

**Шагдарова
Бальжима Цырендоржиевна**

**ПОЛУЧЕНИЕ АЛКИЛИРОВАННЫХ И АЦИЛИРОВАННЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ
БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ**

03.01.06 – Биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории инженерии биополимеров Института биоинженерии, Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Научный руководитель: **Варламов Валерий Петрович**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Мелентьев Александр Иванович**
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Уфимский Институт
биологии Российской академии наук,
научный руководитель учреждения,
заведующий лабораторией прикладной
микробиологии

Безродных Евгения Александровна
кандидат химических наук, Федеральное
государственное бюджетное учреждение
науки Институт элементоорганических
соединений им. А.Н. Несмеянова Российской
академии наук, научный сотрудник
лаборатории физиологически активных
биополимеров

Ведущая организация Федеральное Государственное бюджетное
научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский и
технологический институт биологической промышленности.

Защита состоится 4 апреля 2017 г. в 15.30 на заседании диссертационного
совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени
М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ,
корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.
Тел.8(495)939-54-83, эл. почта npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ и на сайте
биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан « » _____ 201 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета.



Пискункова Нина Федоровна.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Полимеры активно используются в области биотехнологии и медицины. Они находят свое применение в качестве инструментов для решения биомедицинских проблем, таких как системы доставки лекарств, конструирование биосенсоров, применение в тканевой инженерии, регенеративной медицине (Langer, Tirrell, 2004; Furth, Atala, Dyke Van, 2007; Priya James, John, Alex, 2014). Синтетические полимеры обладают тем преимуществом, что их состав и структуру легко контролировать, однако перспективными для использования в биомедицинской области являются природные полимеры, благодаря их биосовместимости и способности к биодegradации.

Важное место среди природных полимеров занимает хитозан, получаемый реакцией дезацетилирования хитина. Хитозан имеет большой потенциал за счет своих полиэлектролитных свойств, а также высокой адсорбционной способности, биодegradации, биосовместимости, низкой токсичности (Aranaz et al., 2009). Наличие гидроксильных и аминогрупп позволяет модифицировать молекулу хитозана путем введения различных функциональных заместителей, с получением отличающихся по свойствам производных, что значительно расширяет области применения данного биополимера, благодаря возможности направленного изменения его свойств. Производные хитозана, растворимые в воде при значениях рН близких к нейтральному, обращают на себя повышенное внимание ввиду возможности их применения в разных областях химии и биологии (Lim, Hudson, 2004; Mourya, Inamdar, Tiwari, 2010; Zhang et al., 2003). Универсальность и широкие возможности применения водорастворимых производных хитозана делают их интересными и актуальными объектами исследования.

Целью исследования является получение алкилированных и ацилированных производных низкомолекулярного хитозана, изучение их свойств и возможности применения синтезированных производных в биомедицинской области.

Задачи исследования:

1. Синтез алкилированных и ацилированных производных низкомолекулярного хитозана, определение их физико-химических характеристик;
2. Формирование частиц и конъюгатов с пептидами на основе синтезированных производных хитозана и их характеристика;

3. Изучение антибактериальных свойств производных, частиц и конъюгатов на их основе;
4. Изучение взаимодействия алкилированных производных хитозана с эукариотическими клетками *in vitro*;
5. Исследование взаимодействия алкилированных производных хитозана с компонентами крови и оценка их способности к нейтрализации активности гепаринов в системах *in vitro*, *in vivo*.

Научная новизна и практическая значимость работы:

В результате выполнения работ был получен низкомолекулярный хитозан (НМХ), на его основе синтезированы ацилированные и алкилированные (КвХ) производные хитозана с различной степенью замещения (СЗ). Безусловным преимуществом производных является их растворимость при нейтральном значении рН, что расширяет возможность их применения в биомедицинской области. Впервые получены композиты на основе алкилированных производных КвХ с пептидами - варнерином (Вар) и мелиттином (Мел), оптимизированы условия их получения. Изучена антибактериальная активность производных хитозана, а также впервые показано синергетическое действие полученных композитов против модельных микроорганизмов. Изучена токсичность ряда КвХ, она имеет дозозависимый характер и существенно зависит от СЗ производного. Впервые исследовано взаимодействие КвХ с различной СЗ с эукариотическими клетками, выявлено, что такие производные лучше интернализуются клеткой по сравнению с НМХ. Эффективность проникновения существенно возрастает с ростом СЗ, она составляет 20% и 55%, для КвХ9 и КвХ98, соответственно. Внутривенное введение КвХ с максимальной СЗ, приводило к снижению антикоагулянтной активности плазмы морских свинок, на фоне введения нефракционированного гепарина (НФГ) или низкомолекулярного (НМГ), при этом, антикоагулянтный эффект КвХ сравним с эффектом сульфата протамина (СПТ), используемого в клинической практике. Результаты, полученные в рамках диссертационной работы, показывают перспективность использования КвХ для разработки систем доставки лекарств, а также нейтрализации активности гепарина.

Связь работы с научными программами: Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проекты №№ 14-04-00687_а, 15-34-50158 мол_нр, 15-29-05858 офи_м)

Апробация работы и публикации: Результаты были представлены автором в виде устных докладов на конференциях: Международная научная

конференция «ЭкоБиотех-2013» (Уфа, 2013), XII Международная конференция “Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана” РосХит 2014 (Пермь, 2014), XX Conference New Aspects on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives (Poland, Lodz, 2014), XIV Международная конференция молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии» (Казань, 2015), X Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2015), XIII Международная конференция “Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана” РосХит 2016 (Уфа, 2016). Материалы диссертации были представлены и обсуждены на конференциях: XXVIII зимней научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2016), III Конгрессе гематологов России (Москва, 2016), 3rd International Conference on Bio-based Polymers and Composites (Hungary, Szeged, 2016).

По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, среди них 7 статей в журналах рецензируемых ВАК РФ, 2 статьи опубликованы в зарубежном рецензируемом журнале, 9 тезисов.

Структура и объем работы: Диссертационная работа состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты и их обсуждение», «Выводы», «Заключение», «Список литературы» - 195 источников. Работа содержит 134 страницы машинописного текста, иллюстрирована 34 рисунками и 10 таблицами.

Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных, непосредственном участии в постановке задач исследования, проведении экспериментальных работ, а также обсуждении и теоретическом осмыслении полученных результатов. Основные результаты работы в планировании и проведении экспериментов получены автором лично или при его участии. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Получение низкомолекулярного хитозана

Для расширения возможностей применения хитозана в различных областях биомедицины, требуется увеличение его растворимости при pH близких к нейтральному значению. Одним из возможных подходов для достижения этой цели является снижение молекулярной массы хитозана. В работе высокомолекулярный хитозан (ВМХ) с ММ 500 кДа и СД 87% деполимеризовали соляной кислотой. В результате был получен НМХ со средневесовой молекулярной массой (ММ) 20 кДа, индексом полидисперсности 1,4 и степенью дезацетилирования (СД) 98%.

2 Синтез алкилированных и ацилированных производных НМХ

На основе НМХ, синтезировали алкилированные, ацилированные производные хитозана, а также производные с двумя вышеперечисленными группами. Для реакции алкилирования НМХ использовали реагент глицидилтриметил аммоний хлорид (ГТМАХ) – производное четвертичной аммониевой соли, содержащее эпоксидное кольцо. Варьируя количество, вводимого в реакцию ГТМАХ, на основе НМХ были получены алкилированные (КвХ) производные со СЗ от 9 до 98% (Рисунок 1, Таблица 1). Для реакции ацилирования НМХ были использованы ангидриды уксусной, масляной и капроновой кислот. Синтез производных НМХ, сочетающих в молекуле одновременно ацильные и алкильные заместители проводили в две стадии. На первой стадии получали ацилированные производные хитозана С2Х, С4Х, С6Х. На второй стадии при алкилировании были получены производные С2КвХ, С4КвХ, С6КвХ (Рисунок 1, Таблица 1).

