УДК 615.322.012:582.521.43.088.1:615.37
DOI 10.20538/1682-0363-2017-3-5–15
Для цитирования: Адекенов С.М., Данилец М.Г., Ивасенко С.А., Никифоров Л.А., Кривощеков С.В., Лигачёва А.А., Трофимова Е.С., Шерстобоев Е.Ю., Жданов В.В., Белоусов М.В. Фенольные соединения этанольных извлечений *Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L. и *Lemna polyrrhiza* L. Schleid. и их иммуномодулирующая активность. *Бюллетень сибирской медицины.* 2017; 16 (3): 5–15

Фенольные соединения этанольных извлечений *Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L. и *Lemna polyrrhiza* L. Schleid. и их иммуномодулирующая активность

Адекенов С.М.[1], Данилец М.Г.[2], Ивасенко С.А.[1], Никифоров Л.А.[4], Кривощеков С.В.[3,4], Лигачёва А.А.[2], Трофимова Е.С.[2], Шерстобоев Е.Ю.[2], Жданов В.В.[2], Белоусов М.В.[4]

[1] *Международный научно-производственный холдинг (МНПХ) «Фитохимия»*
Республика Казахстан, 100009, г. Караганда, ул. Газалиева, 4

[2] *Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга (НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга) Томского национального исследовательского медицинского центра (НИМЦ) Российской академии наук (РАН)*
Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

[3] *Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)*
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

[4] *Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)*
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Определение состава фенольных соединений этанольных извлечений, выделенных из трех видов ряски: ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски тройчатой (*Lemna trisulca* L.) и ряски многокорневой (*Lemna polyrrhiza* L., синоним *Spirodella polyrrhiza* L.) *Schleid.*), и изучение его влияния на активацию системы иммунитета.

Материал и методы. Объект исследования: воздушно-сухие образцы травы ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски тройчатой (*Lemna trisuica* L.) и ряски многокорневой (*Lemna polyrrhiza* L.), собранные в период их вегетации в 2010–2011 гг. в малопроточных и стоячих водоемах Кожевниковского и Томского районов Томской области. Выделение полифенольных комплексов (ПФК) проводили экстракцией воздушно-сухого сырья спиртом этиловым. При качественном и количественном анализе исследуемых образцов применяли метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Agilent 1100 Series (США) в изократическом режиме. В экспериментах для определения иммуномодулирующей активности использовали 200 самцов мышей линий C57BL/6 и BALB/C в возрасте 8–12 нед. Пролиферацию клеток оценивали колориметрическим методом. Абсорбцию полученных растворов замеряли при помощи многоканального спектрофотометра при длине волны 540 нм. Определение антителообразующих клеток в селезенке проводили методом локального гемолиза. Титр антител в сыворотке крови оценивали в реакции гемагглютинации. Локальную реакцию гиперчувствительности немедленного типа оценивали по методике в авторской модификации.

Результаты. Впервые проведено исследование качественного состава и количественного содержания ПФК ряски малой *Lemna minor* L. (LM), ряски трисульки *Lemna trisulca* L. (LT) и ряски многокорневой *Lemna polyrrhiza* L.(LP): (4,7 ± 0,4)%, (3,3 ± 0,3)%, (12,8 ± 0,7)% соответственно. Наибольшее содержа-

✉ *Кривощеков Сергей Владимирович,* e-mail: chrom@tpu.ru.

ние фенолокислот (10,76%) и суммы флавоноидов, изофлавоноидов и кумаринов (14,7%) обнаружено в образце LP. Содержание хлорогеновой и 3,5-дигидроксибензойной кислот в 2–9 раз больше в LP, чем других видах ряски. LM, LT в концентрации 5 мкг/мл и LP в диапазоне 0,5–160 мкг/мл не оказывают токсического действия на антигенпрезентирующие клетки. При инкубации с LT (20 мкг/мл) пролиферация макрофагов снижается в 1,2 раза, а при инкубации с LM и LT (80 мкг/мл) в 1,2 и 1,8 раза соответственно. ПФК ряски многокорневой (LP) не оказывают подобного эффекта. LM и LP оказывают стимулирующее действие на продукцию нитритов в концентрациях 5 и 20 мкг/мл, усиливая ее в 1,3–1,6 раза. Курсовое введение LT и LP приводит к достоверному снижению числа антителобразующих клеток в 1,5 и 2,3 раза и уменьшению величины локальной реакции гиперчувствительности в 1,9 и 1,5 раза соответственно.

Ключевые слова: полифенольный комплекс, ряски, род *Lemna*, оксид азота, макрофаги, Th-2.

ВВЕДЕНИЕ

Растения семейства ароидные (*Araceae*) относятся к числу ценных кормовых, пищевых и лекарственных растений. Препараты рясок применяются в народной медицине при лечении воспалительных простудных заболеваний различной этиологии, витилиго, аллергических заболеваний (крапивницы), заболеваний печени и щитовидной железы [1]. Однако в литературе мало сведений о химическом составе рясок. В ранее проведенных исследованиях [2] изучен качественный и количественный состав первичных метаболитов трех видов ряски, которые являются субстратом для биосинтеза биологически активных веществ, в том числе фенольных соединений, таких как фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды и кумарины.

