воздействия протонов; 6 – группа HTLP после воздействия рентгеновского излучения. Статистическая значимость различий оценивается с помощью логарифмического рангового теста, $p < 0,0001$.

Была проведена оценка пропорциональных рисков с использованием регрессии Кокса, чтобы определить вероятность выживания животных на основе различных параметров: терапия,

вес животного и тип облучения. На Рисунке 26 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.

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

Микроядерный тест проводили, по методу Шмида, с небольшими модификациями. Цитогенетические повреждения оценивали путем подсчета количества полихроматических эритроцитов с микроядрами. Для оценки радиозащитной эффективности НТЛР изучалось количество цитогенетических повреждений в клетках костного мозга после воздействия рентгеновских лучей или высокоэнергетических протонов.

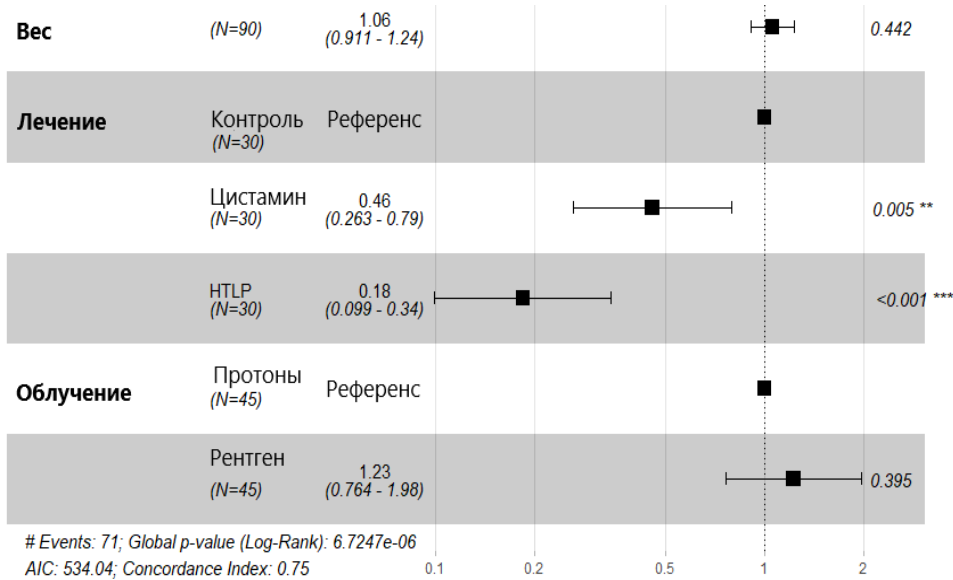


Рисунок 26. Форест-плот пропорциональных коэффициентов риска Кокса. График демонстрирует влияние различных факторов на коэффициент.

Данные на Рисунке 27 свидетельствуют о том, что введение НТЛР животным значительно сокращает количество микроядер по сравнению с контрольной группой после облучения в дозе 1,5 Гр. Наблюдаемый эффект дополнительно подтверждает потенциальные радиозащитные свойства НТЛР при радиационных повреждениях хромосом.

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.