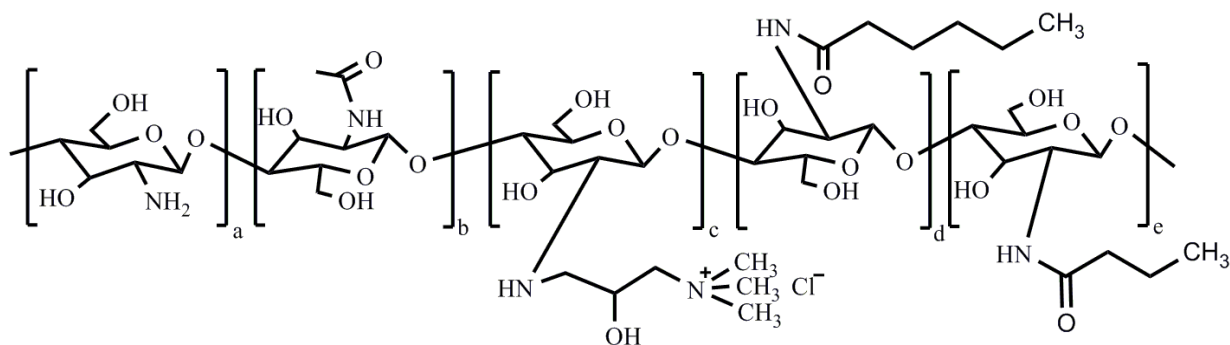


Рисунок 1. Общая формула хитозана и его синтезированных производных

Хитозан а=98%, b=2%;

N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид а=89%, b=2%, c=9%;

N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид а=58%, b=2%, c=40%;

N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид а=40%, b=2%, c=58%;

N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид b=2%, c=98%;

N-гексаноил-N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид, c=88%, b=2%, d=10%;

N-бутаноил-N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид, c=88%, b=2%, e=10%;

N-этанойл-N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид, c=88%, b=12%;

N-гексаноилхитозан а=88%, b=2%, d=10%;

N-бутаноилхитозан а=88%, b=2%, e=10%;

N-этанойлхитозан a=88%, b=12%;

Таблица 1. Физико-химические параметры производных хитозана.

Название	Шифр	Молекулярная масса, кДа	СЗ, %	Дзета-потенциал, мВ
Высокомолекулярный хитозан	ВМХ	500	-	25±5
Низкомолекулярный хитозан	НМХ	20	-	35±5
N-этанойл хитозан	C ₂ X	20	10	-
N-бутанойл хитозан	C ₄ X	20	10	-
N-гексанойл хитозан	C ₆ X	20	10	-
N-этанойл-N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид	C ₂ КВХ	20	10/90	-
N-бутанойл-N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид	C ₄ КВХ	20	10/90	-
N-гексанойл-N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид	C ₆ КВХ	20	10/90	-
N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид	КВХ9	20	9	33±5
N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид	КВХ40	20	40	41±5
N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид	КВХ58	20	58	45±5
N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид	КВХ98	20	98	51±5
N-сукцинил хитозан	СХ	300	80	-26±5

3 Физико-химические характеристики хитозана и его производных

Степень замещения полученных производных (C₂X, C₄X, C₆X) определяли с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии. У алкилированных производных (КВХ9-КВХ98) СЗ определяли кондуктометрическим титрованием. Структура производного (КВХ98) была подтверждена ИК-спектросметрией.

Согласно методике (Qin et al., 2004) была определена растворимость производных (КВХ9-КВХ98) в воде при значении рН 7,4. Выяснено, что растворимость возрастала по мере увеличения степени замещения.

Максимально замещенный КвХ98 растворим в концентрации > 100 мг/мл (Таблица 2). Изучена зависимость растворимости производных хитозана от значений pH (Рисунок 2а).

Таблица 2 - Физико-химические характеристики хитозана и его алкилированных производных

Производные хитозана	Шифр	Степень замещения, %	Дзета-потенциал, мВ	Растворимость при pH 7.4 в воде, мг/мл
Хитозан исходный низкомолекулярный	НМХ	СД 98	35	6*
N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний) пропил] хлорид хитозан	КвХ9	9	51	2
	КвХ40	40	45	12
	КвХ58	58	41	28
	КвХ98	98	33	>100

*Растворимость при pH 5,6, 0,1М ацетатный буфер, 23°C

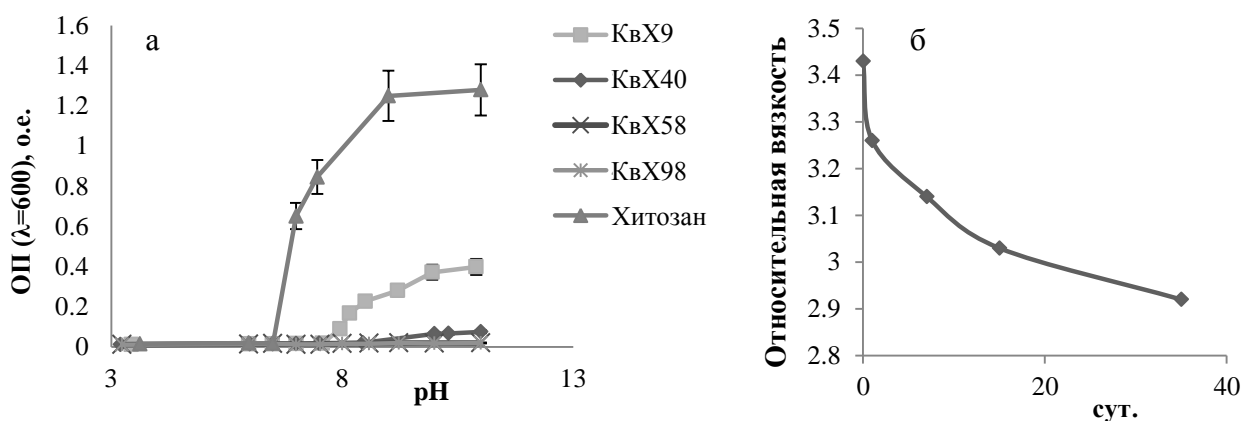


Рисунок 2 – а - pH-зависимость растворимости НМХ и КвХ с различными СЗ; б - Деградация КвХ98 под действием лизоцима.

Одним из требований, предъявляемых к полимерам при использовании их в фармацевтической, медицинской, пищевой промышленности, является биodeградируемость. Методом вискозиметрии была проведена оценка деградации КвХ98 (производное с большей растворимостью), под действием лизоцима (КФ 3.2.1.17), входящего в состав различных жидкостей организма (кровь, слюна и т.д.). Наибольшее изменение относительной вязкости наблюдали в первые сутки (Рисунок 2б). Динамика снижения вязкости раствора указывала на возможность деградации КвХ98 в организме под действием лизоцима.

4 Формирование частиц и конъюгатов с производными хитозана

Получение частиц и конъюгатов хитозана с биологически активными соединениями способствует сохранению и пролонгированию их

биологической активности, а также обеспечивает их доставку *in vivo* (Yadav et al., 2011). На основе производного СХ со СЗ 70% («Биопрогресс» Московская обл.) методом солевого осаждения (осаждающий реагент 1 % раствор хлорида кальция) была получена устойчивая суспензия частиц. Выход лиофильно высушенных частиц составлял 10 %. Антимикробный катионный пептид (Вар) сорбировали на полученные частицы в оптимально подобранных условиях при соотношении НЧСХ : Вар — 1 : 0,6 (мкг/мл). Эффективная сорбция Вар на частицах составляла 75 %.

