

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Иванушко Л.А.¹, Соловьева Т.Ф.²,
Запорожец Т.С.¹, Лукьянов П.А.²,
Горбач В.И.², Беседнова Н.Н.¹

¹ ГУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН

² Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, г. Владивосток

Резюме. Проведено сравнительное изучение иммуномодулирующих свойств высокомолекулярного хитозана (Х-ВМ) и его производных: низкомолекулярного хитозана (Х-НМ), N-3-гидроксимиристоил-Х-НМ, N-3-гидроксимиристоилхитоолигосахаридов (N-ацилхитобиозы, -хитотриозы, -хитотетраозы), карбоксиметилхитозана, карбоксиэтилхитозана, карбоксипропилхитозана. Установлено, что химическая модификация хитозана влияет на его биологическую активность. Синтезированные производные хитозана имеют улучшенные физико-химические свойства (хорошая растворимость в нейтральных и щелочных растворах, низкая вязкость в кислых растворах, хорошая всасываемость из желудочно-кишечного тракта) по сравнению с исходным высокомолекулярным хитозаном, обладают иммуномодулирующими свойствами и являются перспективными веществами для создания лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище (БАДов).

Ключевые слова: хитозан, иммуномодуляторы.

Ivanushko L.A., Solovyeva T.F., Zaporozhets T.S., Lukyanov P.A., Gorbach V.I., Besednova N.N.

COMPARATIVE STUDIES OF IMMUNOMODULATING PROPERTIES OF CHITOSAN AND ITS DERIVATIVES

Abstract. Comparative study was carried out, aiming to assess immunostimulatory properties of high-molecular chitosan (Ch-HM) and its derivatives, i.e., low molecular weight chitosan (Ch-LM), N-3-hydroxymyristoyl (Ch-LM) at a low acylation ratio, N-3-hydroxymyristoylchitoooligosaccharides (N-acylchito-biose, -triose, -tetraose), N-, O-carboxyalkylchitosans (carboxymethyl, -ethyl, -propyl derivatives). It was established, that the chemical modifications of chitosan influenced its biological activity. The derivatives of chitosan were found to have improved physical properties (good solubility in neutral and alkaline solutions, low viscosity in acidic solutions, good absorption from a gastrointestinal compartment), as compared with initial (high molecular weight) chitosan formula. They possess immunomodulatory properties and may be regarded as promising substances for preparation of medical drugs and biologically active food additives (BAFA). (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 397-404)

Адрес для переписки:

Иванушко Людмила Александровна
690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1.
Тел.: (4232) 44-24-46, 41-51-86.
Факс: (4232) 44-11-47.
E-mail: niem_@mail.ru

Введение

В настоящее время продолжает оставаться актуальным поиск новых высокоэффективных малотоксичных биологически активных препаратов из доступных природных источников. Перспективными в этом смысле веществами

являются полисахариды и углеводсодержащие биополимеры растительного и животного происхождения, которые благодаря способности к многоточечному взаимодействию с поверхностью клеток могут обеспечивать выраженную стимуляцию различных этапов иммуногенеза [1]. В связи с этим поликатионные и полианионные полисахариды, широко представленные в морских водорослях и ракообразных, могут рассматриваться как потенциальные иммуномодуляторы.

Среди полимеров природного происхождения хитин и хитозан, благодаря своим уникальным свойствам, привлекают внимание большого числа специалистов самых разных специальностей [2, 3, 9]. Хитозан – поликатионный линейный полисахарид, полимерная цепь которого состоит из β -1,4-связанных остатков D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина, широко используется в медицинских целях и в ветеринарии, поэтому его фармакологические свойства и, в частности, влияние на клетки иммунной системы, изучены достаточно подробно. Возросший интерес к хитину и хитозану объясняется их выраженной биологической активностью (противомикробной, противоопухолевой, противовоспалительной, иммуномодулирующей и др.) [8, 11]. Однако некоторые физико-химические свойства хитозана, такие, как нерастворимость и высокая вязкость в нейтральных и щелочных водных растворах, плохая всасываемость из желудочно-кишечного тракта ограничивают его применение в медицине, что диктует необходимость поиска производных хитозана, лишенных этих недостатков. Наиболее перспективными являются хитозаны, низкой молекулярной массы и хитоолигосахариды, получаемые химической или ферментативной деградацией исходного продукта. Другим методом изменения свойств хитозана является регуляция количества свободных аминогрупп в молекуле путем избирательного ацилирования части из них [8]. Введение ацильных групп увеличивает гидрофобность молекулы хитозана и может влиять на его взаимодействие с мембранами клеток-мишеней. Среди анионных (или цвиттерионных) производных хитозана наиболее изучены сульфатированные хитозаны, которые интересны, прежде всего, из-за их антивирусной и антикоагулянтной активности, и в меньшей степени – карбоксиалкилхитозаны.