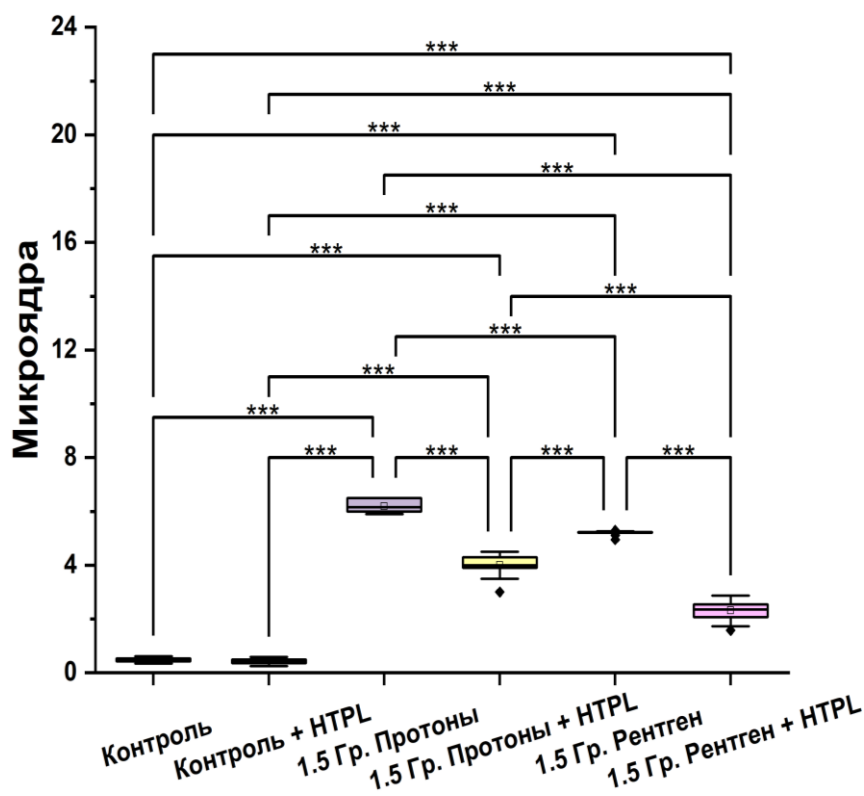


Рисунок 27. Результаты статистического анализа данных микроядерного теста ($n \geq 5$), *** $p < 0,01$.

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.)

Внутривенное введение НТЛР оказывает положительное влияние на выживаемость лабораторных животных при летальном (8,0 Гр) и сверхлетальном (8,5 Гр) облучении. Результаты представлены на Рисунке 28. Важно отметить, что положительный эффект наблюдался как в профилактической (за 1 час), так и в терапевтической (через 1, 6 и 24 часа) схеме введения НТЛР. Максимальную выживаемость ($95 \pm 5\%$) регистрировали в группе мышей, облученных 8,0 Гр, при введении НТЛР 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 НТЛР 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 НТЛР в дозе 10 мкг/мышь через 24 часа после облучения. НТЛР во всех дозах увеличивает выживаемость к 24 ч (Рисунок 28).

Таким образом НТЛР очевидно продемонстрировал радиопротекторные свойства, что хорошо соотносится с предыдущими данными. Данные экспериментов по изучению биологической активности НТЛР позволяют предположить наличие широкого терапевтического диапазона у исследуемого вещества.

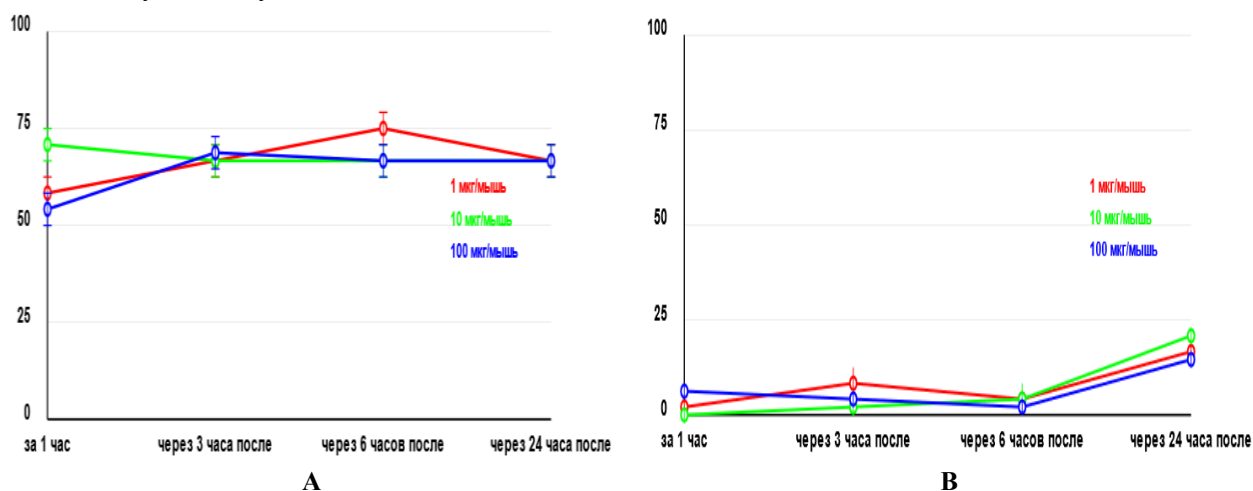


Рис. 28. Выживаемость мышей (в каждой группе по 20 животных) при облучении в дозе **А)** 8,0 Гр и **В)** 8,5 Гр при разных дозах и времени введения НТЛР. По оси ординат – выживаемость, по оси абсцисс – времена введения до или после облучения. Выживаемость в контрольной группе составила **А)** 20% и **В)** 0%.