Многочисленные исследования показывают, что растительные фенольные соединения (ФС), обладая крайне низкой цитотоксичностью, проявляют широкий спектр фармакологических и терапевтических эффектов, включая антиоксидантные, антипролиферативные, противовирусные, антибактериальные и антивозрастные свойства [3–6]. В литературе [7–9] приведены экспериментальные данные (*in vitro* и *in vivo*), в том числе клинические, доказывающие наличие у ФС противовоспалительных свойств, основанных на их способности влиять на экспрессию ряда генов, отвечающих за продукцию цитокинов и молекул адгезии, и (или) активность ферментов. Однако роль ФС в специфическом иммунном ответе все еще остается совершенно не изученной. Выявлено, что ФС, обладая иммуномодулирующей активностью, способны как стимулировать, так и угнетать продукцию оксида азота в культуре клеток, дозозависимо снижать уровень провоспалительных цитокинов интерлейкина (ИЛ)-2, интерферона (ИФН)-γ, иммуноглобулинов (Ig) M и G митогенстимулированных мононуклеаров человека и подавлять секрецию TNF-α, оказывая протективный эффект при Кон-А-индуцированном иммунном повреждения печени. Фенольные соединения группы проантоцианидинов, ингибируя синтез ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-12р70, и, напротив, активируя синтез ИЛ-10, селективно подавляют поляризацию наивных Т-лимфоцитов по Th1-типу иммунного ответа [10, 11]. Флавоноловый агликон кверцетин способен эффективно подавлять функции липополисахарид-активированных дендритных клеток мышей, снижая секрецию провоспалительных цитокинов и экспрессию молекул гистосовместимости 2-го класса [12]. Полученные результаты, по мнению авторов, позволяют рассматривать проантоцианидины и кверцетин в качестве перспективных веществ для профилактики и терапии хронических воспалительных и аутоиммунных заболеваний, а также иммунодепрессанта при проведении трансплантаций. В целом анализ литературы позволяет проследить тенденцию исследований по изучению ФС в направлении применения как лекарственных кандидатов, так и в виде пищевых добавок для активации системы иммунитета при хронических воспалительных процессах [13].

Цель данной работы – определение состава фенольных соединений этанольных извлечений, выделенных из трех видов ряски: ряски малой *Lemna minor* L., ряски тройчатой *Lemna trisulca* L. и ряски многокорневой *Lemna polyrrhiza* L. (синоним *Spirodella polyrrhiza* (L.) Schleid.), и изучение его влияния на активацию системы иммунитета.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили воздушно-сухие образцы травы ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски тройчатой (*Lemna trisuica* L.) и ряски многокорневой (*Lemna polyrrhiza* L.), собранные в период их вегетации в 2010–2011 гг. в малопроточных и стоячих водоемах Кожевни-

ковского (окр. села Десятова) и Томского (окр. села Коларова) районов Томской области.

Выделение полифенольных комплексов. Выделение полифенольных комплексов (ПФК) проводили экстракцией воздушно-сухого сырья (20 г) 70%-м (об./об.) спиртом этиловым (соотношение сырье – экстрагент 1 : 25) на кипящей водяной бане в колбе, снабженной обратным холодильником. Экстракт отделяли от сырья фильтрацией через тканевый фильтр, затем повторно фильтровали через бумажный фильтр («синяя лента») при пониженном давлении. Для очистки от липофильных веществ экстракт на 70%-м (об./об.) спирте этиловом, содержащим полифенольный комплекс, дважды экстрагировали гексаном (400 мл). Очищенный полифенольный комплекс упаривали на роторном испарителе и лиофилизировали.

Определение фенольных соединений. Качественный и количественный анализ исследуемых образцов проводили методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Agilent 1100 Series (США) в изократическом режиме с использованием аналитической колонки, заполненной сорбентом Zorbax SB-C18 4,6 x 150 мм с размером частиц 5 мкм. Длина волны детектирования 254 нм, температура термостата колонки 25 °С [14]. Обработку хроматографических данных производили с использованием программного обеспечения ChemStation.

Количественное содержание (%) фенольных соединений в исследуемых образцах определяли методом внешнего стандарта:

$$W_{PA} = \frac{S_1 \times m_0 \times P}{S_0 \times m},$$

где W_{PA} – содержание вещества в образце, %; S_1 – среднее значение площади пика вещества, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора, mAU × min; S_0 – среднее значение площади пика вещества, вычисленное из хроматограмм стандартного раствора определяемого вещества, mAU × min; m_0 – масса навески определяемого вещества, взятая для приготовления стандартного раствора, г; m – масса навески исследуемого образца полифенольного комплекса, взятая для приготовления испытуемого раствора, г; P – чистота определяемого вещества (%).

Определение фенолокислот. Состав подвижной фазы: ацетонитрил – 5%-й раствор уксусной кислоты в соотношении 20 : 80. Для идентификации компонентов сравнивали время удерживания на хроматограммах испытуемых растворов и стандартных образцов ванильной кислоты, хлорогеновой кислоты, кофейной кислоты, *м*-кумаровой кислоты, 2,3-дигидроксибензойной кислоты, 2,5-дигидрокси-1,4-бензолдиуксусной кислоты, бензойной кислоты, хинной кислоты, феруловой кислоты, 2,5-дигидроксибензойной кислоты, 3,5-дигидроксибензойной кислоты, 2,6-дигидроксибензойной кислоты, *о*-кумаровой кислоты, коричной кислоты. Для подтверждения достоверности проведенной идентификации анализируемых веществ использовали метод добавок.

Определение кумаринов, флавоноидов и изофлавоноидов. Состав подвижной фазы: метанол – 5%-й раствор уксусной кислоты в соотношении 40 : 60. Для идентификации компонентов сравнивали время удерживания на хроматограммах испытуемых растворов и стандартных образцов ононина, 4,5,7-тригидроксиизофлавоноида (генистеин), биоханина, формононетина; рутина, кверцетина, лютеолина; достоверных образцов мирицетина, кумарина, эскулина, эскулетина, хаплоперозида А, изопсоралена, фраксетина, капенсина, обтусинина, скиммина. Для подтверждения достоверности проведенной идентификации анализируемых веществ использовали метод добавок.

Определение иммуномодулирующей активности. В экспериментах использовали 200 самцов мышей линий C57BL/6 и BALB/C в возрасте 8–12 нед, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга. Перитонеальные макрофаги (МФ) получали прилипанием к пластику клеток перитонеального экссудата. Клетки культивировали при 37 °С в атмосфере с 5%-м CO_2 и абсолютной влажности (100%) в среде следующего состава: RPMI 1640 (Sigma, США) с добавлением 10% ЭТС (Hyclone, США), 20 мМ HEPES (Sigma), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола (Sigma), 50 мкг/мл гентамицина (Sigma) и 2 мМ L-глютамина (Sigma). Функциональную активность клеток оценивали при культивировании клеток в 96-луночных планшетах в присутствии полифенольных комплексов в различных концентрациях; липополисахарида (ЛПС) *E. coli* (серотип O111:B4, Sigma); конконавалин А (Кон А, Sigma) Продукцию оксида азота (NO) оценивали по содержанию нитритов в супернатантах при помощи реактива Грейса через 48 ч инкубации [15]. Активность аргиназы определяли по методике [16] в авторской модификации. Для этого в клеточном лизате замеряли концентрацию мочевины с помощью тест-системы «Мочевина-450» («Био-ЛА-Тест», Чехия) согласно приложенному к тест-системе протоколу с использованием спектрофотометра (длина волны 540 нм). За единицу активности фермента принимали