Иммуномодулирующая активность карбоксиэтил- и карбоксипропилхитозанов, которые наряду с карбоксиметилхитозаном были синтезированы и изучены в данной работе, ранее не исследовалась.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение иммуномодулирующей активности хитозана и его производных.

Материалы и методы

В работе использовали хитозан и его производные: исходный высокомолекулярный хитозан (Х-ВМ), низкомолекулярный хитозан (Х-НМ), N-ацилхитобиоза (I), N-ацилхитотриоза (II), N-ацилхитотетраоза (III), N-ацилированный низкомолекулярный хитозан (IV) карбоксиметилхитозан (КМ), карбоксиэтилхитозан (КЭ), карбоксипропилхитозан (КП).

Для получения хитозана (Х-ВМ) нами был использован мягкий метод N-деацетилирования коммерческого хитина с применением в качестве реагента смеси водной щелочи (40% NaOH) с изопропиловым спиртом (1/16 v/v). Реакционную смесь кипятили 7 часов, осадок отфильтровали, растворили в воде (рН 5,0), подкисленной соляной кислотой, и лиофильно высушили. В результате с выходом 75,5% был получен хитозан с молекулярной массой 130 kDa и степенью N-ацетилирования 1,7%.

Хитоолигосахариды (биоза, триоза, тетраоза) были получены кислотным гидролизом хитозана с концентрированной соляной кислотой с последующим разделением на ионообменной смоле Amberlite CG-120 (MCW, США). Хитозан низкой молекулярной массы (4–5 kDa) (Х-НМ) получали деполимеризацией высокомолекулярного хитозана с 2,5% перекисью водорода (48 ч, 37°C). Хитоолигосахариды и хитозан низкой молекулярной массы были ацилированы N-гидроксисукцинимидным эфиром 3-гидрокситетрадекановой кислоты в смеси растворителей вода – N,N-диметилформамид. В результате были получены их производные, содержащие в составе один остаток жирной кислоты на молекулу олиго- и полисахарида. N- и 6-O-карбоксиалкил (метил, этил, пропил)-хитозаны были синтезированы алкилированием хитозана в щелочной среде омега-галогенпроизводными уксусной, пропионовой и бутановой кислот. Степень замещения амино- и гидроксигрупп в молекуле хитозана составила $65 \pm 5\%$ для всех карбоксиалкил-производных. Эти цвиттерионные производные отличаются от исходного хитозана зарядом и хорошей растворимостью в воде при нейтральных и основных рН.

Эксперименты выполнены на неинбредных мышах и мышах линии СВА(C57xBlac)F1 массой 16–18 г, находящихся на стандартной диете в боксированных помещениях, с соблюдением всех правил и рекомендаций Европейской

конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах. Гуморальный иммунный ответ оценивали по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей на 4 сутки после иммунизации мышей эритроцитами барана (ЭБ) [12] и титрам гемагглютининов и гемолизина в сыворотке крови иммунизированных животных. В качестве показателя клеточного иммунного ответа использовали реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [13]. Для оценки влияния производных хитозана на функциональную активность фагоцитирующих клеток использовали нейтрофилы (Нф), полученные из перитонеальной полости мышей через 4 часа после внутрибрюшинной инъекции 1 мл стерильного 1% раствора пептона. В модельной системе *in vitro* исследуемые вещества добавляли к клеточной взвеси и инкубировали 30 мин при 37°C в концентрации 100 мкг/мл. Адгезивные свойства Нф оценивали спектрофотометрическим методом [7], способность к продукции активных форм кислорода (АФК) определяли с помощью теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) [7]. Результаты выражали в виде индекса стимуляции: $ИС = \frac{ОП_о}{ОП_к} \times 100\%$, где ИС – индекс стимуляции, ОП_о – оптическая плотность показателей опытной группы, ОП_к – оптическая плотность показателей контрольной группы. Фагоцитарную активность Нф оценивали, используя фагоцитарный показатель (ФП – процент клеток, участвующих в процессе поглощения) и фагоцитарное число (ФЧ – число объектов фагоцитоза (частицы латекса), поглощенных одним нейтрофилом) [7]. Концентрацию ци-

токинов в супернатантах клеток цельной крови измеряли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем «Протеиновый контур» (IL-8, IFN γ , IL-4, IL-2) и «Цитокин» (TNF α , IL-1 α) [4, 10]. При исследовании спонтанного синтеза цитокинов исследуемые образцы добавляли в кровь интактных доноров в конечной концентрации 100 мкг/мл. Синтез IL-1 α и IL-8 индуцировали липополисахаридом (ЛПС) *E. coli* («Sigma») 10 мкг/мл в течение 24 часов, TNF α – в течение 48 часов. Синтез IL-4, IL-10 индуцировали конканавалином (Кона) («Serva») 10 мкг/мл в течение 24 часов, IFN γ – 10 мкг/мл 72 часа. Костимулирующее влияние исследуемых биополимеров изучали при их совместном действии с Кона и ЛПС. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂, после чего отбирали супернатанты и определяли концентрацию цитокинов.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ «Statistica-5» и «Excel». Использовались следующие методы статистического анализа: проверка нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений [5], проверка равенства генеральных дисперсий, t-критерий Стьюдента (при нормальном распределении количественных признаков), непараметрический критерий W Вилкоксона (при ненормальном распределении количественных признаков). Выборочные параметры, приводимые далее в таблицах, имеют следующие обозначения: средняя арифметическая (M), средняя ошибка средней арифметической (m), объем анализируемой подгруп-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА ГУМОРАЛЬНЫЙ И КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

Группа	АОК/ селезенку	p	ГА (log ₂ T)	p	ГЛ (log ₂ T)	p	ГЗТ лапки	p
Контроль	34050±1015		5,1±0,3		4,3±0,2		36,5±2,6	
X-ВМ	52546±978	0,000	7,2±0,4	0,000	6,3±0,3	0,000	40,3±4,0	0,448
X-НМ	53672±1401	0,000	7,2±0,4	0,000	6,3±0,3	0,000	44,9±3,6	0,085
IV	58464±1320	0,000	6,7±0,3	0,002	6,7±0,4	0,000	47,1±6	0,016
I	42455±1405	0,000	5,8±0,1	0,042	5,5±0,3	0,004	38,8±3,5	0,533
II	45579±1204	0,000	5,9±0,2	0,042	5,2±0,1	0,000	39,6±3,2	0,468
III	48289±1103	0,000	6,2±0,4	0,043	5,0±0,2	0,025	39,3±3,3	0,523
KM	34174±1125	0,936	5,2±0,4	0,844	4,1±0,1	0,384	26,7±2,5	0,022
КЭ	33650±1022	0,932	5,1±0,2	1,0	4,4±0,3	0,785	28,9±2,0	0,043
КП	68440±1420	0,000	11,4±0,5	0,000	10,7±0,7	0,000	26,2±3,5	0,0,4

Примечания: p – значимость различий по сравнению с контрольными показателями (интактные мыши); n = 9.