Конъюгаты были получены на основе производного КвХ40 с антимикробными пептидами - Вар и Мел. В отличие от обычно применяемых сшивающих агентов (глутарового диальдегида), при синтезе был использован нетоксичный препарат микробной трансглутаминазы (мТГ). Фермент катализирует ацильный перенос между γ -карбоксамидной группой глутамина в пептидной последовательности (ацил-донор) и первичными аминогруппами производного хитозана (ацил-акцептор) с образованием амидной связи. Были подобраны оптимальные условия синтеза конъюгата — время 0,5 ч, температура 37°C, мольное соотношение пептида к КвХ40 составляло 1,4 : 100. Полученные конъюгаты растворимы в водных растворах при рН 6,5 – 7,4 в отличие от КвХ40, который характеризуется ограниченной растворимостью в этом диапазоне рН. Образование конъюгатов подтвердили методом ИК-спектроскопии.

5 Исследование биологических свойств хитозана, производных хитозана и конъюгатов

5.1 Антибактериальное действие хитозана и его производных

Сравнительный анализ антибактериальной активности полученных производных на примере модельных микроорганизмов показал, что они обладали чувствительностью ко всем образцам, включая исходный хитозан. Дезацетилированный НМХ (СД 98 %) обладал антибактериальной активностью за счет положительно заряженных аминогрупп, которые связываются с отрицательно заряженными структурами, находящимися на поверхности клетки. Хитозан проявляет поликатионные свойства только при значениях $\text{pH} \leq 6,2$. Тогда как при нейтральном значении рН положительный заряд на первичной аминогруппе хитозана практически отсутствует и хитозан теряет свою растворимость. Введение четвертичных аммониевых групп в молекулу НМХ (алкилирование) увеличивало его растворимость. Введение гидрофобных ацильных групп различной длины С₂, С₄ и С₆ (ацилирование) должно способствовать большему средству производных (С₂Х, С₄Х, С₆Х) к липидам мембранных структур микроорганизмов.

Результаты экспериментов показали, что введение в молекулу биополимера ацильного заместителя в количестве 8–10 % незначительно влияло на антимикробную активность. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) снижалась только в 2 раза (Таблица 3).

Таблица 3 - Антибактериальная активность хитозана и его производных против *S. epidermidis* и *E. coli*.

Соединения	МИК в отношении микроорганизмов, мкг/мл	
	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>
НМХ	62,5	125
C ₂ X	125	62,5
C ₄ X	125	125
C ₆ X	62,5	62,5
C ₂ КВХ	0,48	7,8
C ₄ КВХ	0,48	7,8
C ₆ КВХ	0,48	7,8
КВХ9	7,8	31,25
КВХ40	3,9	15,62
КВХ58	3,9	15,62
КВХ98	0,48	3,9

С целью увеличения растворимости и величины положительного заряда в молекуле хитозана были синтезированы соединения (C₂КВХ, C₄КВХ, C₆КВХ), в которых присутствовали гидрофобные заместители около 10% и алкильный заместитель — четвертичная аммониевая группа. Количество алкильных заместителей в молекуле составляло 90 %. Данная манипуляция привела к значительному снижению МИК производных в отношении *S. epidermidis*, а в отношении *E. coli* эффект был не столь существенным. Из полученных результатов следовало, что вклад положительного заряда от алкильного заместителя оказывал основное влияние на проявление антибактериальной активности соединений. В связи с этим исследовали влияние СЗ в алкилированных производных хитозана (КВХ9, КВХ40, КВХ58, КВХ98) на величину МИК. Установили, что увеличение СЗ от 9 до 98 % в молекуле хитозана способствовало снижению МИК более чем на порядок и на два порядка по сравнению с НМХ для *S. epidermidis* (Таблица 3).

5.2 Антиоксидантная активность алкилированных производных

Антиоксидантами называют соединения, которые способны взаимодействовать со свободными радикалами, переводя их в неактивную форму. Исследование антиоксидантной активности у алкилированных производных хитозана связано с перспективой использования их в качестве

носителей для биологически активных соединений (Yen et al., 2008). Одним из методов оценки такой активности является способность взаимодействия соединений с радикалом дефинилпикрилгидразилом (DPPH), контроль – аскорбиновая кислота (АК). В результате работы была установлена концентрационная зависимость проявляемой активности (Рисунок 3).

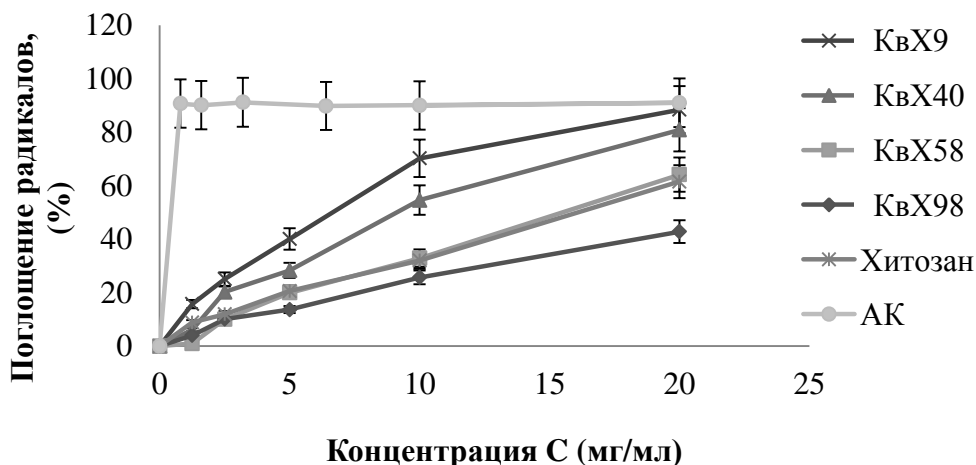


Рисунок 3 - Поглощение радикалов хитозаном и КВХ.

Соединения с большей СЗ обладали меньшей активностью по отношению к DPPH радикалам, то есть антиоксидантная активность КВХ связана с количеством свободных аминогрупп в молекуле.

5.3 Хелатирующая способность алкилированных производных

Антибактериальную активность хитозана и его производных по одной из гипотез связывают с их способностью хелатировать ионы переходных металлов в клетке, что приводит к её гибели (Nosseinejad et al., 2016). Для оценки хелатирующей способности использовали спектрофотометрический метод. В результате реакции железа (II) с 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-4',4''-дисульфокислотой – феррозином, образуется устойчивый окрашенный железо-феррозиновый комплекс. При концентрации от 8 до 10 мг/мл НМХ, КВХ40 и КВХ98 проявляли высокую хелатирующую способность 97 – 99 % (Рисунок 4).

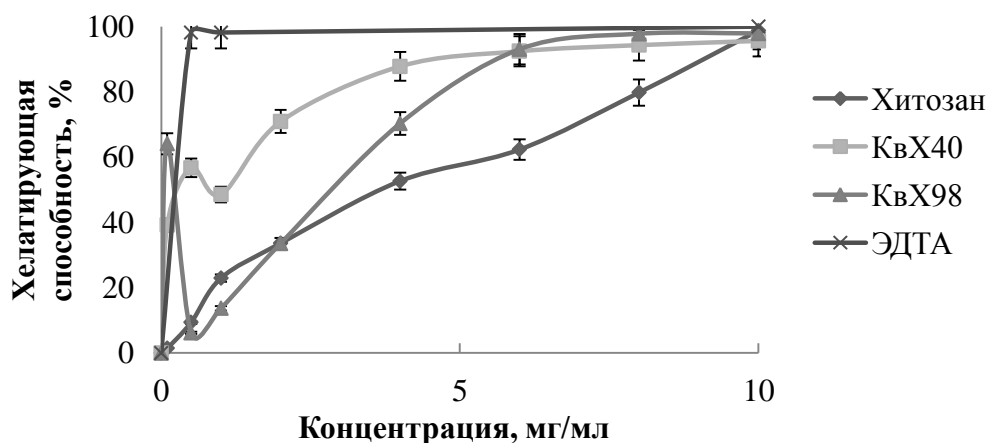


Рисунок 4 - Хелатирующая способность хитозана и КвХ.