количество аргиназы, катализирующей образование 1 мкМ мочевины в минуту. Пролиферацию клеток оценивали колориметрическим методом, для чего за 4 ч до окончания культивирования спленоцитов в лунки с клетками вносили раствор МТТ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) в конечной концентрации 200 мкг/мл. Осадок растворяли диметилсульфоксидом (Sigma). Абсорбцию полученных растворов замеряли при помощи многоканального спектрофотометра при длине волны 540 нм. Определение антителообразующих клеток (АОК) в селезенке проводили методом локального гемолиза. Титр антител в сыворотке крови оценивали в реакции гемагглютинации и выражали в логарифмической шкале с основанием 2 (log2) [17]. Локальную реакцию гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ) оценивали по методике [18] в авторской модификации. На 7-е сут после третьей иммунизации подкожной инъекцией овальбумина (OVA) (Sigma) и гидроокиси алюминия (Sigma) в подушечку задней лапы вводили OVA – опытная лапа, в контрлатеральную лапу (контрольную) – физиологический раствор (ФР). Местную воспалительную реакцию оценивали через 4 ч. Величину реакции оценивали как разницу массы между контрольной и опытной лапой и выражали в миллиграммах.

Статистическая обработка результатов. Полученные в ходе исследования данные обработаны с помощью пакета статистических программ Statistica 6.0. Для каждой выборки вычислено среднее арифметическое (X), ошибка среднего арифметического (m), среднее арифметическое отклонение (σ). Проверка на нормальность распределения проведена с помощью критерия Шапиро – Уилка. Использован метод однофакторного дисперсионного анализа и критерий множественных сравнений Даннета для сопоставления выборочных средних нескольких экспериментальных выборок с одной контрольной. Различия считали достоверными при $p < 0{,}001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выход полифенольных комплексов трех видов ряски составил (4,7 ± 0,4)% (ряска малая (LM)); (3,3 ± 0,3)% (ряска тройчатая (LT)) и (12,8 ± 0,7)% (ряска многокорневая (LP)).

Наибольшее количество фенолокислот содержится в образце LP (10,76%), наименьшее – (5,27%) в образце LT (табл. 1). Основным компонентом фенолкарбоновой природы всех видов ряски является 2,5-дигидрокси-1,4-бензоилдиуксусная кислота с наибольшим содержанием в ПФК LM, в которой помимо этой кислоты определены еще 11 фенолкарбоновых кислот, но в меньшем количестве. Содержание в LM хлорогеновой, 3,5-дигидроксибензойной, 2,6-дигидроксибензойной кислот составляло 0,13–0,27%. Содержание других кислот не превышало 0,08%. Образец LP отличался от двух других видов ряски по содержанию ряда фенолкарбоновых кислот: 2,5-дигидроксибензойной (отсутствует во фракциях LM и LT); 2,6-дигидроксибензойной (LM – 0,17%; LT – 0,05%); *м*-кумаровой (LM, LT – следовые количества). Содержание хлорогеновой и 3,5-дигидроксикарбоновой кислот в 2 и 9,5 раз соответственно больше во фракциях LP, чем других видах ряски. Также ПФК LP отличались от LM и LT отсутствием коричной, *о*-кумаровой, ванильной кислот.

Таблица 1

Содержание фенолкарбоновых кислот в полифенольных комплексах ряски малой (LM), ряски тройчатой (LT) и ряски многокорневой (LP) в пересчете на массу ПФК, $X \pm m$, %

Показатель	Вид ряски		
	LP	LT	LM
2,5-дигидрокси-1,4-бензолдиуксусная кислота	7,30 ± 0,29	4,81 ± 0,25	8,72 ± 0,27
Хлорогеновая кислота	0,61 ± 0,04	0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,02
3,5-дигидроксибензойная кислота	0,30 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Кофеиновая кислота	0,09 ± 0,03	0,04 ± 0,002	0,030 ± 0,002
Ванильная кислота	–	0,01 ± 0,001	0,03 ± 0,002
2,5-дигидроксибензойная кислота	1,28 ± 0,07	–	–
2,6-дигидроксибензойная кислота	0,89 ± 0,05	0,02 ± 0,001	–
2,3-дигидроксибензойная кислота	0,03 ± 0,0002	0,002 ± 0,0001	0,008 ± 0,0005
Хинная кислота	–	–	–
Феруловая кислота	0,006 ± 0,0003	0,001 ± 0,0001	–
м-Кумаровая кислота	0,19 ± 0,00007	0,0007 ± 0,00002	0,0009 ± 0,00003

Окончание табл. 1

Показатель	Вид ряски		
	LP	LT	LM
о-Кумаровая кислота	–	0,005 ± 0,0003	0,005 ± 0,0003
Бензойная кислота	0,06	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,001
Коричная кислота	–	0,003 ± 0,0002	0,002 ± 0,0001

Исследуемые виды ряски отличаются между собой как по качественному, так и по количественному составу кумаринов, флавоноидов и изофлавоноидов (табл. 2). Так, к мажорным компонентам LM относятся хаплоперозид А и эскулин, LT – эскулин и эскулетин, LP – эскулин и фраксетин.