Следует отметить, что 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 НТЛР такое ограничение отсутствует, что подтверждается наличием биологической активности как при профилактическом, так и терапевтическом введении, вплоть до суток после облучения.

Оценка количества гемоцитобластов

Для оценки количества плюрипотентных клеток использовали мышей линии F₁(СВА×С₅₇В1/6) 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 колониеобразующих единиц спленоцитов (КОЕ-С) у мышей извлекали селезенки и анализировали по ранее описанному методу.

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, числа и дифференцировки плюрипотентных клеток и, как следствие, числа клеток крови. Обнаружена биологическая активность НТЛР 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 29). 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 29В).

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.

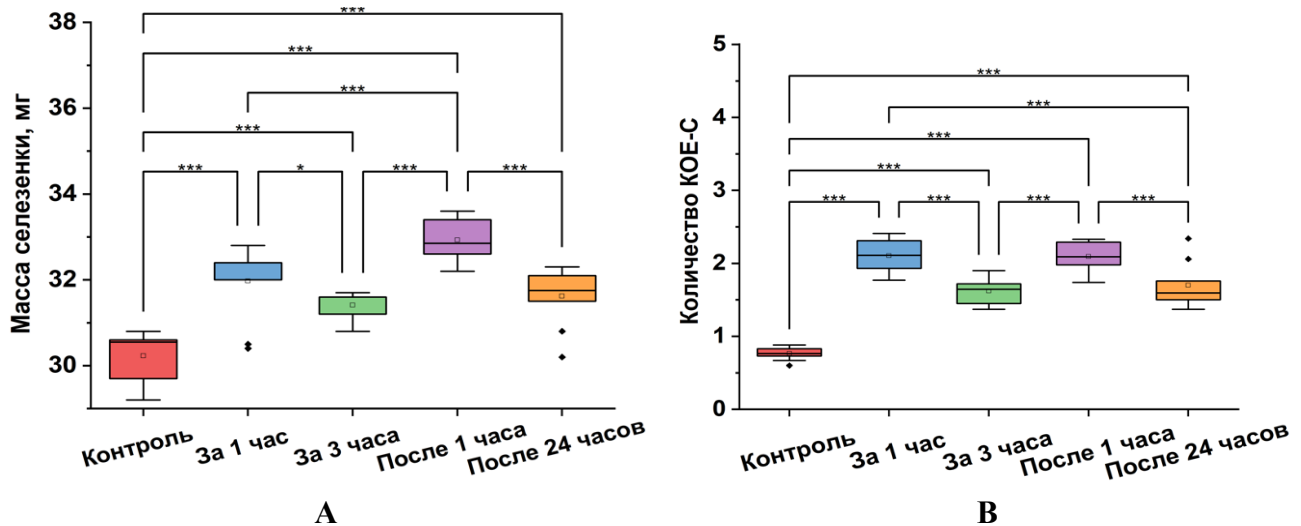


Рис. 29. Радиозащитный эффект НТЛР по влиянию **А)** на массу селезенки **В)** на количество КОЕ-С у мышей ($n=30$). группы: 1 – контрольная, облученные животные; 2 – экспериментальная: в/в стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 10 мкг/мышь за 3 ч до облучения; 3 – экспериментальная: в/в стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 10 мкг/мышь за 1 ч до облучения; 4 – экспериментальная: в/в стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 10 мкг/мышь через 1 ч после облучения; 5 – экспериментальная: в/в стерильный раствор 0,9% NaCl с НТЛР в дозе 10 мкг/мышь через 24 ч после облучения. Все группы сравнения прошли тест на нормальность (тест Шапиро-Уилка). Для множественных сравнений применялась поправка Бонферрони. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Радиозащитные свойства НТЛР, 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, НТЛР 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 литературе. Эта стимуляция не только способствует деградации метаболитов, образующихся в результате ионизирующего излучения, но и смягчает окислительный стресс посредством активации транскрипционного фактора Nrf2. Кроме того, активируя сигнальный путь Akt, полисахарид снижает уровень гексокиназы-2, тем самым усиливая митохондриальный гликолиз и минимизируя потенциальный ущерб. Наконец, влияние НТЛР 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.