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ПОЛОСТИ МЫШЕЙ

Исследуемые вещества	ФП, %	р	ФЧ	р	НСТ-тест, %	р	Адгезивная активность, %	р
X-ВМ	85,7±4,3	0,004	4,2±0,1	0,00	179,2±9,2	0,00	112,4±3,7	0,284
X-НМ	84,7±4,1	0,005	5,4±0,4	0,00	289,7±15,2	0,00	155,3±9,1	0,000
IV	86,7±4,1	0,002	4,8±0,4	0,00	264,5±9,6	0,00	132,5±8,1	0,094
I	78±4,9	0,09	4,9±0,2	0,00	231±12,3	0,00	103,6±5,3	0,762
II	84±4,9	0,012	4,7±0,1	0,00	235,7±12,8	0,00	110±6,4	0,429
III	79,5±5,1	0,064	5,0±0,3	0,00	250,1±10,4	0,00	96,4±3,0	0,744
КМ	82,7±3,4	0,004	4,3±0,3	0,00	153,9±9,5	0,00	103,6±5,1	0,761
КЭ	80±1,8	0,001	3,8±0,2	0,00	152,8±11,3	0,00	99,1±5,9	0,935
КП	90,7±4,0	0,000	4,7±0,8	0,00	152,7±10,5	0,00	128,2±9,9	0,000
Контроль	68±2,1		2,76±0,01		100		100	

Примечания: р – значимость различий по сравнению с контрольными показателями (интактные мыши); n = 6.

пы (n), р – достигнутый уровень значимости. Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%.

Результаты

При исследовании влияния хитозана и его производных на гуморальный иммунный ответ было установлено, что X-ВМ значимо увеличивал количество АОК в селезенках и повышал титры гемагглютининов и гемолизинов в сыворотке крови иммунизированных ЭБ мышей по сравнению с таковыми у животных контрольной группы (интактных) (табл. 1). Демполимеризованный хитозан (X-НМ), имеющий значительно лучшую растворимость в водных растворах в сравнении с исходным хитозаном, сохранял способность к стимуляции гуморального иммунитета, сравнимую с таковой у X-ВМ (р = 1,0). Ацилирование низкомолекулярного хитозана (производное IV) не влияло на его способность стимулировать гуморальный иммунитет (р = 1). Способность к стимуляции гуморального иммунитета у N-ацилированных хитоолигосахаридов (биозы – I, триозы – II, тетраозы – III), превышающая таковую у интактных мышей, снижалась по сравнению с X-НМ и X-ВМ. Среди анионных производных выраженная способность к продукции АОК и синтезу антител, превышающая таковую у всех исследованных образцов хитозана, выявлена у карбоксипропилхитозана. КМ- и КЭ-хитозаны адьювантную активность не проявляли (табл. 1).

При изучении влияния хитозана и его производных на клеточный иммунитет (табл. 1)

были установлены следующие закономерности: X-ВМ значимо не изменял интенсивность реакции ГЗТ по сравнению с таковой у животных контрольной группы (интактных). Демполимеризация хитозана (X-НМ) не вызывала изменений в его способности к стимуляции клеточного иммунитета (р = 0,415). Ацилирование низкомолекулярного хитозана (производное IV) приводило к появлению стимулирующей активности в отношении клеточного иммунитета (р = 0,016). Ацилированные хитоолигосахариды (I, II, III) не изменяли интенсивность реакции ГЗТ по сравнению с таковой у животных контрольной группы (интактных). Карбоксиалкилхитозаны снижали интенсивность реакции ГЗТ (р = 0,022; р = 0,043 и р = 0,04 соответственно). Исходный хитозан (X-ВМ) значимо увеличивал функциональную активность нейтрофилов (фагоцитоз и бактерицидные свойства) по сравнению с таковой у животных контрольной группы (интактных) (табл. 2). X-НМ сохранял способность к стимуляции фагоцитарной активности Нф, сравнимую с таковой у X-ВМ. Способность X-НМ стимулировать адгезию Нф на пластик и продукцию АФК усиливалась по сравнению с высокомолекулярным хитозаном (р = 0,000 и р = 0,000 соответственно). Ацилирование низкомолекулярного хитозана (производное IV) не изменяло его способности к стимуляции функциональной активности нейтрофилов (ФП: р = 0,868; ФЧ: р = 0,705; НСТ-тест: р = 0,178; адгезивная активность: р = 0,078). Способность к стимуляции фагоцитарной активности нейтрофилов у ацилиро-

