

ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬ N-КАРБОКСИАЦИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА

Сонин Д. Л.^{1,2}, Скорик Ю. А.^{3,4}, Васина Л. В.¹, Костина Д. А.^{1,5},
Малашичева А. Б.^{1,6}, Почкаева Е. И.¹, Васютина М. Л.^{1,7},
Костарева А. А.¹, Галагудза М. М.^{1,2}

Контактная информация:

Сонин Дмитрий Леонидович,
ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России
ул. Пархоменко, д. 15, лит. Б, Санкт-
Петербург, Россия, 194156.
Тел.: +7(812)702-51-68.
E-mail: sonin_dl@almazovcentre.ru

*Статья поступила в редакцию 07.06.2016
и принята к печати 10.06.16.*

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Северо-Западный Федеральный медицинский исследовательский
центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург,
Россия

² Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова»
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт высокомолекулярных соединений» Российской академии
наук, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Санкт-Петербургская государственная химико-
фармацевтическая академия» Минздрава России, Санкт-Петербург,
Россия

⁵ Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург,
Россия

⁶ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-
Петербург, Россия
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская
государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург,
Россия

Резюме

Цель исследования — изучение гемосовместимости N-сукцинил-хитозана (СХ) и N-глутарил-хитозана (ГХ). **Материалы и методы.** Влияние СХ и ГХ на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз оценивали в тестах на адгезию и индуцируемую агрегацию тромбоцитов крови человека, влияние на плазменный гемостаз — в тестах на АПТВ, ПВ и ТВ также с донорской кровью. Острую токсичность СХ и ГХ оценивали в эксперименте на наркотизированных крысах по влиянию внутривенного введения 1 % растворов СХ и ГХ на системную гемодинамику крысы и наличие гемолиза через час после введения. Оценку цитотоксичности проводили в МТТ-тесте на клеточной культуре HL-1. **Результаты.** Внутривенное введение растворов СХ и ГХ (молекулярная масса 83000, степень деацетилирования 0,93) в остром эксперименте на наркотизированных крысах не вызвало гемолиза, изменений в параметрах системной гемодина-

мики и частоте дыхания. В тестах с донорской кровью выявлены антикоагулянтные и антиагрегантные свойства производных хитозана. В тесте на цитотоксичность добавление СХ (степень замещения 0,85) в клеточную среду не влияло на жизнеспособность культуры клеток HL-1 в течении 3 суток инкубации, тогда как ГХ (степень замещения 0,71) в различных концентрациях (0,1 %, 0,01 % и 0,001 %) проявил токсичность при экспозиции двое суток и более. **Заключение.** Результаты свидетельствуют о низкой токсичности СХ и возможности его использования в биомедицинских целях и разработке на его основе парентеральных лекарственных форм. Выявленная токсичность ГХ не позволяет рекомендовать его использование для парентерального введения. Однако с учетом отсутствия влияния ГХ на системную гемодинамику целесообразна дальнейшая модификация ГХ для уменьшения влияния на функцию тромбоцитов и сохранения жизнеспособности клетки.

Ключевые слова: N-сукцинил-хитозан, N-глутарил-хитозан, гемосовместимость, гемодинамика, гемолиз

Для цитирования: Сонин Д.Л., Скорик Ю.А., Васина Л.В., Костина Д.А., Малашичева А.Б., Почкаева Е.И., Васютина М.Л., Костарева А.А., Галагудза М.М. Гемосовместимость n-карбоксиацильных производных хитозана. *Трансляционная медицина.* 2016; 3 (2): 80–88.