5.4 Антибактериальное действие частиц и конъюгатов

Была изучена антибактериальная активность СХ частиц загруженных Вар. Полученные результаты подтвердили целесообразность сорбции Вар для сохранения пептидом активности.

Антибактериальная активность линейки КвХ, в том числе КвХ40 против *S. epidermidis* и *E. coli* определена и представлена в таблице 3.

Таблица 4 - Антибактериальная активность Мел, Вар, КвХ40 и их конъюгатов.

АМП и производные хитозана	Минимальная ингибирующая концентрация, мкг/мл	
	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>
КвХ40	15	31
Мел	0,7	3,1
КвХ40-Мел	0,97	1,9
Вар	3,9	>1000
КвХ40-Вар	0,97	1,9

Антибактериальное действие КвХ40, Мел, Вар и их конъюгатов на клетки модельных микроорганизмов приведены в Таблице 4. Конъюгирование Мел с КвХ40 не привело к значительному увеличению антибактериальной активности, однако активность пептида была сохранена, а в случае действия конъюгата на клетки *E. coli* была выше. Антибактериальная активность конъюгата КвХ40-Мел в 1,6 раз превосходила активность Мел, и в 16 раз КвХ40 по отношению к клеткам *E. coli*. Активность конъюгата КвХ40-Вар в 4 раза выше активности Вар, и в 15 раз выше КвХ40 по отношению к *S. epidermidis*. Синергетическое действие компонентов в конъюгате КвХ40-Вар было показано и на клетках *E. coli*: МИК конъюгата была в 16 раз ниже, чем МИК КвХ40, а исходный препарат варнерина вообще не обладал активностью в отношении *E. coli*. Полученные данные говорят о целесообразности получения конъюгатов антимикробных пептидов с производным хитозана КвХ40 для стабилизации и повышения антибактериальной активности.

Морфологию обработанных клеток изучали методом АСМ. Клетки в контроле без обработки препаратами (Рисунок 5 а) формировали кластеры различного размера, имели сферическую форму, гладкую поверхность с характерными складками, высота от 400 до 600 нм, диаметр 1-1,5 мкм. При оценке влияния КвХ40 и конъюгатов КвХ40 с пептидами на клетки *S. epidermidis* (Рисунок 5 б, г, е) наблюдали фрагменты разрушенных клеток высотой менее 100 нм, покрытых плотной полимерной пленкой. На Рисунках

5 г, е, поверхность клеток и подложки покрыта слоем полимерного материала, который затруднял исследование поверхности, однако, морфология разрушенных фрагментов отличалась от необработанных клеток. Анализ изображений клеток, обработанных пептидами (Рисунки 5 в, д) показал, что клетки сохраняли сферическую форму и располагались отдельно друг от друга. О разрушении клеток можно судить по уменьшению высоты до 100-200 нм, увеличению диаметра до 3-4 мкм, характерным провалам в центре клеток, что свидетельствовало об отсутствии внутреннего содержимого. Аналогичные данные с помощью АСМ получены для клеток *E. coli*.

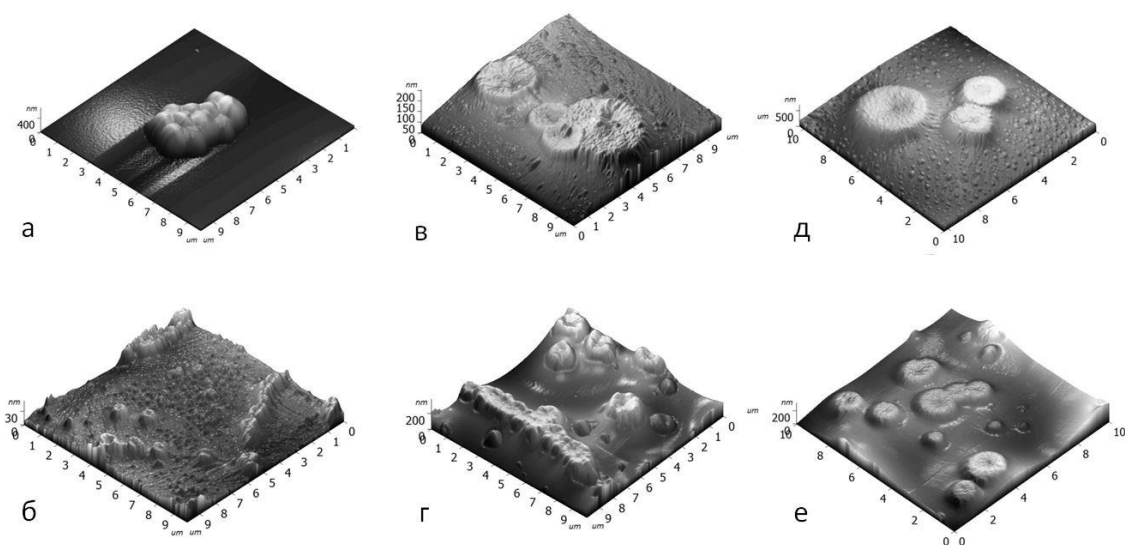


Рисунок 5 - Трехмерные АСМ-изображения клеток *S. epidermidis*: а – контроль *S. epidermidis*; б - *S. epidermidis* после обработки КвХ40; в - *S. epidermidis* после обработки Мел, г - *S. epidermidis* после обработки Мел-КвХ40; д - *S. epidermidis* после обработки Вар, е - *S. epidermidis* после обработки Вар-КвХ40. Площадь области сканирования 10x10 мкм.

6 Изучение взаимодействия алкилированных производных с клетками млекопитающих

6.1 Токсичность алкилированных производных

Цитотоксичность полученных производных *in vitro* была изучена с помощью МТТ теста на клетках эпителиальной линии (MiaPaCa-2) и макрофагах (RAW 264.7). Установлено, что цитотоксичность имела дозозависимый характер и существенно зависела от СЗ производного (она увеличивается в ряду НМХ — КвХ9 — КвХ40 — КвХ58 — КвХ98) (Рисунок 6 а, б). Токсичность КвХ проявляется по-разному в зависимости от типа используемой клеточной линии, для эпителия они являются практически не токсичными (Рисунок 6а), а жизнедеятельность макрофагов ингибируют

почти на 60 % (Рисунок 6б). Вероятно, их цитотоксичность связана с тем, что они даже при минимальной СЗ имеют растворимую часть при нейтральном рН, которой достаточно для эффективного взаимодействия с клетками. В отличие от НМХ, который при нейтральном рН выпадает в осадок и практически не взаимодействует с клетками.

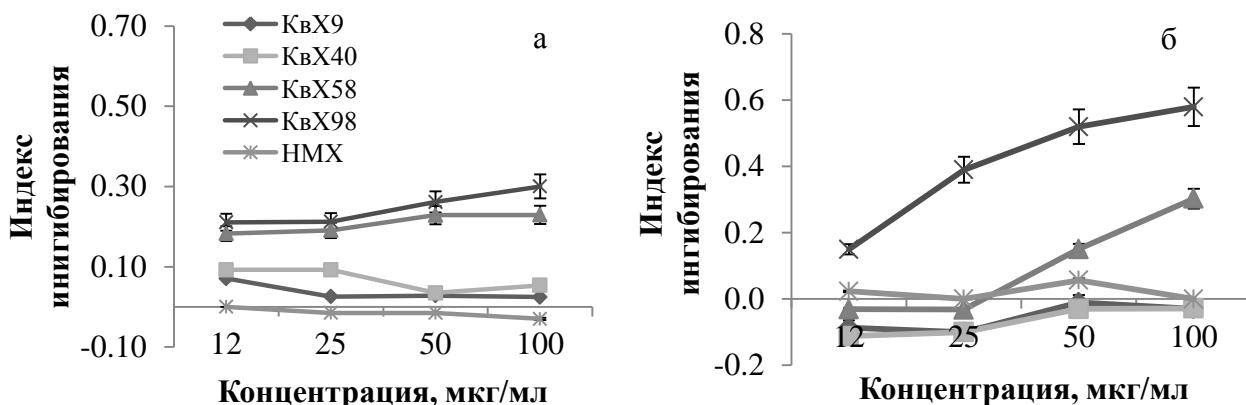


Рисунок 6 - Токсичность НМХ и КвХ9 – КвХ98 против клеточной линии MiaPaCa-2 (а), RAW 264.7 (б) в МТТ тесте (инкубирование 72 часа).