Таблица 2

Содержание кумаринов, флавоноидов и изофлавоноидов в полифенольных комплексах ряски малой (LM), ряски тройчатой (LT) и ряски многокорневой (LP) в пересчете на массу ПФК, $X \pm m$, %

Показатель	Вид ряски		
	LP	LT	LM
Кумарины:			
хаплоперозид А	0,80 ± 0,05	0,27 ± 0,02	1,70 ± 0,09
эскулин	2,4 ± 0,16	1,58 ± 0,12	1,31 ± 0,07
эскулетин	0,7 ± 0,04	0,27 ± 0,02	0,46 ± 0,04
фраксетин	9,9 ± 0,71	0,13 ± 0,01	0,21 ± 0,02
обтусинин	–	–	0,008 ± 0,0005
кумарин	0,8 ± 0,05	0,033 ± 0,002	0,034 ± 0,002
изопсорален	–	–	–
Флавоноиды:			
рутин	–	0,031 ± 0,002	–
мирицетин	–	0,011 ± 0,001	–
кверцетин	–	–	–
Изофлавоноиды:			
ононин	0,1 ± 0,01	0,002 ± 0,0001	–
генистеин	–	–	–
биоханин	–	–	–

В образце LM установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А (t_R = 3,53 мин) с содержанием 1,70%; эскулина (t_R = 4,23 мин) с содержанием 1,31%; эскулетина (t_R = 5,17 мин) – 0,46%; фраксетина (t_R = 5,52 мин) – 0,21%; обтусинина (t_R = 10,89 мин) – 0,008%; кумарина (t_R = 13,07 мин) – 0,034%. В образце LT установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А (t_R = 3,55 мин) с содержанием 0,27%; эскулина (t_R = 4,24 мин) с содержанием 1,58%; эскулетина (t_R = 5,19 мин) – 0,27%; фраксетина (t_R = 5,58 мин) – 0,13%; кумарина (t_R = 13,03 мин) – 0,033%; флавоноидов: рутина (t_R = 9,99 мин) – 0,031%; мирицетина (t_R = 13,78 мин) – 0,011 %; изофлавоноидов: ононина (t_R = 16,39 мин) – 0,002%. В образце LP установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А (t_R = 3,54 мин) с содержанием 0,80%; эскулина (t_R = 4,22 мин) – 2,40%; эскулетина (t_R = 5,15 мин) – 0,70%; фраксетина (t_R = 5,49 мин) – 9,9%; кумарина (t_R = 12,99 мин) – 0,80%; изофлавоноидов: ононина (t_R = 16,36 мин) – 0,1%.

Иммунотропные свойства полифенольных комплексов, выделенных из ряски малой, ряски тройчатой и ряски многокорневой, оценивали по их способности влиять на пролиферацию различных клеток системы иммунитета, продукцию ими оксида азота, метаболизм аргинина, а также клеточное и гуморальное звено иммунитета. Полифенольные комплексы, выделенные из данных видов ряски, не влияли на пролиферацию клеток лимфоцитарного звена иммунной системы (табл. 3). Уровень пролиферации не изменялся по сравнению с интактным контролем, но во всех использованных концентрациях был ниже в 1,4–1,9 раза (LM), 1,4–1,9 раза (LT) и 1,5–2,2 раза (LP), чем при совместном культивировании со стандартным активатором спленоцитов Кон А (контроль 2).

Таблица 3

Влияние различных концентраций ПФК ряски малой (LM), ряски тройчатой (LT) и ряски многокорневой (LP) на пролиферацию спленоцитов интактных мышей линии C57/BL6, $n = 8$, $X \pm m$

Показатель	Концентрация, мкг/мл	Пролиферация, у.е. оптической плотности	p
Интактный контроль 1 (среда)	–	154,8 ± 13,58	–
Стимулированный контроль 2 (Кон А)	4	266,3 ± 15,14	< 0,001*
LM	0,5	166,3 ± 8,64	< 0,001•
	5	159,3 ± 4,52	< 0,001•
	10	187,5 ± 34,47	= 0,004•
	20	167,0 ± 8,89	< 0,001•
	80	142,8 ± 6,79	< 0,001•
	160	170,8 ± 42,91	< 0,001•
LT	0,5	141,0 ± 4,97	< 0,001•
	5	137,0 ± 6,96	< 0,001•
	10	160,8 ± 1,70	< 0,001•
	20	185,4 ± 11,68	< 0,001•
	80	174,0 ± 6,52	< 0,001•
	160	152,4 ± 4,26	< 0,001•
LP	0,5	178,8 ± 18,03	< 0,001•
	5	168,5 ± 11,44	< 0,001•
	10	156,8 ± 11,88	< 0,001•
	20	133,3 ± 4,07	< 0,001•
	80	122,3 ± 3,82	< 0,001•
	160	131,8 ± 5,86	< 0,001•

* различия показателя с контролем; • различия показателя с контролем 2 (здесь и в табл. 4, 5).

LM, LT в концентрации 5 мкг/мл и LP во всех используемых концентрациях также не оказывали токсического действия на антигенпрезентирующие клетки (табл. 4). Однако пролиферация МФ снижалась в 1,2 раза при инкубации с LT, начиная с концентрации 20 мкг/мл, а в концентрации 80 мкг/мл в 1,2 (LM) и 1,8 раза (LT).

ПФК, выделенные из всех изучаемых растений, оказывали умеренное стимулирующее действие на секреторные свойства макрофагов. Наиболее выраженный эффект, находящийся в обратной зависимости от концентрации ПФК в культуре клеток, был выявлен при инкубации МФ с LT: концентрация нитритов снижалась с 9,2 ± 0,24 (5 мкг/мл) и 3,6 ± 0,13 (20 мкг/мл) до практически контрольных значений 2,1 ± 0,03 мкМ (80 мкг/мл). LM и LP оказывали стимулирующее действие в концентрациях 5 и 20 мкг/мл, усиливая продукцию нитритов в 1,3–1,6 раза, но применение в концентрации 80 мкг/мл приводило к снижению показателя относительно интактного контроля в 1,8 (LP) и 2,6 раза (LM). Следует отметить, что NO-активирующее действие изучаемых ПФК во всех используемых концентрациях было ниже, чем при стимуляции стандартным активатором макрофагов ЛПС.