HEMOCOMPATIBILITY OF N-CARBOXYACYL DERIVATIVES OF CHITOSAN

Sonin D. L.^{1,2}, Skorik Yu. A.^{3,4}, Vasina L. V.¹, Kostina D. A.^{1,5}, Malashicheva A. B.^{1,6}, Pochkaeva E. I.¹, Vasyutina M. L.^{1,7}, Kostareva A. A.¹, Galagudza M. M.^{1,2}

¹ Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

³ Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

⁴ Saint Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, Saint Petersburg, Russia

⁵ Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

⁶ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

⁷ Saint Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Dmitriy L. Sonin,
Federal Almazov North-West Medical
Research Centre,
15-B Parkhomenko str., Saint Petersburg,
Russia, 194156
Phone: +7(812)702-51-68.
E-mail: sonin_dl@almazovcentre.ru

Received 07 June 2016 ; accepted 10 June 2016.

Abstract

Objective. To determine hemocompatibility of N-succinyl-chitosan (SC) and N-glutaryl-chitosan (GC). **Materials and methods.** Effect of SC and GC on the vascular-platelet hemostasis (adhesion and agonist-induced aggregation) and anticoagulation properties (APTT, PT and TT) of SC and GC was evaluated with donor blood. The acute toxicity of SC and GC was evaluated on anesthetized rats, which was subjected to intravenous administration of 1 % solutions of SC and GC. The effect on systemic hemodynamics and the presence of hemolysis was evaluated. Cell viability assay (MTT-test) in the presence of SC and GC was carried out with HL-1 cell line for evaluation of cytotoxic potential of chitosan derivatives. **Results.** Intravenous administration of aqueous solutions of SC and GC (molecular weight 83,000, deacetylation degree 0.93) in acute experiments on anesthetized rats did not cause hemolysis, changes in the parameters of systemic hemodynamics and respiratory

rate. The data from the platelet aggregation assays and the coagulation assays with human blood indicate that chitosan derivatives possess anticoagulant and antiplatelet properties. In the test for cytotoxicity (MTT-test) addition of SC (degree of substitution 0.85) in cell medium did not affect the viability of HL-1 cell culture within 3 days of incubation, while GC (degree of substitution 0.71) showed toxic effect after cell exposure to different concentrations (0,1 %, 0,01 % и 0,001 %) of the one after two days of incubation. **Conclusion.** The results show the low toxicity of SC and possibility of its use in biomedical applications and in the development on its base parenteral formulations. The observed toxicity of GC does not allow to recommend its parenteral administration. However, given the lack of influence of GC on the systemic hemodynamics, further modification of the GC is needed to reduce the effects on platelet function and cell viability.

Key words: N-succinyl-chitosan, N-glutaryl-chitosan, hemocompatibility, hemodynamics, hemolysis

For citation: Sonin DL, Skorik YuA., Vasina LV, Kostina DA, Malashicheva AB, Pochkaeva EI, Vasyutina ML, Kostareva AA, Galagudza MM. Hemocompatibility of N-carboxyacil derivatives of chitosan. Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2016; 3 (2): 80–88.

Введение

Хитозан, деацетилованное производное хитина, широко используется в биомедицинских целях благодаря наличию таких свойств, как низкая токсичность, биодegradуемость, биосовместимость, комплексообразующая и сорбционная способности [1, 2]. Наночастицы на его основе являются перспективными носителями для противоопухолевых препаратов [2, 3]. Однако возможность использования хитозана и его производных в качестве носителей лекарственных средств для доставки в зону ишемии-реперфузии миокарда остается малоизученной. Гипотеза основывается на том, что введенные внутривенно наночастицы хитозана с препаратом будут пассивно накапливаться в зоне ишемически-реперфузионного повреждения, где имеется повышенная проницаемость микрососудов. Такая схема лечения предполагает хорошую гемосовместимость носителя и комплекса «носитель-препарат»; при этом известно, что парентеральное введение хитозана и ряда его производных ограничено совместимостью с кровью. Так, немодифицированный хитозан вызывает агрегацию эритроцитов, гемолиз и активацию комплемента [4, 5], а некоторые производные используются как кровоостанавливающие средства [6, 7]. Модификация хитозана путем сульфатирования или получения производного с отрицательным зарядом позволяет избежать агрегации эритроцитов и активации гемостаза [1, 8].