6.2 Исследование взаимодействия алкилированных производных с клеткой методом проточной цитометрии

Анализ транспорта производных хитозана в клетки проводили с использованием метода проточной цитометрии (ПЦ). Для дифференцирования мембранной и внутриклеточной локализации был использован метод гашения внеклеточной флуоресценции трипановым синим (ТС) (Tammam et al., 2015). Для НМХ (Рисунок 7 а) характерна высокая эффективность флуоресценции, свидетельствующая о его ассоциации с клеткой. Но после добавления ТС интенсивность флуоресценции падала почти до уровня контроля, что говорит о малой доле внутриклеточной фракции. Также для НМХ характерен несимметричный пик, что косвенно указывало на его неравномерное связывание с клетками. Для КвХ9-КвХ98 наблюдали наложение зеленого и синего пиков на гистограмме, что качественно указывало на эффективную интернализацию КвХ клеткой (Рисунок 7 б-в).

Количественный анализ (Рисунок 7 г), показал, что для всех исследуемых полимеров наблюдается увеличение накопления в клетке со временем. Эффективность внутриклеточного захвата КвХ значительно зависела от СЗ четвертичными аммониевыми группами и достигала 55 % при длительных инкубациях для КвХ98. В тоже время, НМХ, а также КвХ9-КвХ58 хуже проникали в клетку (не более 30 %).

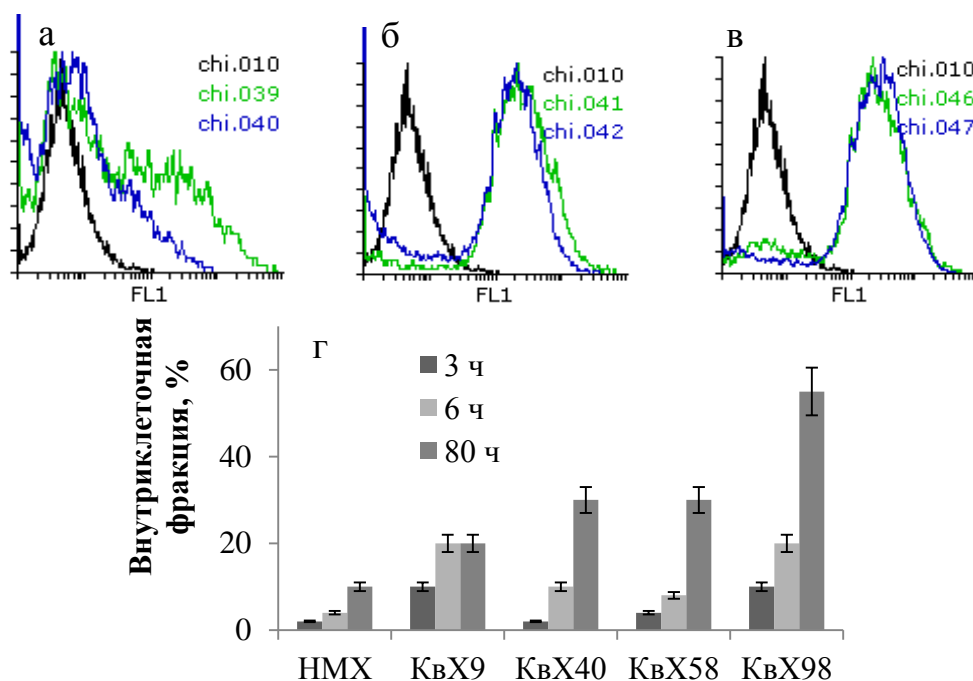


Рисунок 7 – Репрезентативные данные кинетики проникновения НМХ и его производных для клеток линии RAW 264.7. Аналогичные данные получены для MiaPaCa-2.

6.3 Визуализация взаимодействия алкилированных производных с клеткой методом конфокальной микроскопии

Результаты, полученные методом проточной цитометрии, были подтверждены методом конфокальной микроскопии. На тех же клеточных линиях было установлено, что НМХ не проникал в клетки, образуя агрегаты микронного размера, локализующиеся преимущественно во внеклеточном пространстве (Рисунок 8 а, г). Введение в молекулу хитозана всего 9% четвертичных аммониевых групп значительно увеличивало эффективность проникновения в клетку независимо от типа клеточной линии (Рисунок 8 б, д). Все КвХ после длительной инкубации (до 80 ч) локализовались внутри клетки, как в случае RAW 264.7 (Рисунок 8 б, в), так и MiaPaCa-2 (Рисунок 8 д, е), что коррелировало с данными проточной цитометрии, для которой характерно наложение зеленой и синих кривых (Рисунок 7 б, в). Полученный результат свидетельствовал о высокой эффективности интернализации линейки образцов КвХ9 - КвХ98 клеткой.

Окраска лизосом клеток с помощью коммерческого красителя LysoTrack Red показала колокализацию КвХ с этими органеллами в случае макрофагов (Рисунок 8 б, в), но не эпителиальных клеток (Рисунок 8 д, е).

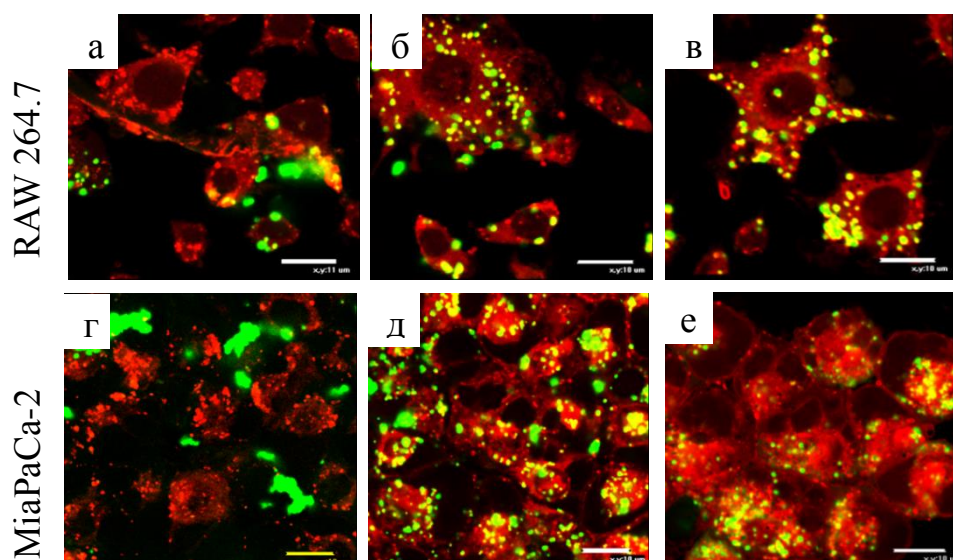


Рисунок 8 - Внутриклеточный трафик НМХ (а, г), КвХ9 (б, д) и КвХ98 (в, е) в RAW 264.7 и MiaPaCa-2 при инкубации в течение 80 ч. Клетки инкубировали с ФИТЦ-мечеными НМХ и производными хитозана (10 мкг/мл), промывали, затем окрашивали LysoTrackRed в течение 30 мин и исследовали методом конфокальной микроскопии. Шкала соответствует 10–20 мкм.