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

Молекулярные механизмы биологической активности

Анализ противовоспалительного действия полисахарида в модели ЛПС-индуцированного воспаления в макрофагоподобных клетках ТНР-1

В исследовании использовали клеточную линию ТНР-1 (моноциты человека), полученную из Американской коллекции типовых культур (АТСС: ТІВ-202). Для дифференцировки моноцитов ТНР-1 в макрофагоподобные клетки суспензионные культуры обрабатывали форбол-12-миристан-13-ацетатом (РМА). После периода восстановления клетки обрабатывали ЛПС в концентрации 100 нг/мл для индукции воспалительного ответа. Одновременно с ЛПС в культуральную среду вносили STP в концентрациях 50, 100 и 200 мкг/мл. Контрольные культуры обрабатывали PBS или только ЛПС без добавления STP. Для проведения количественной ПЦР в реальном времени были разработаны специфические праймеры с использованием онлайн-инструмента NCBI Primer-BLAST. Полученные образцы кДНК использовали в качестве матрицы для количественной ПЦР в реальном времени. Для исключения контаминации геномной ДНК в каждый эксперимент включали отрицательный контроль без добавления обратной транскриптазы. 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.

Анализ противовоспалительного действия полисахарида STP проводили с использованием модели ЛПС-индуцированного воспаления в ТНР-1 макрофагоподобных клетках. Как показано на тепловой карте (Рисунок 30), стимуляция клеток ЛПС 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 STP в различных концентрациях 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 ЛПС-стимулированных клеток.

Интересно отметить, что экспрессия противовоспалительного гена IL-10 демонстрировала противоположную тенденцию. Как видно из тепловой карты (Рисунок 30), с увеличением концентрации STP наблюдалось прогрессивное повышение экспрессии IL-10 от 5,15-кратного уровня при ЛПС-стимуляции до 9,69-кратного уровня при добавлении STP в концентрации 200 мкг/мл. Это указывает на активацию эндогенных противовоспалительных механизмов под действием STP.

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 ЛПС-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.

Таким образом, STP осуществляет комплексное воздействие, проявляющееся 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.