В данной работе представлены результаты изучения гемосовместимости водорастворимых карбоксиацильных производных хитозана, N-сукцинил-хитозана (СХ) и N-глутарил-хитозана (ГХ). Ранее проводились эксперименты с внутривенным введением СХ с различной молекулярной массой (300 000 и более), в которых наблюдалось длительное присутствие вещества в крови и преимуще-

ственным накоплением в печени, микроциркуляторное русло которой характеризуется высокой проницаемостью [3, 9–11]. Сведений о гемосовместимости ГХ нами в литературе не обнаружено.

Известно, что сукцинат обладает антигипоксическим и цитопротективным эффектом, что реализуется в фармакологических препаратах (реамберин, цитофлавин, ремаксол). Ковалентно связанный с хитозаном в молекуле носителя сукцинат сохраняет свои защитные свойства. В то же время хитозан известен как антиоксидант, причем имеется обратная зависимость от молекулярной массы хитозана и выраженности его антиоксидантных свойств [12]. Недавно был продемонстрирован отопротективный эффект СХ с молекулярной массой 83000 и степенью деацетилирования (СД) 93 % в экспериментальной модели острой акустической травмы. Автор показал хороший слуховосстанавливающий эффект внутривенно вводимого СХ в сравнении с реамберином [13].

Целью данной работы явилось изучение влияния СХ и ГХ на параметры гемодинамики, систему гемостаза и наличие гемолиза при их внутривенном введении в остром эксперименте и на жизнеспособность клеток в тесте на цитотоксичность (МТТ-тест).

Материалы и методы

Все эксперименты проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального института здоровья № 85-23, США) и «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ».

Получение карбоксиацильных производных хитозана. СХ и ГХ получали из крабового хитозана (MW — 83000, СД — 0,93) по методике [14]

реакцией с соответствующим циклическим ангидридом в 1 % растворе уксусной кислоты. Образцы переводили в Na-форму добавлением 3 % раствора NaHCO_3 , диализовали против дистиллированной воды в течение трех суток и сушили лиофильно. Степень замещения определяли из данных элементного анализа, которая составила 0,85 (СХ) и 0,71 (ГХ). Для внутривенного введения использовали 1 % растворы СХ и ГХ, приготовленные растворением необходимого количества лиофильно высушенных образцов в физиологическом растворе. Стерилизацию растворов проводили фильтрацией через фильтры Millipore 0,2 мкм.

Оценка антикоагулянтных и антиагрегантных свойств. Кровь для исследования брали у доноров ($n = 5$), лиц обоего пола в возрасте 25–40 лет, не получавших в течение 7–10 дней препаратов, влияющих на функцию тромбоцитов. Для предотвращения активации тромбоцитов кровь брали в вакуумные пробирки, содержащие в качестве стабилизатора 3,8 % цитрат натрия (0,129 М) в соотношении цитрат Na/кровь 1/9. Влияние веществ на гемостатическую функцию тромбоцитов с помощью анализатора функции тромбоцитов PFA-100 («Dade Behring», Германия) определяли, смешивая 0,9 мл цельной донорской крови и 0,1 мл 1 % раствора СХ или ГХ (конечная концентрация полимера 0,1 %). После 5 мин инкубации при комнатной температуре 0,8 мл смеси вносили в индивидуальный картридж коллаген/АДФ (сADP-тест), после чего определяли время образования тромбоцитарной пробки на анализаторе тромбоцитов PFA-100.

Агрегацию тромбоцитов исследовали с помощью импедансного 4-канального агрегометра (модель 590 Whole Blood Aggregometer, Chrono-Log corporation, USA). В качестве индуктора агрегации использовали коллаген, АДФ и арахидоновую кислоту (Chrono-par reagents, Chrono-Log corporation, USA). Влияние веществ на индуцированную агрегацию тромбоцитов определяли, смешивая в кювете 0,9 мл цельной донорской крови и 0,1 мл исследуемого соединения (конечная концентрация 0,1%). Индукторы вносили в кювету через 5 минут инкубации смеси при $+37^\circ\text{C}$. Агрегацию регистрировали до выхода кривой на плато.