Таблица 4

Влияние различных концентраций ПФК ряски малой (LM), ряски тройчатой (LT) и ряски многокорневой (LP) на пролиферацию перитонеальных макрофагов интактных мышей линии C57/BL6 и продукцию ими оксида азота, $n = 8$, $X \pm m$

Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Пролиферация, у.е. оптической плотности	Концентрация нитритов, мкМ
Интактный контроль 1 (МФ + среда)	-	305,0 ± 22,05	2,3 ± 0,04
Стимулированный контроль 2 (МФ + ЛПС)	1	341,5 ± 10,22	24,2 ± 0,36 *p < 0,0001
LM	5	298,5 ± 9,26	3,1 ± 0,13 *p = 0,004 • p < 0,001
	20	331,5 ± 8,42	3,6 ± 0,22 *p < 0,001 • p < 0,001
	80	248,8 ± 2,02 *p = 0,002 • p = 0,002	0,8±0,03 *p < 0,001 • p < 0,001
LT	5	332,3 ± 15,78	9,2 ± 0,24 *p < 0,001 • p < 0,001
	20	239,8 ± 26,15 *p < 0,001 • p < 0,001	3,6±0,13 *p < 0,001 • p < 0,001
	80	165,8 ± 15,90 *p < 0,001 • p < 0,001	2,1 ± 0,03 • p < 0,001
LP	5	333,5 ± 21,46	3,3 ± 0,10 *p = 0,002 • p < 0,001
	20	362,3 ± 14,30	3,2 ± 0,16 *p = 0,004 • p < 0,001
	80	307,8 ± 15,02	1,3 ± 0,23 *p < 0,001 • p < 0,001

Полученные данные позволили предположить, что фенольные соединения исследованных растений способны оказывать влияние на антигенпрезентирующие клетки посредством активации одного из путей утилизации L-аргинина: через NO-синтазу, приводя к потенцированию классически активированных МФ либо через аргиназу (альтернативно активированных) [19, 20]. В связи с этим было изучено действие ПФК на продукцию оксида азота (M1) и активность аргиназы

(М2) перитонеальных макрофагов мышей линии C57/BL6. В качестве контроля был использован стандартный активатор макрофагов М1 – липополисахарид *E. coli*.

При изучении влияния ПФК на метаболизм аргинина перитонеальными макрофагами были получены неоднозначные результаты. Как видно из табл. 5, культивирование макрофагов с ЛПС приводило к увеличению продукции оксида азота в 40,5 раз с (1,91 ± 0,08) в контроле до (77,45 ± 0,67) мкМ. Активность аргиназы при этом снижалась в 3,1 раза с (69,5 ± 1,9) до (22,5 ± 1,8) ЕА. Концентрация нитритов относительно спонтанной продукции в разной степени увеличивалась при инкубации со всеми изучаемыми веществами, не превышая значения ЛПС-стимулированного контроля. При этом ПФК не оказывали влияния на спонтанную активность аргиназы, значительно превышая значения показателя при инкубации с ЛПС.

Таблица 5

Влияние различных концентраций ПФК на метаболизм аргинина перитонеальными макрофагами интактных мышей линии C57/BL6, $n = 8$, $X \pm m$

Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Концентрация нитритов, мкМ	Активность аргиназы, ЕА
Среда (контроль 1)	–	1,91 ± 0,08	69,5 ± 1,9
ЛПС (контроль 2)	1	77,45 ± 0,67 *$p < 0,001$	22,5 ± 1,8 *$p < 0,001$
LM	5	3,10 ± 0,18 *$p < 0,005$ • $p < 0,001$	74,6 ± 1,5 • $p < 0,001$
LT	5	14,28 ± 0,31 *$p < 0,001$ • $p < 0,001$	70,2 ± 1,7 • $p < 0,001$
LP	5	2,35 ± 0,11 *$p < 0,001$ • $p < 0,001$	74,2 ± 1,2 • $p < 0,001$

Влияние исследуемых веществ на гуморальное звено Th1-зависимого иммунного ответа оценивали по количеству АОК и их функциональной активности, а именно продукции гемагглютининов. Показано, что курсовое введение ПФК ряски тройчатой и ряски многокорневой приводило к достоверному снижению числа АОК в 1,5 и 2,3 раза (табл. 6). ПФК ряски малой не влияют на антителообразование. Изменений синтеза антител, вырабатываемых В-лимфоцитами в ответ на эритроциты барана, не выявлено.

Влияние ПФК на Th2-зависимый иммунный ответ изучали в локальной реакции гиперчувствительности немедленного типа. Для этого трижды иммунизированным овальбумином мышам линии BALB/c вводили инъекции изучаемых веществ в течение 10 сут, но за 10 сут до индукции местной реакции. Введение в подушечку лапы антигена (овальбумина) проводили на 7-е сут после последней иммунизации.

Таблица 6

Влияние курсового введения ПФК ряски малой (LM), ряски тройчатой (LT) и ряски многокорневой (LP) на количество антителообразующих клеток и титр синтезируемых ими гемагглютининов у мышей C57/BL6, иммунизированных эритроцитами барана, $n = 7$, $X \pm m$

Исследуемое вещество	Концентрация, мг/кг	Число АОК, тыс./селезёнку	Титр гемагглютининов, $\log_2 T$
Физраствор (контроль)	–	36,4 ± 3,0	3,5 ± 0,8
Ликопид	2	102,3 ± 14,8 *$p < 0,002$	5,2 ± 0,6
LM	5	48,8 ± 3,9 • $p < 0,014$	4,2 ± 0,4
LT	5	23,6 ± 4,4 *$p < 0,004$ • $p < 0,002$	4,5 ± 0,5
LP	5	15,5 ± 4,8 *$p < 0,001$ • $p < 0,001$	4,6 ± 0,4

* различия показателя с физраствором; • различия показателя с ликопидом.

Таблица 7

Влияние курсового введения ПФК ряски малой (LM), ряски тройчатой (LT) и ряски многокорневой (LP) на локальную гиперчувствительность немедленного типа иммунизированных овальбумином мышей линии BALB/C, $n = 10$, $X \pm m$

Исследуемое вещество	Концентрация, мг/кг	Величина реакции, мг	p
Физраствор (контроль)	–	85,70 ± 0,53	–
LM	5	72,90 ± 4,93	–
LT	5	45,90 ± 7,38	* $p < 0,001$
LP	5	58,20 ± 7,38	* $p < 0,009$

* различия показателя с контролем.

Как видно из табл. 7, курсовое введение ФС ряски тройчатой и ряски многокорневой приводило к достоверному уменьшению величины реакции в 1,9 и 1,5 раза соответственно. ПФК ряски малой не влияли на показатель.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведено сравнительное исследование качественного состава и количественного содержания фенолкарбоновых кислот, кумаринов, фла-

воноидов, изофлавоноидов трех видов ряски. Основным компонентом фенолкарбоновой природы всех видов ряски является 2,5-дигидрокси-1,4-бензолдиуксусная кислота с наибольшим содержанием в ПФК ряски малой (LM), в которой помимо этой кислоты определены еще 11 фенолкарбоновых кислот, но в меньшем количестве. Мажорные компоненты флавоноидной структуры ПФК ряски малой – хаплоперозид А и эскулин, ПФК ряски тройчатой – эскулин и эскулетин, ПФК ряски многокорневой – эскулин и фраксетин.