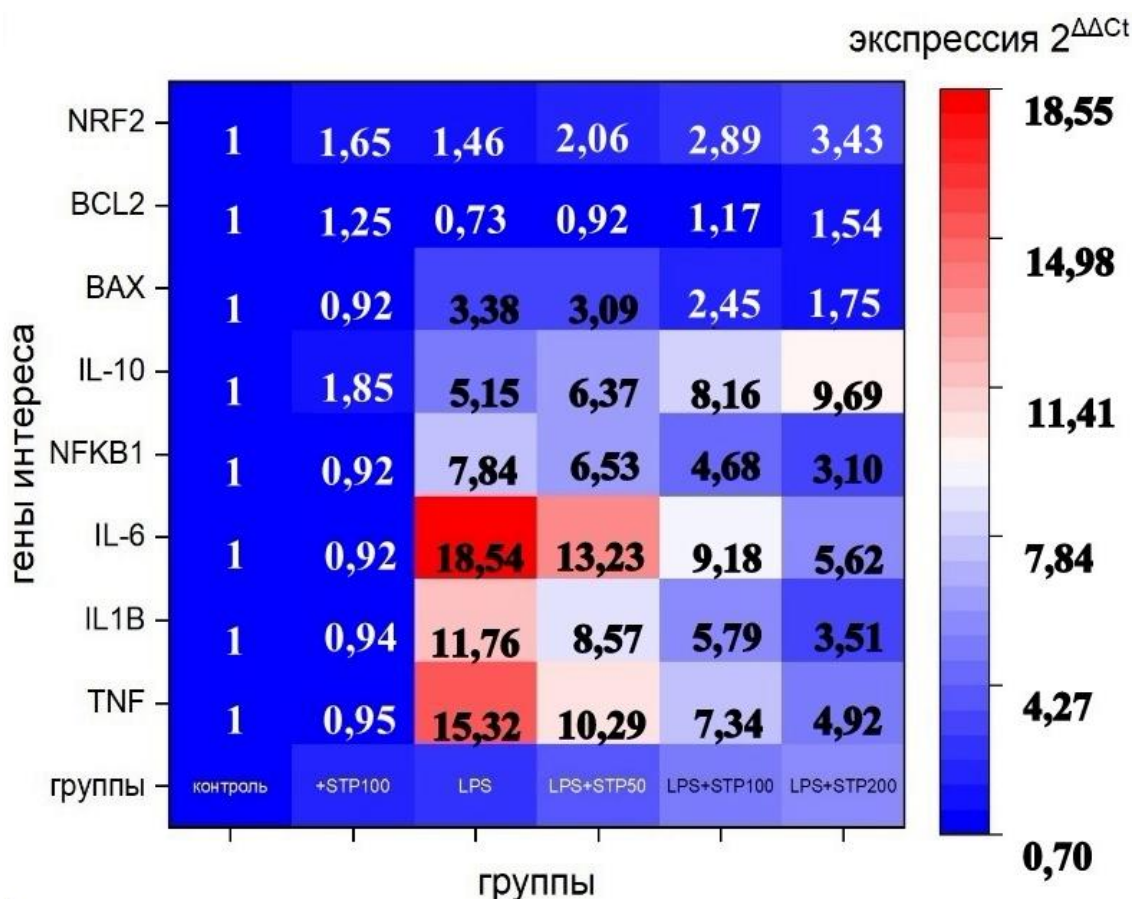


Рисунок 30. Результаты исследования противовоспалительного действия STP (50, 100 и 200 мкг/мл) на уровень мРНК методом ПЦР РВ в реальном времени, вовлеченных в регуляцию воспалительных процессов и окислительного стресса в макрофагоподобных клетках THP-1 в условиях ЛПС-индуцированного воспаления. По вертикальной оси расположены изучаемые гены, а по горизонтальной — соответствующие экспериментальные группы. Секвенирование проводили в 4 повторах.

Для HTLP были выбраны следующие гены интереса IL-1B (IL-1 β), IL-6, IL-10, IL12B, IL23, TNF (TNF- α), CD40, CD80, CD274, CSF-1.

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

Инактивация генов целевых рецепторов и блокирование рецепторов антителами

Для HTLP нами была разработана другая модель поиска потенциального молекулярного механизма действия. С учетом физико-химических и других свойств HTLP и свойств клеток, на которых исследовались проявления биологической активности HTLP 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. Соответствующие 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), pCerulean-VSVG и плазмидой, несущей shRNA гена интереса. Очищенный лентивирус добавляли к макрофагам RAW 264.7 в комбинации с ЛПС или HTLP.

HTLP, подобно ЛПС, 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 ЛПС 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 инициацию активации клеток HTLP через коактивацию 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 – именно это и определяет биологическую активность HTLP.

Данные по влиянию ЛПС на выработку TNF- α в культуре клеток демонстрируют взаимосвязь между основным рецептором ЛПС 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 и 24-му часу. Схожие данные получены при антительной блокаде рецепторов.