Антикоагулянтные свойства веществ оценивались по способности удлинять время свертывания бедной тромбоцитами плазмы (по сравнению с контролем) при добавлении их в плазму в тестах АПТВ (активированное парциальное тромбопластиновое время), ПВ (протромбиновое время) и ТВ (тромбиновое время). Выбирали доноров с нормальными показателями ПВ, АПТВ и активностью фактора Виллебранда. Исследования проводили на авто-

матическом анализаторе гемостаза STA Compact (Roche Diagnostics, Швейцария). Использовали наборы реагентов для определения АПТВ (STA АРТТ), ПВ (STA Neoplastin Plus) и ТВ (STA Thrombin, Roche Diagnostics, Швейцария). 0,5 мл 1 % раствора СХ или ГХ смешивали с 0,5 мл бедной тромбоцитами плазмы (конечная концентрация полимера 0,5 %) и определяли время свертывания на анализаторе в тестах АПТВ, ПВ и ТВ. Дополнительно определяли протромбиновый индекс (ПИ) и международное нормализованное отношение (МНО).

Оценка гемодинамических параметров. Крысам-самцам стока «Вистар» (250 ± 25 г, $n = 13$), наркотизированным тиопенталом натрия (50 мг/кг, внутривенно), внутривенно за 10 мин вводили 1 % растворы СХ ($n = 5$) и ГХ ($n = 8$) в объеме 1 мл через катетер, установленный в бедренной вене. Эксперименты проводились в условиях спонтанного дыхания животных. Температура тела животного поддерживалась в пределах $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Артериальное давление (АД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) непрерывно измеряли с помощью датчика давления (Baxter, США) через катетер, введенный в общую сонную артерию, и регистрировали на персональном компьютере с помощью программного обеспечения PhysExp X4 (ООО «Кардиопротект», Россия) [15]. Наблюдение и регистрацию гемодинамических параметров после введения тестируемых соединений вели в течение одного часа. Мониторировали электрокардиограмму в стандартных отведениях (Кардиотехника-8, ЗАО «Инкарт», Россия). В конце эксперимента у крыс забирали венозную кровь. Для получения плазмы кровь стабилизировали гепарином (10 Ед/см³) и центрифугировали (15 мин, 2000 об/мин). Плазму и клетки крови хранили в отдельных пробирках. Данные представляли в виде «среднее \pm стандартное отклонение». Статистический анализ был выполнен с использованием теста Уилкоксона. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

Оценка цитотоксичности. Оценку цитотоксичности проводили в МТТ-тесте и по наличию гемолиза в крови крыс через час после введения тестируемых полимеров.

Тест на гемолиз. Количественное определение гемоглобина в плазме проводили фотометрически на колориметре КФК-2МП в стеклянной кювете с длиной оптического пути 10 мм, с использованием зеленого светофильтра (540 нм).

МТТ-тест проводили согласно методу, описанному Niks M. и Otto M. [16]. Клеточную культуру HL-1 культивировали при 37°C , влажной среде с содержанием 5 % CO_2 . Для культивирования клеток использовалась среда Clicom medium с до-

Таблица 1. Влияние СХ и ГХ на время образования тромбоцитарной пробки в сADP-тесте (n=5).

Вещество	Время наступления агрегации (с)
Контроль	102 ± 5
СХ	192 ± 5*
ГХ	183 ± 5*

* — p < 0,05 в сравнении с контролем,

Таблица 2. Результаты теста на антиагрегантную активность производных хитозана с АДФ, коллагеном и арахидоновой кислотой (n=5).

Параметр	Контроль	СХ	ГХ
АДФ (Ом) N 6-24	9,6±1,1	6,2±1,1	0,0*
Коллаген (Ом) N 15-27	13,1±0,8	14,0±1,6	0,0*
Арахидоновая кислота (Ом) N 5-17	10,0±0,7	8,8±0,8	0,0*

* — p < 0,05 в сравнении с контролем.