В целом, можно сделать вывод, что КвХ со СЗ более 40% способны проникать внутрь клеток, что можно использовать в области разработки систем доставки лекарств.

7 Исследование взаимодействия алкилированных производных хитозана с компонентами крови и оценка их способности к нейтрализации антикоагулянтной активности препаратов гепарина в системах *in vitro*, *in vivo*

Использование различных полимеров в области биомедицины в основном подразумевает их контакт с кровью. Оценка совместимости материалов с кровью, включает в себя ряд методов, описанных в ISO 10993-4:2002. В их число входят методы оценки влияния материалов на агрегацию тромбоцитов и оценки влияния материалов на мембрану эритроцитов. Эти анализы были проведены для алкилированных производных хитозана, ввиду их возможного использования в качестве антидота гепарина.

7.1 Гемолиз эритроцитов

Для оценки влияния производных хитозана на мембрану эритроцитов был использован метод лизиса эритроцитов *in vitro* (Рисунок 10). Показано, что в диапазоне концентраций 0,001 – 0,01 мг/мл оптическая плотность надосадочной жидкости, содержащей производные КвХ98, КвХ40 и КвХ9,

достоверно не отличалась от показаний в отрицательных контролях (ОП в положительных контролях достигала 4 ± 0). Можно предположить, что добавление от 0,001 до 0,01 мг/мл производного КвХ98 в кровь с НФГ или НМГ не вызывало гемолиза эритроцитов.

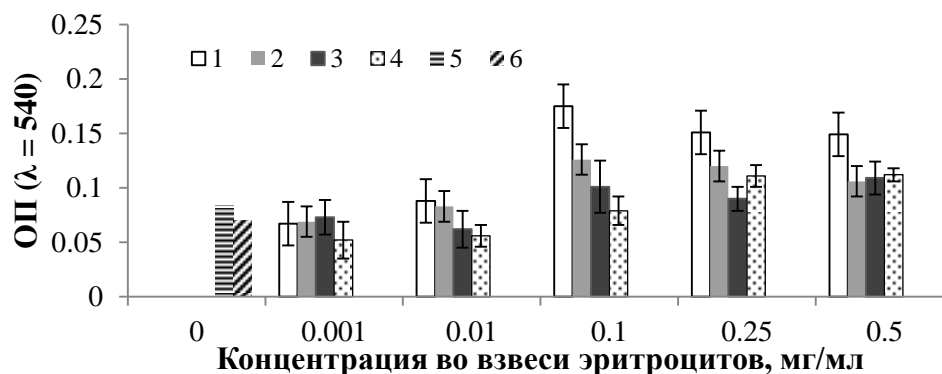


Рисунок 10 - Зависимость действия СПТ (1) и производных хитозана КвХ98 (2), КвХ40 (3), КвХ9 (4) на оптическую плотность при 540 нм надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования взвеси эритроцитов, контроли (5) - К1 «-», (6) – К2 «-».

7.2 Агрегация тромбоцитов

Оценивали влияние производных КвХ98, КвХ40 и КвХ9 на агрегацию тромбоцитов человека (с индукцией АДФ и без индукции АДФ). Инкубация богатой тромбоцитами плазмы, содержащей 0,29 – 0,58 мг/мл СПТ или 0,0029 мг/мл производного КвХ98 (без последующего добавления АДФ), не приводила к агрегации тромбоцитов. Добавление к плазме производных КвХ98 (0,029 – 0,58 мг/мл), КвХ40 и КвХ9 (0,58 мг/мл) способствовало агрегации тромбоцитов человека. При инкубации богатой тромбоцитами плазмы, содержащей 0,29 мг/мл СПТ или производные КвХ98, КвХ40 (с последующим добавлением АДФ), уровень агрегации тромбоцитов был сравним с индукцией этого процесса при введении только АДФ. Производное КвХ98 при концентрациях 0,0029 – 0,58 мг/мл в большей степени, чем КвХ40 и КвХ9 усиливало агрегацию тромбоцитов, что необходимо для соединений или материалов с гемостатической активностью.

7.3 Оценка прокоагулянтного действия алкилированных производных при нейтрализации активности НФГ и НМГ

Гепарины (НФГ, НМГ) используются в сердечно-сосудистой хирургии для предотвращения тромбоэмболии, однако часто их применение приводит к геморрагическим осложнениям. В качестве антидота для гепаринов используется СПТ. СПТ – это относительно безопасный препарат, однако, его применение может вызывать побочные эффекты, в том числе сердечный

приступ (Gallagher et al., 2012). Он применяется в медицине в связи с отсутствием клинически надежного альтернативного вещества для нейтрализации гепарина. Поэтому алкилированные производные хитозана (КвХ), обладающие большим положительным зарядом, растворимые в воде могут выступать в качестве потенциального антидота гепаринов.

Для оценки прокоагулянтного (увеличивающего свертывание крови) потенциала исследуемых производных хитозана КвХ9, КвХ40 и КвХ98, анализировали их влияние на время появления фибринового сгустка плазмы человека, содержащей НФГ. Известно, что при угрозе кровотечения для нейтрализации антитромбиновой (аПа) активности НФГ в качестве антидота используют раствор сульфата протамина (СПТ) в концентрации 1 мг на 100 аПа ед. НФГ (Cumming et al., 2004). На Рисунке 9 показано, что добавление производных хитозана КвХ98 и КвХ40, а также СПТ (0,00143 – 1,43 мг/мл) в плазму человека, содержащую НФГ (0,143 аПа ЕД/мл), приводило к достоверному снижению времени появления сгустка в тесте тромбинового времени, в котором используется тромбин, гидролизующий определенные связи в молекуле фибриногена, приводящий к появлению фибрина.

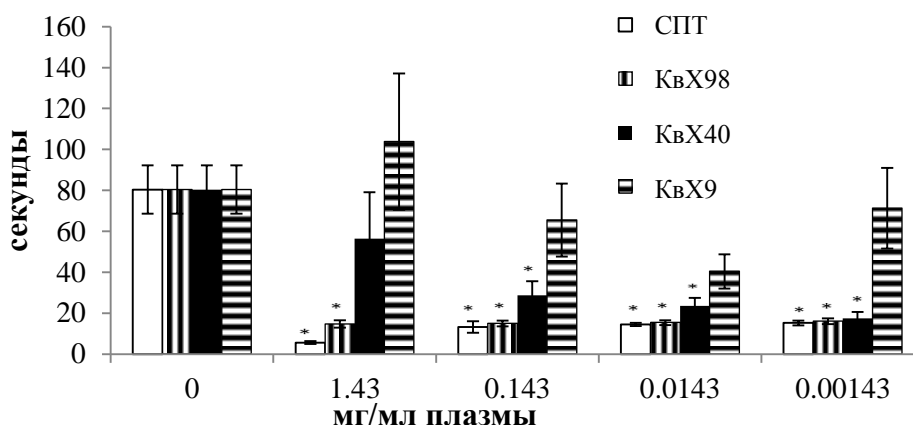


Рисунок 9 - Влияние СПТ и КвХ производных хитозана на время свертывания плазмы человека с нефракционированным гепарином (0,143 аПа ЕД/мл), в тесте тромбинового времени.

Время свертывания плазмы в контроле (без добавления НФГ и без добавления поликатионов -15,2±0,64 с); * p<0,06 достоверность различий с показаниями при концентрации поликатионов 0 мг/мл; Ось X – концентрация поликатионов, мг/мл плазмы; Ось Y – время свертывания плазмы, сек.