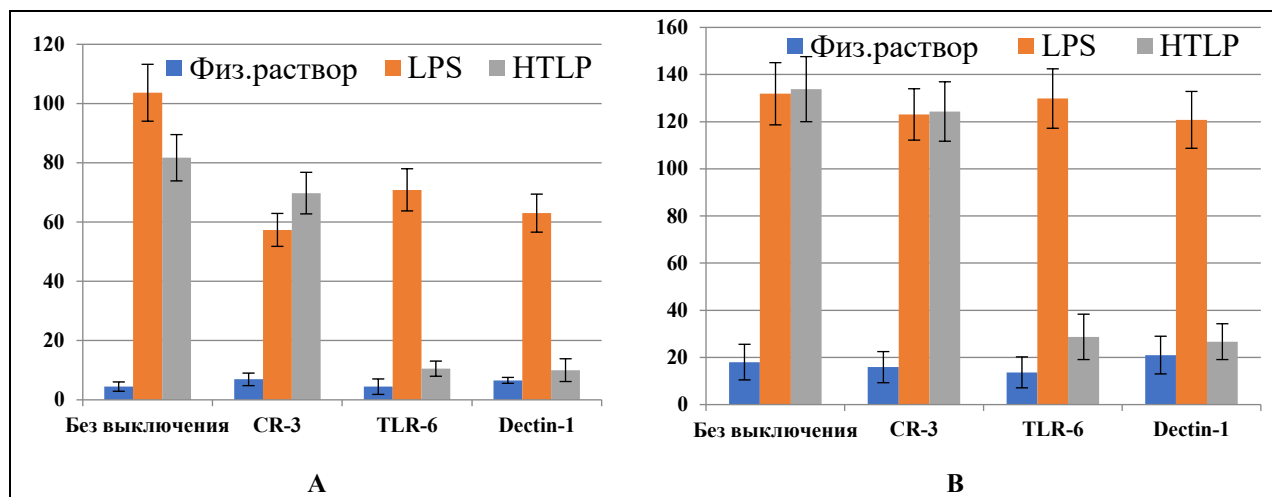


Рисунок 31. Диаграмма сравнений уровней выработки TNF-α клеточной линии RAW 264.7 с инактивированными генами целевых рецепторов CR3, Dectin-1 и TLR-6 через **А)** 4 ч и **В)** 24 ч инкубации с HTLP в дозе 100 мкг/мл. По оси ординат – концентрация TNF-α в пг/мл, по оси абсцисс – группы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биологически активный полисахарид HTLP был выделен из коркового слоя клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus L.*) с использованием и различных видов хроматографии. Были изучены структурные, физико-химические характеристики и различные виды биологической активности очищенного HTLP, проанализированы биохимические и молекулярные механизмы его действия.

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.

Было показано, что HTLP является β-гликаном, проявляющим свойства полиэлектrolита, с β-(1→4)- и β-(1→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 различных видов его биологической активности. HTLP индуцирует продукцию TNF-α. При этом, в условиях высокой, как спонтанной, так и ЛПС-индуцированной, продукции TNF-α, HTLP подавлял высвобождение IL-1, а при низкой продукции наблюдалась стимуляция его высвобождения. HTLP дозозависимо стимулировал экспрессию IL-6.

HTLP в модели карциномы Уокера и карциномы легких Льюиса проявлял противоопухолевое действие как в монотерапии, так и в комбинации с ЛХС-1269. Антиметастатическое действие полисахарида HTLP обнаружено в модели карциномы Уокера *in vivo*. Такой эффект HTLP не связан с его влиянием на жизнеспособность опухолевых клеток напрямую, поскольку HTLP не обладает прямым цитотоксическим действием, что было показано в различных моделях. Вероятно, действие HTLP обусловлено активацией специфических противоопухолевых клеток иммунной системы – Т-лимфоцитов, натуральных

киллеров и макрофагов (также было показано в различных моделях). Иммуномодулирующие полисахариды, обладающие способностью стимулировать, выработку цитокинов и не проявляющие цитотоксической активности, представляют собой перспективный класс соединений для разработки радиопротекторных средств. НТЛР оказывает протекторное действие на гемопоэтические стволовые клетки, снижая их повреждение ионизирующей радиацией. НТЛР является стимулятором роста колоний гемопоэтических стволовых клеток и модулятором цитокиновой активности. IL-1 β , TNF- α и IL-6 участвуют в активации каскада сигнальных путей, которые приводят к экспрессии генов, вовлеченных в репарацию ДНК.

Полисахарид STP был выделен с помощью хроматографических методов из коркового слоя клубней картофеля с ростками (*Solanum tuberosum* L.). Очищенный препарат получили, используя ионообменную хроматографию и гельфильтрацию. Были изучены его структурные и физико-химические свойства, различные виды биологической 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. Эти факторы определяют физико-химические свойства и реализацию STP различных видов биологической активности.

STP снижал уровень провоспалительных цитокинов IL-1 β и IFN- γ , что в сочетании с увеличением концентрации противовоспалительного цитокина IL 4 указывает на выраженный противовоспалительный эффект STP.

Помимо влияния на экспрессию воспалительных медиаторов, STP оказывал модулирующее действие на них и на гены, связанные с окислительным стрессом и апоптозом. Изменения в экспрессии этих генов является основой биологической активности STP *in vivo* в модели коронавирусной инфекции у хомяков, 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.

В настоящем исследовании показано, что полисахаридные комплексы НТЛР и STP не обладают анафилактической и аллергизирующей активностью, токсическими, тератогенными и мутагенными свойствами.