ванных хитоолигосахаридов (производные I, II, III) сохранялась по сравнению с таковой у ацилированного низкомолекулярного хитозана (ФП: $p = 0,190$; $p = 0,678$; $p = 0,286$; ФЧ: $p = 0,826$; $p = 0,807$; $p = 0,701$; НСТ-тест: $p = 0,05$; $p = 0,09$; $p = 0,322$), адгезивная активность производных снижалась до уровня интактного контроля ($p = 0,008$; $p = 0,4$; $p = 0,000$). Введение карбоксилкильных заместителей в хитозан не вызывало значимого изменения способности биополимера к стимуляции функциональной активности нейтрофилов (ФП: $p = 0,62$; $p = 0,23$; $p = 0,406$; ФЧ: $p = 0,75$; $p = 0,09$; $p = 0,54$; НСТ-тест: $p = 0,07$; $p = 0,08$; $p = 0,07$; адгезивная активность: $p = 0,18$; $p = 0,07$; $p = 0,152$ соответственно для КМ, КЭ, КП).

При изучении цитокинулирующих свойств хитозана и его производных была установлена способность X-ВМ усиливать спонтанную и стимулированную митогенами продукцию TNF α , IL-1 α и IL-8 клетками крови доноров (табл. 3). Демонстрируемый хитозан низкой молекулярной массы (X-НМ) сохранял способность к стимуляции провоспалительных цитокинов, сравнимую с таковой у исходного хитозана. Ацилирование низкомолекулярного хитозана не обеспечивало значимого изменения способности к стимуляции продукции TNF α , IL-1 α и IL-8 клетками периферической крови (спонтанная продукция: $p = 0,08$; $0,06$; $0,45$ соответственно; стимулированная продукция: $p = 0,72$; $0,167$; $0,333$ соответственно). При внесении в культуру клеток крови карбоксипропилхитозана его способность к усилению продукции провоспалительных цитокинов была сопоставима с таковой у X-ВМ (спонтанная продукция: $p = 0,14$; $0,313$; $0,267$ соответственно; стимулированная митогенами продукция: $p = 0,278$; $1,0$; $0,276$ соответственно).

В то же время все исследуемые образцы хитозана, за исключением карбоксипропилхитозана (КП), не изменяли способность клеток периферической крови к спонтанной продукции провоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов (табл. 3). Карбоксипропилхитозан значительно стимулировал спонтанную продукцию IL-10 ($p = 0,032$). Высокомолекулярный (исходный) хитозан (X-ВМ) и деполи-