Таким образом, производное КвХ98 так же, как и СПТ, эффективно нейтрализовало антитромбиновую активность НФГ, и для полной нейтрализации 0,143 аПа ед./мл НФГ требовалось 0,00143 мг/мл производного КвХ98.

Для оценки прокоагулянтного действия КвХ при нейтрализации активности НМГ использовали тест Реаклот-Гепарин, в котором в присутствии антитромбина III (АТ III) небольшое количество гепарина исследуемой плазмы нейтрализовало экзогенный активированный фактор Ха. Производные КвХ98, КвХ40 и КвХ9 (0,00156 – 1,56 мг/мл), а также СПТ (0,00156 и 0,0156 мг/мл) достоверно снижали время свертывания плазмы (содержащей 0,078 аХа ед./мл НМГ) в тесте Реаклот-Гепарин ($BC_{\text{Реаклот}}$) в 1,3 – 1,8 раза ($p < 0,06$). Увеличение концентрации СПТ до 0,156 и 1,56 мг/мл значительно увеличивало $BC_{\text{Реаклот}}$ (>100 с). Исследуемые производные КвХ, а также СПТ не снижали $BC_{\text{Реаклот}}$ до уровня контроля ($19,35 \pm 0,31$ с). $BC_{\text{Реаклот}}$ плазмы, содержащей только 1,56 аХа ед./мл НМГ, составляло более 200 с, и только добавление производного КвХ9 приводило к снижению $BC_{\text{Реаклот}}$ до $63,97 \pm 3,51$ с, что было в 3,3 раза выше, чем в контроле.

Производное КвХ98 частично, как и СПТ, снижало $BC_{\text{Реаклот}}$ плазмы, содержащей НМГ (1,56 аХа ед./мл), при этом наблюдаемое снижение было эффективнее, чем нейтрализация СПТ Ха активности НМГ. Следует отметить, что в таких высоких дозах препараты гепарина вводятся только при использовании аппаратов искусственного кровообращения.

7.4 Оценка нейтрализации алкилированными производными антикоагулянтной активности плазмы морских свинок в результате введения НФГ или НМГ

Данные экспериментов *in vitro* разделов 7.1-7.4, показали, что КвХ98 является наилучшим кандидатом для использования в качестве антидота. Далее его влияние на антикоагулянтную активность гепаринизированной плазмы изучали в опытах *in vivo* с использованием морских свинок.

Через 5 мин после внутривенного введения морским свинкам НФГ наблюдалось увеличение времени свертывания плазмы в тесте Реаклот-Гепарин (Рисунок 11) до 1997 ± 162 с. При исследовании нейтрализации СПТ антикоагулянтной активности НФГ ориентировались на дозы, используемые при введении СПТ людям с угрозой кровотечения (1 мг СПТ на 100 аШа единиц НФГ) (Smythe et al., 2016). Так, внутривенное введение 0,7 мг/кг СПТ или 0,7 мг/кг КвХ98 морским свинкам (после введения 70 аШа ед./кг НФГ) через 5 минут приводило к достоверному снижению ($p < 0,06$, в сравнении с показаниями при введении только НФГ) времени свертывания плазмы в 45/47 раз (Рисунок 11). Однако полной нейтрализации поликатионами СПТ и КвХ98 антикоагулянтной активности НФГ достигнуть не удалось.

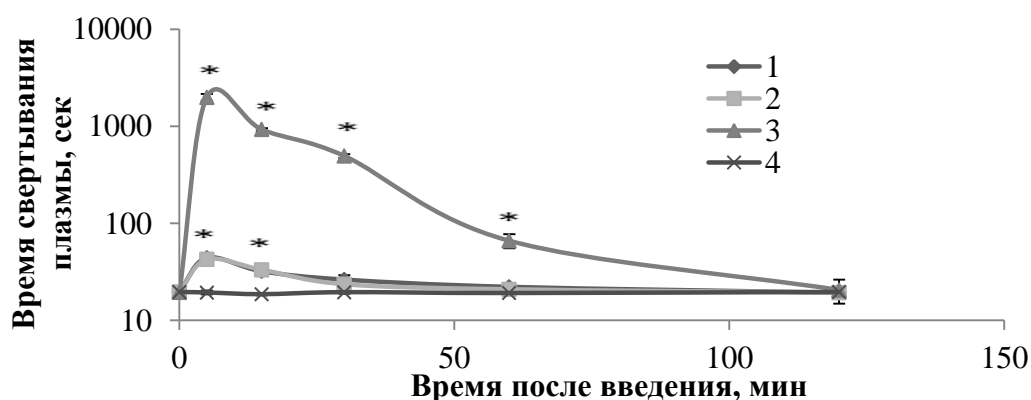


Рисунок 11 - Влияние СРТ (1; 0,7 мг/кг) и КвХ98 (2; 0,7 мг/кг) на время свертывания плазмы (РеаКлот-Гепарин) морских свинок после введения НФГ (3; 70 аПа ед./кг), контроль - физиологический раствор (4). * - $p < 0,06$ в сравнении с показаниями в контроле; $n=7$.

Известно, что СРТ только частично нейтрализует аХа активность гепаринов (Smythe et al., 2016). Нами показано, что через 5 мин после введения СРТ/КвХ98 время свертывания плазмы в тесте РеаКлот-Гепарин отличалось от показаний в контроле более, чем в 2 раза.

Через 5 мин после введения морским свинкам НМГ в дозе 1 мг/кг наблюдали увеличение времени свертывания плазмы в тесте РеаКлот-Гепарин с $24,71 \pm 0,71$ до $250,8 \pm 60,12$ с. Внутривенное введение 1 мг/кг СРТ или 1 мг/кг КвХ98 после НМГ приводило к снижению антикоагулянтной активности плазмы экспериментальных животных (Рисунок 12).

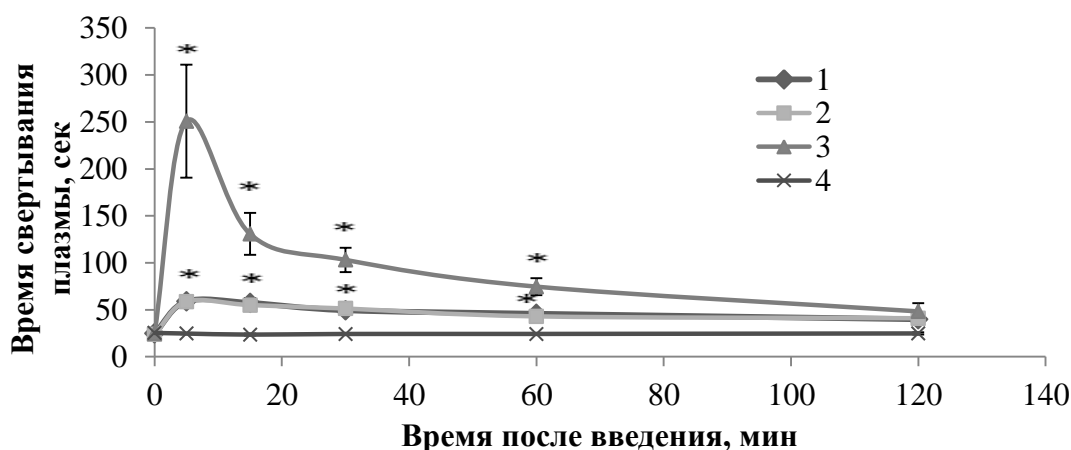


Рисунок 12 - Влияние СРТ (1; 1 мг/кг) и КвХ98 (2; 1 мг/кг) на время свертывания плазмы морских свинок (в тесте РеаКлот-Гепарин) после введения НМГ (3; 1 мг/кг), контроль – введение физиологического раствора (4); * - $p < 0,06$ в сравнении с показаниями в контроле; $n=7-11$.