Таблица 3. Антикоагулянтная активность производных хитозана (n=5).

Параметр	Контроль	СХ	ГХ
АЧТВ, с	32,2±1,5	47,1±1,3*	28,8±1,2
ПВ, с	13,0±0,9	18,0±0,8*	15,4±0,7
ПИ, %	98,2±1,8	55,2±1,6*	71,4±1,7*
МНО	1,0±0,1	1,5±0,2	1,2±0,1
ТВ, с	17,1±1,1	14,3±1,0	14,1±1,1

* — p < 0,05 в сравнении с контролем.

Таблица 4. Влияние СХ и ГХ на параметры системной гемодинамики и частоту дыхательных движений.

	СХ (n = 5)			ГХ (n = 8)		
	САД	ЧСС	ЧДД	САД	ЧСС	ЧДД
Исходно	148±12	401±96	79±12	132±25	413±75	86±18
Начало введения	150±11	428±5	82±13	132±23	414±77	80±14
Окончание введения	152±12	432±54	82±14	136±12	410±88	84±15
5 мин. после введения	144±14	431±67	89±21	128±27	404±72	82±12
60 мин. после введения	126±15	414±62	88±20	105±25	375±57	83±23

Примечание: САД — среднее артериальное давление, мм рт. ст., ЧСС — частота сердечных сокращений, уд./мин., ЧДД — частота дыхательных движений, частота в мин.

бавлением 10% Fetal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific). Количество клеток в каждой лунке 96-луночного планшета составляла 80 тыс. Через 24 часа после посева сменяли среду на 90 мкл среды и 10 мкл физиологического раствора, содержащего соответствующее количество исследуемых веществ. Оценивались следующие концентрации карбоксициальных производных хитозана: 0,001 %, 0,01 % и 0,1 % (конечные концентрации в лунках). Затем через 24, 48, 72 часа экспозиции с исследуемым веществом среду меняли на раствор МТТ (Sigma) 5 мг/мл. В качестве растворителя использовали PBS. Через 2 часа удаляли раствор, содержащий МТТ и лизировали клетки с помощью DMSO (Вектон), добавляя по 100 мкл в каждую лунку. Через 15 мин измеряли оптическую плотность клеток, окрашенных МТТ с использованием спектрофотометра Biogad, длина волны 550 нм. Вычитали фон — оптическую плотность вещества и растворителя в каждой концентрации без клеток. Сравнивали с оптической плотностью необработанных клеток. Угнетение жизнедеятельности клеток регистрировалось по снижению оптической плотности. Все исследования проводили в трипликатах. Данные представляли в виде «среднее ± стандартное отклонение». Статистический анализ был выполнен с использованием теста Стьюдента. Отличия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Оценка гемосовместимости CX и GX in vitro

Влияние CX и GX на агрегацию тромбоцитов.

В результате проведенного исследования получены данные, свидетельствующие о том, что CX и GX обладают одинаковыми антиадгезивными свойствами, но при этом оказывают противоположный эффект в тестах индуцированной агрегации тромбоцитов (табл. 1 и 2). Установлено, что *in vitro* CX и GX при концентрации 0,1 % демонстрируют ингибирующее влияние на адгезию тромбоцитов к коллагену в сADP-тесте, сходное с эффектом аспирина. При этом отмечаются различные эффекты CX и GX по влиянию на агрегацию тромбоцитов в тестах с АДФ, коллагеном и арахидоновой кислотой, а именно: отсутствие значимых по сравнению с контролем различий у CX и тотальное ингибирование агрегации GX, что может быть обусловлено прямым действием на наружную мембрану тромбоцитов, а также на мембраны внутриклеточных структур.

Влияние CX и GX на коагуляцию. При изучении влияния тестируемых веществ на плазменный гемостаз с использованием автоматического анализатора гемостаза выявлено, что производные хитозана проявляли антикоагулянтные свойства (табл. 3).