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ

Цитокин	Спонтанная продукция цитокинов, пг/мл			Стимулированная продукция цитокинов, пг/мл		
	(X-ВМ)	(X-НМ)	(IV)	(X-ВМ)	(X-НМ)	(IV)
TNF	7,8 \pm 2,9 33,9 \pm 11,9 $p < 0,046$ (W)	7,4 \pm 2,6 30,5 \pm 8,5 $p = 0,042$ (W)	4,9 \pm 0,5 13,3 \pm 3,1 $p = 0,04$	217,7 \pm 12,7 259,5 \pm 8,3 $p = 0,031$	217,7 \pm 12,7 248,0 \pm 4,2 $p = 0,04$	217,7 \pm 12,7 253,7 \pm 15,54 $p = 0,019$
IL-1 α	0,067 \pm 0,03 0,3 \pm 0,08 $p = 0,013$	0,067 \pm 0,03 0,46 \pm 0,1 $p = 0,016$	0,067 \pm 0,03 0,22 \pm 0,06 $p = 0,014$	0,41 \pm 0,06 1,41 \pm 0,38 $p = 0,022$	0,41 \pm 0,06 1,08 \pm 0,26 $p = 0,019$	0,41 \pm 0,06 1,41 \pm 0,08 $p = 0,019$
IL-8	0,66 \pm 0,31 2,6 \pm 0,23 $p = 0,000$	0,66 \pm 0,31 1,97 \pm 0,17 $p = 0,003$	0,66 \pm 0,31 1,56 \pm 0,5 $p = 0,032$	2,6 \pm 0,3 3,1 \pm 0,12 $p = 0,05$	2,6 \pm 0,3 3,2 \pm 0,1 $p = 0,046$	2,6 \pm 0,3 3,02 \pm 0,15 $p = 0,051$
IL-4	48,44 \pm 5,7 42,2 \pm 4,8 $p = 0,312$	48,44 \pm 5,7 45,5 \pm 4,3 $p = 0,565$	48,44 \pm 5,7 42,6 \pm 4,0 $p = 0,363$	52,21 \pm 7,9 48,37 \pm 7,3 $p = 0,591$	52,21 \pm 7,9 45,63 \pm 6,8 $p = 0,367$	52,21 \pm 7,9 48,95 \pm 4,0 $p = 0,671$
IL-10	1,81 \pm 0,9 1,98 \pm 0,76 $p = 0,911$	1,81 \pm 0,9 2,37 \pm 1,1 $p = 0,75$	1,81 \pm 0,9 1,22 \pm 0,6 $p = 0,677$	184,6 \pm 16,23 49,9 \pm 20,22 $p = 0,000$	184,6 \pm 16,23 96,69 \pm 29,59 $p = 0,014$	184,6 \pm 16,23 149,5 \pm 24,11 $p = 0,131$
IFN γ	62,72 \pm 6,4 81,46 \pm 10,09 $p = 0,040$	60,62 \pm 5,96 79,14 \pm 5,46 $p = 0,042$	58,77 \pm 6,5 82,82 \pm 11,4 $p = 0,049$	72,79 \pm 8,2 84,4 \pm 9,4 $p = 0,097$	75,4 \pm 7,6 74,86 \pm 12,46 $p = 0,964$	72,79 \pm 8,2 96,4 \pm 17,49 $p = 0,150$

меризованный хитозан низкой молекулярной массы (X-НМ) снижали стимулированную митогенами продукцию противовоспалительных цитокинов клетками периферической крови.

Все исследуемые образцы хитозанов стимулировали продукцию $IFN\gamma$ – основного маркера субпопуляции Th1, ответственного за развитие клеточного иммунитета, а также резко усиливающего эффекторные функции макрофагов и естественных киллеров, их антимикробную и цитотоксическую активность.

Обсуждение

Проведенные в настоящей работе исследования показали, что синтезированные производные хитозана: низкомолекулярный хитозан, ацилированный низкомолекулярный хитозан, хитоолигосахариды, карбоксипропилхитозан, которые отличаются от исходного хитозана по молекулярному весу, степени гидрофобности и заряду, сохраняют такие его свойства, как адьювантная активность, способность стимулировать функциональную активность нейтрофилов и синтез провоспалительных цитокинов. Карбоксиметил- и карбоксиэтилхитозаны адьювантную активность не проявляли. В то же время между изучаемыми соединениями были обнаружены заметные различия в их иммуномодулирующей активности. Так, ацилированные хитозаны слабо повышали способность нейтрофилов прилипать к пластику, в то время как карбоксиалкилпроизводные заметно увеличивали их адгезивные свойства. Синтез активных форм кислорода в НФ более активно стимулировали X-НМ и его N-ацилированные производные по сравнению с X-ВМ и карбоксиалкилхитозанами. Исходный хитозан и остальные его низкомолекулярные производные не оказывали влияния на клеточный иммунитет, в то же время ацилированный низкомолекулярный хитозан вызывал его стимуляцию, а все карбоксиалкилпроизводные хитозана значительно снижали интенсивность реакции ГЗТ.

Проведенные в настоящей работе исследования показали, что синтезированные производные хитозана: низкомолекулярный хитозан, ацилированный низкомолекулярный хитозан, хитобиоза, хитотриоза, хитотетраоза, а также карбоксипропилхитозан, сохраняют адьювантную активность, способность стимулировать функциональную активность нейтрофилов (фагоцитоз, продукцию АФК) и синтез провоспалительных цитокинов, которые проявляет исходный высокомолекулярный хитозан.