Таким образом, внутривенное введение КвХ98, как и введение СРТ, приводит к снижению антикоагулянтной активности плазмы морских свинок, на фоне введения НФГ или НМГ.

ВЫВОДЫ:

1. Химической деполимеризацией получен низкомолекулярный хитозан с M_w 20 кДа, СД 98 %. На его основе синтезированы алкилированные производные с различной степенью замещения КвХ (9-98 %), ацилированные производные, с длиной ацильного остатка 6, 4, 2 атомов углерода со СЗ 10 %, а также производные с двумя типами заместителей. Определены их физико-химические характеристики.

2. Получены конъюгаты КвХ40 с варнерином, мелиттином в растворе и наночастицы на основе СХ с варнерином в оптимально подобранных условиях.

3. Изучена антибактериальная активность синтезированных производных хитозана. Наибольшую активность проявил КвХ98. Определено, что введение в молекулу полимера ацильных заместителей С2-С6 со СЗ 10% не влияло на проявление антибактериальных свойств. Показан синергизм антибактериального действия конъюгатов на основе КвХ40 и низкомолекулярных катионных пептидов.

4. Изучена токсичность КвХ9-КвХ98 на клетках эпителия и макрофагах. Установлено, что она имела дозозависимый характер и увеличивалась с ростом СЗ производных четвертичными аммониевыми группами. Методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии показано, что эффективность проникновения в клетки существенно возрастает с ростом СЗ, она составляет 20 и 55%, для КвХ9 и КвХ98.

5. Выявлено, что производное КвХ98 можно использовать для нейтрализации антикоагулянтной активности НФГ или НМГ при концентрации от 0,0014 до 0,0029 мг/мл, тогда как повышение его концентрации до 0,58 мг/мл приводило к увеличению агрегации тромбоцитов. Внутривенное введение производного КвХ98, как и введение сульфата протамина, способствовало снижению антикоагулянтной активности плазмы морских свинок, на фоне введения НФГ или НМГ.

Список опубликованных работ по теме диссертации:

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ:

1. **Шагдарова Б.Ц.**, Левов А.Н., Варламов В.П. Получение низкомолекулярного хитозана и его производных // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т.15. № 3 (5), с.1694-1697;
2. **Шагдарова Б.Ц.**, Ильина А.В., Варламов В.П. Антибактериальная активность алкилированных, ацилированных производных низкомолекулярного хитозана // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т.52. №2, с 237-241;
3. **Шагдарова Б.Ц.**, Дрозд Н.Н., Ильина А.В., Логвинова Ю.С., Варламов В.П. Нейтрализация антикоагулянтной активности гепарина N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил] хлорид-производными хитозана // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т 52. №4, с. 421-428;
4. **Шагдарова Б.Ц.**, Куликов С.Н., Варламов В.П. Изучение совместного действия производных хитозана с лизостафином и варнерином на клетки стафилококков // Известия Уфимского научного центра РАН. 2015. №4 (1), с. 177-179;
5. Чудинова Ю.В., **Шагдарова Б.Ц.**, Ильина А.В., Варламов В.П. Антибактериальное действие конъюгатов пептидов и кватернизированного производного хитозана и его изучение методом атомно-силовой микроскопии // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т 52. №5, с. 482–488;
6. Свирщевская Е.В., Зубарева А.А., Бойко А.А., Шустова О.А., Гречихина М.В., **Шагдарова Б.Ц.**, Варламов В.П. Анализ токсичности и биосовместимости производных хитозана с различными физико-химическими свойствами // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. №5, с. 467-475;
7. Луньков А.П., **Шагдарова Б.Ц.**, Ильина А.В. Синтез кватернизированных производных хитозана и изучение их свойств // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 3(1), с 56-58;

Статьи в иностранных рецензируемых журналах:

8. **Balzhima Ts. Shagdarova**, Alla V. Ilyina, Sergey A. Lopatin, Vladimir P. Korobov, Larisa M. Lemkina, Valery P. Varlamov Formation and characterization of succinoyl chitosan particles loaded with warnerin // Progress in the Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives, 2015. V. XX. P. 246-253, DOI: 10.15259/PCACD.20.24;

9. Anastasia A. Zubareva, **Balzhima Ts. Shagdarova**, Valery P. Varlamov, Elena V. Svirshchevskaya Cell binding and penetration of quaternized chitosan derivatives // Progress in the Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. 2016. V. XXI. P. 217-223, DOI: 10.15259.PCACD.21.23;

Тезисы докладов:

10. **Шагдарова Б.Ц.**, Лемкина Л.М., Коробов В.П., Варламов В.П., Ингибирующее действие хитозана и его кватернизированных производных на рост бактерий *Staphylococcus epidermidis* GISK 33 // Материалы XII Международной Конференции Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Пермь 23-28 июня 2014. с. 366-368;

11. **Шагдарова Б.Ц.**, Куликов С.Н., Левов А.Н., Варламов В.П., Влияние производных хитозана на лизирующую активность лизостафина // Материалы XII Международной Конференции Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Пермь 23-28 июня 2014. с. 362-365;

12. **Шагдарова Б.Ц.**, Ильина А.В., Куликов С.Н., Варламов В.П., Получение олигомеров хитозана и исследование их действия на лизис лизостафином клеточных стенок стафилококков // Материалы XII Международной Конференции Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Пермь 23-28 июня 2014. с. 355-361;

13. **Shagdarova B.**, Preparation and characterization of varnerin delivery system based on succinoyl chitosan // Abstracts XX Conference «New aspects on chemistry and application of chitin and its derivatives». Lodz. Poland. 24-26 сентября 2014 г;

14. **Шагдарова Б.Ц.**, Ильина А.В., Куликов С.Н., Варламов В.П. Получение модифицированных форм хитозана с повышенной растворимостью и антибактериальной активностью // Сборник тезисов докладов XIV Международной конференции молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии». Казань 13-14 мая 2015. с. 88;

15. **Шагдарова Б.Ц.**, Куликов С.Н. Действие производных хитозана на антибактериальную активность лизостафина и варнерина // X Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». Москва 27-30 октября 2015. с. 168-170;

16. Зубарева А.А., Лялина Т.С., **Шагдарова Б.Ц.**, Варламов В.П., Свирщевская Е.В. Анализ вне- и внутриклеточной локализации хитозана и его производных // Материалы XXVIII зимней научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва 8-11 февраля 2016 г. с 138;

17. Дрозд Н.Н., **Шагдарова Б.Ц.**, Ильина А.В., Варламов В.П. Нейтрализация кватернизированными производным хитозана антикоагулянтной активности плазмы морских свинок // Материалы III Конгресса гематологов России. Москва 14-16 апреля 2016 г. Гематология и трансфузиология. Т.61. с. 114-115;
18. Elena Svirshchevskaya, Anastasia Zubareva, **Balzhima Shagdarova**, Anastasia Savina, Valery Varlamov Penetration of quaternized chitosan into multicellular tissue spheroids // Materials of 3rd International Conference on Bio-Based Polymers and Composites. Szeged, Hungary, 28 Aug-1 Sept 2016. P.41.

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.х.н., проф. Варламову В.П. за всестороннюю поддержку, мудрые советы при выполнении диссертации, к.х.н. Ильиной А.В., к.х.н. Зубаревой А.А. за неоценимую помощь при планировании и выполнении работы, к.х.н. Лопатину С.А. за переданные знания и опыт практической работы, д.б.н. Дрозд Н.Н., к.б.н. Свирщевской Е.В., к.б.н. Куликову С.Н., к.х.н. Андрюшиной В.А. за предоставленную возможность и помощь в проведении биологических исследований, Чудиновой Ю.В. за проведение атомно-силовой микроскопии, Коноваловой М.В., Лялиной Т.С., Хантимировой Л.М. за дружескую поддержку и оказанное внимание. Автор выражает особую признательность своей семье за помощь и поддержку.