ПФК, выделенные из ряски малой, ряски тройчатой и ряски многокорневой, обладают низкой цитотоксичностью по отношению к клеткам лимфоидной природы, но в высоких концентрациях снижают пролиферативные свойства клеток моноцитарно-макрофагального ряда. Выявленная цитотоксичность обусловливает снижение продукции нитритов антигенпрезентрующими клетками. Курсовое введение ФС приводило к угнетению Th1- и усилению Th2-зависимых иммунных реакций. Полученные данные доказывают наличие у изученных ФС иммуномодулирующих свойств и позволяют рассматривать их в качестве перспективных лекарственных субстанций для профилактики и терапии хронических воспалительных заболеваний.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Адекенов С.М. – разработка дизайна исследования, окончательное утверждение рукописи для публикации. Данилец М.Г. – проведение экспериментов, интерпретация данных, написание текста статьи. Ивасенко С.А. – разработка дизайна исследования, проведение экспериментов. Никифоров Л.А. – проведение экспериментов, интерпретация данных. Кривощеков С.В. – статистическая обработка результатов, интерпретация данных, написание текста статьи. Лигачева А.А. – проведение экспериментов, статистическая обработка результатов. Трофимова Е.С. – проведение экспериментов, интерпретация данных. Шерстобоев Е.Ю. – разработка дизайна исследования. Жданов В.В. – окончательное утверждение рукописи для публикации. Белоусов М.В. – разработка дизайна исследования, окончательное утверждение рукописи для публикации.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Эксперименты проводили в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985 г.). Удостоверяем, что протокол исследования соответствовал этическим нормам и принципам биомедицинских исследований, одобрен Комиссией по гуманному отношению к животным НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (протокол № 98122015).

ЛИТЕРАТУРА

1. Маркова А. Травник. Золотые рецепты народной медицины. М.: Эксмо-Форум, 2007: 928.
2. Никифоров Л.А., Фурса Н.С., Кривощеков С.В., Куркин В.А., Белоусов М.В. Сравнительное исследование веществ первичного обмена ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски тройчатой (*Lemna trisulca* L.) и многокоренника обыкновенного (*Spirodella polyrrhiza* L. Schleid.) // *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (1): 59–64. DOI:10.20538/1682-0363-2017-1-59-64.
3. Schepetkin I.A., Ramstead A.G., Kirpotina L.N., Voyich J.M., Jutila M.A., Quinn M.T. Therapeutic Potential of Polyphenols from Epilobium Angustifolium (Fireweed) // *Phytotherapy Research: PTR*. 2016; 30 (8): 1287–1297.
4. Williamson G., Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. // *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 81 (1 Suppl): 243S–255S.
5. Wang F., Xue Y., Yang J., Lin F., Sun Y., Li T., Wu C. Hepatoprotective effect of apple polyphenols against concanavalin A-induced immunological liver injury in mice // *Chemico-biological Interactions*. 2016; 258: 159–165.
6. Гилязова А.В., Корнилаева Г.В., Хаметова К.М., Салихов Ш.И., Мавлянов С.М., Карамов Э.В. Сравнительный анализ активности растительных фенолов по ингибированию ВИЧ-инфекции в Т-лимфобластоидной клеточной линии и мононуклеарах периферической крови // *Иммунология*. 2011; (1)32: 4–6.
7. Sadowska B., Micota B., Ryżalski M., Redzynia M., Ryżalski M. The immunomodulatory potential of *Leonurus cardiaca* extract in relation to endothelial cells and platelets // *Innate Immunity*. 2017; 23 (3): 285–295.
8. Шукшина О. Г., Масная Н.В., Исайкина Н.В., Шерстобоев Е. Ю., Калинкина Г.И. Влияние растительных фенольных комплексов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток *in vitro* // *Иммунология*. 2014; 3 (35): 138–142.
9. Lee N., Shin M.S., Kang Y., Park K., Maeda T., Nishioka H., Fujii H., Kang I. Oligonol, a lychee fruit-derived low-molecular form of polyphenol mixture, suppresses inflammatory cytokine production from human monocytes // *Human Immunology*. 2016; 77(6): 512–515.
10. Williams A.R., Klaver E.J., Laan L.C., Ramsay A., Fryganas C., Difborg R., Kringel H., Reed J.D., Mueller-Har-

vey I., Skov S., van Die I., Thamsborg S.M. Co-operative suppression of inflammatory responses in human dendritic cells by plant proanthocyanidins and products from the parasitic nematode *Trichuris suis* // *Immunology*. 2017; 150 (3): 312–328.
11. Huang R.Y., Yu Y.L., Cheng W.C., OuYang C.N., Fu E., Chu C.L. Immunosuppressive effect of quercetin on dendritic cell activation and function // *Journal of Immunology*. 2010; 184 (12): 6815–6821.
12. Pérez-Cano F.J., Castell M. Flavonoids, Inflammation and Immune System // *Nutrients*. 2016; 8 (10): 659.
13. Погодин И.С., Лукша Е.А., Нурмухаметова К.А., Адекенов С.М., Ивасенко С.А. Фитохимическое исследование надземной части соссюреи горькой (*Saussurea amara* L.)// *Омский научный вестник*. 2010; 1 (194): 115–118.
14. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrite in biological fluids // *Anal. Biochem*. 1982; 126: 131–143.
15. Munder M., Eichmann K., Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype // *J. Immunol*. 1998; 11(160): 5347–5354.
16. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2013: 64–79.
17. Емельяненко И.Н., Душкин В.А. Характеристика общей анафилаксии // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1971; 10: 69–71.
18. Laria A., Lurati A., Marrazza M., Mazzocchi D., Re K.A., Scarpellini M. The macrophages in rheumatic diseases // *J. Inflamm. Res*. 2016; 9: 1–11.
19. Kreider T., Anthony R.M., Urban J.F.Jr., Gause W.C. Alternatively activated macrophages in helminth infections// *Curr. Opin. Immunol*. 2007; 19: 448–453.