Карбоксиметил- и карбоксиэтилхитозаны адьювантную активность не проявляли. Однако не отмечено четкой зависимости между структурой молекул изучаемых соединений и их способностью влиять на бактерицидную и адгезивную активность нейтрофилов: ацилированные хитозаны слабо повышают способность прилипать к пластику, в то время как карбоксиалкилпроизводные заметно увеличивают адгезивные свойства нейтрофилов. Синтез активных форм кислорода в НФ более активно стимулировали X-НМ и его N-ацилированные производные по сравнению с X-ВМ и карбоксиалкилхитозанами.

Все карбоксиалкилпроизводные хитозана значительно снижали интенсивность реакции ГЗТ. Ацилированный низкомолекулярный хитозан вызывал стимуляцию клеточного иммунитета. Исходный хитозан и остальные его низкомолекулярные производные не оказывали влияния на клеточный иммунитет.

Хитозан и все его производные увеличивали спонтанную продукцию провоспалительных цитокинов $TNF\alpha$, $IL-1\alpha$ и $IL-8$ клетками периферической крови. В активированных клетках с высоким уровнем цитокинов после стимуляции хитозанами продукция $TNF\alpha$ и $IL-8$ не изменялась или слабо возрастала, а $IL-1\alpha$ заметно увеличивалась. Значимых различий между исследованными производными хитозанами по способности стимулировать синтез провоспалительных цитокинов обнаружено не было. Повышенная продукция провоспалительных цитокинов может быть механизмом, который определяет влияние хитозана и его производных на развитие воспалительной реакции на ранних этапах инфекционного процесса, вызывает эффекты, показанные нами (стимуляцию способности Нф к адгезии на пластик, усиление фагоцитоза и продукции супероксидных радикалов фагоцитами), а также может способствовать стимуляции экспрессии молекул адгезии, выходу Нф в воспалительный очаг, активации Мф и НК, усилению синтеза $IFN\gamma$ НК-клетками.

Все исследуемые образцы производных хитозана не изменяли способность клеток периферической крови к спонтанной и стимулированной продукции противовоспалительного цитокина $IL-4$. Синтез другого противовоспалительного цитокина, $IL-10$, по разному регулировался различными производными хитозана. X-ВМ и деполимеризованный X-НМ снижали стимулированную митогенами и не влияли на спонтанную продукцию $IL-10$ клетками пе-

риферической крови. Ацилированный низкомолекулярный хитозан не влиял на спонтанную и стимулированную продукцию этого цитокина. В то же время карбоксипропильное производное хитозана, в отличие от нативного полимера, стимулировал продукцию IL-10 клетками крови. Как известно, IL-10 усиливает пролиферацию В-клеток и Ig-секрецию и является супрессорным фактором для Th1-зависимого иммунного ответа [6]. В этой связи способность карбоксипропилхитозана резко увеличивать спонтанную продукцию IL-10 может быть обусловлена его способностью стимулировать гуморальный и угнетать клеточный иммунный ответ в экспериментальной системе *in vivo*. Эти свойства карбоксипропилхитозана создают предпосылки для изучения этого соединения в качестве противовоспалительного средства.

Хитозан и его производные повышали спонтанную, но не стимулированную продукцию $IFN\gamma$ – основного маркера субпопуляции Th1, ответственного за развитие клеточного иммунитета, а также резко усиливающего эффекторные функции макрофагов и естественных киллеров, их антимикробную и цитотоксическую активность.

Таким образом, производные хитозана проявляют свойства мультицитокиновых индукторов, оказывая влияние на продукцию цитокинов, вырабатываемых преимущественно Th1 ($IFN\gamma$), Th2 (IL-10) и мононуклеарными фагоцитами ($TNF\alpha$, IL-1 α) в культуре клеток цельной крови. Модулирующее действие исследованных производных на продукцию цитокинов зависит от исходного уровня тестируемого цитокина, а в случае IL-10 – и от структуры хитозана.