Проведенные исследования позволили сформулировать основы изучения полисахаридных комплексов из растительного сырья и биохимических механизмов их биологической активности для дальнейшего биомедицинского применения. С точки зрения фармацевтической промышленности для применения полисахаридов в биомедицинских целях необходимо, прежде всего, установить спектр потенциальной биологической активности препаратов из растительного сырья и возможные биохимические механизмы ее реализации. Зачастую опыт традиционной медицины по применению грубых экстрактов из растительного сырья позволяет сузить круг используемых *in vivo* или *in vitro* моделей для оценки биологической активности. При этом следует учитывать, что для препаратов с непрямым механизмом активности модели должны включать в себя задействованные в ее реализации системы организма

(например, иммунная, эндокринная и др.). На следующем этапе логично представить себе получение гомогенных препаратов с максимальной степенью очистки, при сохранении целевой биологической активности, которую, при этом, необходимо тестировать после каждого этапа очистки. Далее необходимо изучить физико-химические свойства полученного вещества или комплекса веществ и установить основные характеристики, обеспечивающие реализацию биологической активности. На основании полученных данных 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.

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

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-1β, проявляет противоопухолевые и радиозащитные свойства. STP является противовоспалительным, но не анальгезирующим средством, ингибируя экспрессию провоспалительных генов IL1, IL6, TNF, BAX и NFκB, 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.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index"

1. **Генералов Е.А.** Изучение структуры и иммуноадъювантной активности глюкана «АДВА» / **Е.А. Генералов** // Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия. – 2013. – N 6. – С. 35-41. (Объём 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). (Объём 0,9 п.л.). EDN: SLLXZV].

2. 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. (Объём 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). (Объём 0,8 п.л., вклад 60%). EDN: RWQHRD].

3. 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. Импакт-фактор 3,6 (JIF). (Объём 1,7 п.л., вклад 50%). EDN: AOOUCS.

4. **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. (Объём 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].

5. **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.

6. **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: PGFGEA. [**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].

7. 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.

8. **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.

9. 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: СКНННА. [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].

10. Киселева М.П. и др. Влияние полисахарида из *Helianthus tuberosus* L. на антипролиферативную активность производного n-гликозида индоло[2,3-a] 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. Korniyushenkov, 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: BSHEIJ].

11. 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. Generlaova, 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].

12. **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: MOYMGSC.

13. **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.

14. **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.

15. 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

16. **Генералов Е.А.** // Патент РФ № 2537033, 29.10.2013, Способ применения растительного полисахарида в качестве радиопротектора и стимулятора колониеобразования стволовых клеток селезенки облученных животных. (Объем 0,9 п.л., вклад 100%). 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.

Список сокращений: АОК – антителообразующие клетки; в/б – внутрибрюшинно; в/в – внутривенно; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГЖХ – газожидкостная хроматография; ГПХ – гельпроникающая хроматография; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; ИК – инфракрасный; ИФА – иммуноферментный анализ; КД – круговой дихроизм; КОЕ-С – клетки: колониеобразующие единицы в селезенке; ЛД – летальная доза; ЛПС – липополисахарид; ЛХС-1269 – производное N-гликозида индоло[2,3-а]карбазола; ММ – молекулярная масса; МПК – мононуклеары периферической крови; ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; ТРО – торможение роста опухоли; ЭБ – эритроциты барана; АИС – информационный критерий Акаике; ВАХ – Bcl-2-ассоциированный X-белок; BCL2 – В-клеточная лимфома 2; CD – кластер дифференцировки; CR3 – рецептор комплемента 3; DAMPs – молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями; GAG – ген структурного белка капсида; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; HTLP – полисахарид из *Helianthus tuberosus* L.; ИКК – киназа IκB; IRAK – киназа, ассоциированная с рецептором IL-1; IFN – интерферон; IL – интерлейкин; lgTCID – логарифм тканевой цитопатической инфекционной дозы; LLC – карцинома легких Льюиса; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; MR – маннозный рецептор; МТТ – 3,4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолия; NFκB – ядерный фактор κB; NRF – ядерный респираторный фактор; PAMPs – патоген-ассоциированный молекулярный фрагмент молекул; REV – ген регулятора экспрессии вирионных белков; STP – полисахарид из *Solanum tuberosum* L.; TGF – трансформирующий ростовой фактор; TLR – Toll-подобных рецепторов; TNF – фактор некроза опухолей; VSVG – ген гликопротеина G вируса везикулярного стоматита.

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.