Поступила в редакцию 26.05.2017
Утверждена к печати 30.06.2017

Адекенов Сергазы Мынжасарович, д-р хим. наук, профессор, академик НАН, директор МНПХ «Фитохимия», г. Караганда.

Данилец Марина Григорьевна, д-р биол. наук, зав. отделом экспериментальных биологических моделей, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН, г. Томск.

Ивасенко Светлана Александровна, канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория химии терпеноидов, МНПХ «Фитохимия», г. Караганда.

Никифоров Леонид Анатольевич, ассистент, кафедра фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск.

Кривощеков Сергей Владимирович, мл. науч. сотрудник, центральная научно-исследовательская лаборатория (ЦНИЛ), СибГМУ; инженер кафедры технологии органических веществ и полимерных материалов, НИ ТПУ, г. Томск.

Лигачёва Анастасия Александровна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, отдел иммунофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН, г. Томск.

Трофимова Евгения Сергеевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, отдел иммунофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН, г. Томск.

Шерстобоев Евгений Юрьевич, д-р мед. наук, зав. отделом иммунофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН, г. Томск.

Жданов Вадим Вадимович, д-р мед. наук, профессор, директор НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН, г. Томск.

Белоусов Михаил Валерьевич, д-р фарм. наук, зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск.

(✉) **Кривощеков Сергей Владимирович**, e-mail: chrom@tpu.ru.

УДК 615.322.012:582.521.43.088.1:615.37
DOI 10.20538/1682-0363-2017-3-5–15
For citation: Adekenov S.M., Danilets M.G., Ivasenko S.A., Nikiforov L.A., Krivoshchekov S.V., Ligacheva A.A., Trofimova E.S., Sherstoboev E.Yu., Zhdanov V.V., Belousov M.V. Phenolic compounds of *Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L. and *Lemna polyrrhiza* L. *Schleiden* and their immunomodulating activity. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (3): 5–15

Phenolic compounds of ethanol extracts of *Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L. and *Lemna polyrrhiza* L. Schleid and their immunomodulating activity

Adekenov S.M.[4], Danilets M.G.[2], Ivasenko S.A.[4], Nikiforov L.A.[1], Krivoshchekov S.V.[1,3], Ligacheva A.A.[2], Trofimova E.S.[2], Sherstoboev E.Yu.[2], Zhdanov V.V.[2], Belousov M.V.[1]

[1] *Scientific and Production Holding "Phytochemistry"*
4, M. Gazalieva Str., Karaganda, 100009, Republic of Kazakhstan

[2] *Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (GRIPRM), Tomsk NRMC, RAN*
3, Lenin Av., Tomsk, 634028, Russian Federation

[3] *National Research Tomsk Polytechnic University (NR TPU)*
30, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

[4] *Siberian State Medical University*
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

The purpose of the study is to determine the composition of the phenolic compounds of ethanol extracts isolated from three species of duckweed: *Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L. and *Lemna polyrrhiza* L. (the synonym is *Spirodella polyrrhiza* Schleid.) and to study its effect on immune system activation.

Materials and methods. The objects of the study are: air-dried grass samples of *Lemna minor* L., *Lemna trisuica* L. and *Lemna polyrrhiza* L. collected during their growing season in 2010–2011 in low-flow and stagnant ponds of Kozhevnikovsky and Tomsk districts of Tomsk region. Isolation of polyphenolic complexes (PFC) was carried out by extraction of air-dried raw material with ethyl alcohol. In qualitative and quantitative analysis of the samples studied the method of reversed-phase high-performance liquid chromatography on an Agilent 1100 Series instrument (USA) was used in isocratic mode. In the experiments, 200 male C57BL / 6 and BALB / C mice aged 8–12 weeks were used to determine immunomodulatory activity. Cell proliferation was assessed by a colorimetric method. The absorption of the obtained solutions was measured with a multi-channel spectrophotometer at the wavelength of 540 nm. The determination of antibody-forming cells in the spleen was performed by local hemolysis. The titer of antibodies in serum was evaluated in the hemagglutination reaction. The local hypersensitivity reaction of immediate type was assessed by the author's modification.

Results. For the first time the study of the qualitative composition and quantitative content of PFC of Lemna minor L. (LM) , Lemna trisulca L. (LT) trisulkas, and *Lemna polyrrhiza* L. (LP) : (4,7 ± 0,4)%, (3,3 ± 0,3)%, (12,8 ± 0,7)% was carried out. The highest content of phenolic acids (10,76%) and the sum of flavonoids, isoflavonoids and coumarins (14,7%) were found in the LP sample. The content of chlorogenic and 3,5-dihydroxybenzoic acids was 2–9 times higher in LP than in other species of duckweed. In LM and LT with concentrations of 5 μg/ml and LP in the range of 0,5–160 μg/ml did not have a toxic effect on antigen presenting cells. When incubated with LT (20 μg/ml), the proliferation of macrophages was reduced by 1,2 times, and when incubated with LM and LT (80 μg/ml), by 1,2 and 1,8 times, respectively. PFC duckweed (LP) did not have a similar effect. LM and LP had a stimulating effect on the production of nitrites in the concentrations of 5 and 20 μg/ml, increasing it by 1,3–1,6 times. Course introduction of LT and LP led to a significant decrease in the number of antibody-forming cells by 1,5 and 2,3 times and a decrease in the local hypersensitivity reaction by 1,9 and 1,5 times, respectively.

Key words: polyphenol complex, duckweed, *Lemna*, nitric oxide, macrophages, Th-2.