В отличие от X-ВМ, который плохо растворим в нейтральных и щелочных средах, а в кислых образует вязкие растворы, низкомолекулярные и анионные его производные имеют низкую вязкость и хорошую растворимость в водных средах при физиологических значениях pH. Гидрофобное производное хитозана (X-НМ) также хорошо растворимо в водных средах, в отличие от описанных в литературе ацилированных хитозанов, так как имеет небольшую молекулярную массу и низкую степень замещения аминогрупп остатками жирной кислоты.

Таким образом, исследованные образцы производных хитозана, которые имеют улучшенные физико-химические свойства по сравнению с исходным высокомолекулярным хитозаном, обладают иммуномодулирующими свойствами

и являются перспективными веществами для создания лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище.

Работа выполнена в рамках интеграционных проектов СО РАМН-ДВО РАН №№ 05-П-СМ-05-005, 06-П-СМ-05-004.

Список литературы

1. Еляков Г.Б., Козловская Э.П., Рассказов В.А. и др. Биологически активные добавки и лекарственные препараты на основе природных соединений из океанического растительного и марикультурного сырья / Новейшие технологии в системе интегральных процессов территорий стран АТР: Сб. инвестиционных предложений I Международного инвестиционного конгресса территорий стран АТР. – Владивосток. Дальневосточная государственная морская академия, 2000. – С. 276.
2. Давыдова В.Н., Ермак И.М., Горбач В.И., Дроздов А.Л., Соловьева Т.Ф. Сравнительное изучение физико-химических свойств хитозанов различной степени полимеризации в нейтральных водных растворах // Биофизика. – 2000. – Т. 45, № 4. – С. 624-630.
3. Жоголев К.Д., Никитин В.Ю. Экспериментально-лабораторное изучение иммуномодулирующих свойств препаратов хитина и хитозана // Иммунология. – 1998. – № 6. – С. 53.
4. Исаченко Е.Г., Геронина С.А., Виткина Т.И. и др. Стимуляция цельной крови *ex vivo* специфическими активаторами для оценки реактивности иммунокомпетентных клеток // Новые биомедицинские технологии с использованием биологически активных добавок: Сб. материалов Российской научной конференции (24-25 июня 1998 г.). – С. 53-54.
5. Лисенков А.Н. Математические методы планирования многофакторных медико-биологических экспериментов // М.: Медицина, 1979. – 314 с.
6. Ляшенко А.А., Уваров В.Ю. К вопросу о систематизации цитокинов // Успехи современной биологии. – 2001. – Т. 121, № 6. – С. 589-603.
7. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология // М.: Медицина, – 1995. – 219 с.
8. Харланов А.В. Влияние хитозана с различной степенью ацетилирования на антителообразование у мышей // Мед. иммунология. – 2005. – Т. 7, № 2-3. – С. 329.
9. Цыган В.Н., Жоголев К.Д., Никитин В.Ю. Хитозан как компонент парафармацевтиков в иммуноориентированной терапии // Концепт. вопр.

питания населения и военнослужащих. – СПб., 2001. – Т. 2. – С. 37-43.

10. De Groote D., Zangerle P.F., Gevaert Y., Fassotte M.F., Beguin Y., Noizat-Pirenne F., Pirenne J., Gathy R., Lopez M., Dehart I., Igot D., Baudrihay M., Delacroix D., Franchimont P. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation // Cytokine. – 1992. – Vol. 4, N 3. – P. 239-248.

11. Gorbach V.I., Krasikova I.N., Luk'yanov P.A., Loenko Y.N., Solov'eva T.F., Ovodov Y.S., Deev V.V., Pimenov A.A. New glycolipids (chitooligosaccharide

derivatives) possessing immunostimulating and anti-tumor activities // Carbohydr. Res. – 1994. – Vol. 260. – P. 73-82.

12. Jerne N.K., Nordin F.N. Plaque formation in agar by single antibody-producing cell // Science. – 1963. – Vol. 40. – P. 405-407.

13. Lagrange P.H., Mackaness G.B., Miller T.E. Influence of dose and route of antigen infection on the immunological induction of T-cells // J. Exp. Med. – 1974. – Vol. 139. – P. 528-542.

поступила в редакцию 01.03.2007

принята к печати 30.05.2007