REFERENCES

1. Markov A. Travnik. Zolotye recepty narodnoy mediciny [Herbalist. Golden recipes of traditional medicine]. M.: Eksmo-Forum Publ., 2007: 928 (in Russian).
2. Nikiforov L.A., Fursa N.S., Krivoshchekov S.V., Kurkin V.A., Belousov M.V. Sravnitel'noe issledovanie veshhestv pervichnogo obmena rjaski maloj (*Lemna minor* L.), rjaski trojchatoj (*Lemna trisulca* L.) i mnogokorennika obyknovennogo (*Spirodella polyrrhiza* L. Schleid.) [Comparative study of compounds of primary exchange duckweed (*Lemna minor* L.), trisulki duckweed (*Lemna trisulca* L.) and spirodela (*Spirodella polyrrhiza* L. Schleid.)] // *Bjulleten' sibirskoj mediciny – Bulletin of Siberian Medicine*. 2017;16 (1): 59–64 (in Russian).
3. Schepetkin I.A., Ramstead A.G., Kirpotina L.N., Voyich J.M., Jutila M.A., Quinn M.T. Therapeutic Potential of Polyphenols from Epilobium Angustifolium (Fireweed) // *Phytotherapy Research: PTR*. 2016; 30 (8): 1287–1297.
4. Williamson G., Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies // *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 81 (1 Suppl): 243S–255S.
5. Wang F., Xue Y., Yang J., Lin F., Sun Y., Li T., Wu C. Hepatoprotective effect of apple polyphenols against concanavalin A-induced immunological liver injury in mice // *Chemico-biological Interactions*. 2016; 258:159–165.
6. Gilyazova A.V. et.al. Sravnitel'nyj analiz aktivnosti rastitel'nyh fenolov po ingibirovaniju VICh-infekcii v T-limfoblastoidnoj kletochnoj linii i mononuklearah perifericheskoj krovi [Comparative analysis of the activity plant polyphenols on the inhibition of HIV-infection in the T-lymphoblastoid cell line and peripheral blood mononuclear cells] // *Immunologija – Immunology*. 2011; (1)32: 4–6 (in Russian).

7. Sadowska B., Micota B., Ryżalski M., Redzynia M., Ryżalski M. The immunomodulatory potential of Leonurus cardiaca extract in relation to endothelial cells and platelets // *Innate Immunity*. 2017; 23 (3): 285–295.
8. Shukshina O.G. et.al. Vlijanie rastitel'nyh fenol'nyh kompleksov na funkcional'nuju aktivnost' immunokompetentnyh kletok in vitro [Influence of vegetative polyphenolic complexes on the functional activity of immunocompetent cells *in vitro*] // *Immunologija – Immunology*. 2014; 3 (35): 138–142 (in Russian).
9. Lee N., Shin M.S., Kang Y., Park K., Maeda T., Nishioka H., Fujii H., Kang I. Oligonol, a lychee fruit-derived low-molecular form of polyphenol mixture, suppresses inflammatory cytokine production from human monocytes // *Human Immunology*. 2016; 77 (6): 512–515.
10. Williams A.R., Klaver E.J., Laan L.C., Ramsay A., Fryganas C., Difborg R., Kringel H., Reed J.D., Mueller-Harvey I., Skov S., van Die I., Thamsborg S.M. Co-operative suppression of inflammatory responses in human dendritic cells by plant proanthocyanidins and products from the parasitic nematode *Trichuris suis* // *Immunology*. 2017; 150 (3): 312–328.
11. Huang R.Y., Yu Y.L., Cheng W.C., OuYang C.N., Fu E., Chu C.L. Immunosuppressive effect of quercetin on dendritic cell activation and function // *Journal of Immunology*. 2010; 184 (12): 6815–6821.
12. Pérez-Cano F.J., Castell M. Flavonoids, Inflammation and Immune System // *Nutrients*. 2016; 8 (10): 65.
13. Pogodin I.S., Luksha E.A. , Nurmukhametova K.A., Adekenov S.M., Ivasenko S.A. . Fitohimicheskoe issledovanie nadzemnoj chasti sossjurei gor'koj (*Saussurea amara* L.) [Phytochemical study of the aerial part of *Saussurea amara* L.] // *Omskij nauchnyj vestnik*. 2010; 1(194):115–118 (in Russian).
14. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrite in biological fluids // *Anal. Biochem*. 1982; 126: 131–143.
15. Munder M., Eichmann K., Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype // *J. Immunol*. 1998;(11)160: 5347–5354.
16. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv. Ch.1 [A guide to preclinical drug research. Part 1]. M.: Grif i K. Publ., 2013: 64–79 (in Russian).
17. Emelianenko IN, Dushkin VA Harakteristika obshhej anafilaksii [Characteristics of general anaphylaxis] // *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. 1971; 10: 69–71 (in Russian).
18. Laria A., Lurati A., Marrazza M., Mazzocchi D., Re K.A., Scarpellini M. The macrophages in rheumatic diseases // *J. Inflamm. Res*. 2016; 9: 1–11.
19. Kreider T., Anthony R.M., Urban J.F. Jr., Gause W.C. Alternatively activated macrophages in helminth infections // *Curr. Opin. Immunol*. 2007; 19: 448–453.

Received May 26.2017
Accepted June 30.2017

Adekenov Sergazy M., DChSc, Professor, Academician of the National Academy of Sciences, Director of the MNPH "Phytochemistry", Karaganda, Kazachstan.

Danilets Marina G., DBSc, Head of the Department of Experimental Biological Models of Immunopharmacology, GRIPRM, Tomsk NIMC, RAN, Tomsk, Russian Federation.

Ivasenko Svetlana A., PhD, Senior Researcher, Terpenoids Chemistry Laboratory of the MNPH "Phytochemistry", Karaganda, Kazachstan.

Nikiforov Leonid A., Assistant, Department of Pharmaceutical Analysis, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Krivoshchekov Sergey V., Junior Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University; Engineer National Research, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

Ligacheva Anastasija A., PhD, Researcher, Department of Immunopharmacology, GRIPRM, Tomsk NIMC, RAN, Tomsk, Russian Federation.

Trofimova Evgenija S., PhD, Senior Researcher, Department of Immunopharmacology, GRIPRM, Tomsk NIMC, RAN, Tomsk, Russian Federation.

Sherstoboev Evgeny Yu., DM, Head of the Department of Immunopharmacology, GRIPRM, Tomsk NIMC, RAN, Tomsk, Russian Federation.

Zhdanov Vadim V., DM, Professor, Director of the GRIPRM, Tomsk NIMC, RAN, Tomsk, Russian Federation.

Belousov Mikhail V., DPhSc, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Analysis, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Krivoshchekov Sergey V.**, e-mail: chrom@tpu.ru.