При этом антикоагулянтный эффект CX был более выраженным по сравнению с GX.

Оценка гемосовместимости CX и GX in vivo

Влияние CX и GX на гемодинамику. Результаты влияния CX и GX на гемодинамические показатели при их внутривенном введении представлены в табл. 4. Исходные параметры не различались между группами. Во всех группах животных не было выявлено значимого изменения гемодинамических параметров и ЧДД в течение всего времени наблюдения; также не наблюдалось изменений на электрокардиограмме. Небольшое снижение АД в ходе часового наблюдения объясняется закономерным снижением АД наркотизированного животного, которое наблюдается в контроле.

Тест на наличие гемолиза. Через час после введения производных хитозана, по окончании физиологической части эксперимента, оценивали наличие гемолиза фотометрически. Оптическая плотность всех растворов находилась на уровне погрешности измерения ($A < 0,02$) и значимо не отличалась от контрольной группы, что свидетельствует об отсутствии гемолиза при системном введении 1 % растворов CX и GX.

Оценка цитотоксических свойств CX и GX на культуре клеток

При добавлении любой концентрации CX (0,001 %, 0,01 % и 0,1 %) к культуре клеток их жизнеспособность не уменьшалась (см. рис. 1) через 24, 48 и 72 часа от начала экспозиции в МТТ-тесте. GX в тех же дозах достоверно снижал жизнеспособность клеток через 48 и 72 часа (см. рис. 2).

Обсуждение

Физико-химические и биологические свойства производных хитозана зависят от молекулярной массы полимера, степени деацетилирования, типа и степени функционализации. Для получения карбоксициальных производных в данной работе использовали низкомолекулярный (ММ 83000) хитозан с высокой степенью деацетилирования 0,93 %. Для биологических экспериментов использовали образцы CX и GX с высокой степенью замещения (0,85 и 0,71 соответственно), хорошо растворимые в воде. Ранее было показано, что наночастицы, полученные ионным гелированием CX со степенью замещения 0,80, характеризуются хорошей гемосовместимостью и могут использоваться для доставки доксорубина в опухоль [11]. Известно, что хитозан ускоряет время свертывания крови и усиливает высвобождение тромбоцитами тромбоцитарного фактора роста и трансформирующего фактора

Рисунок 1.

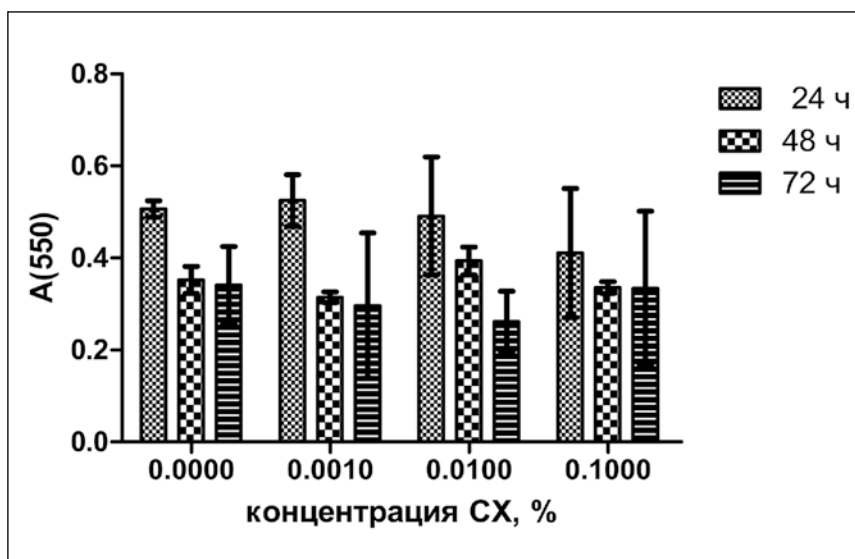
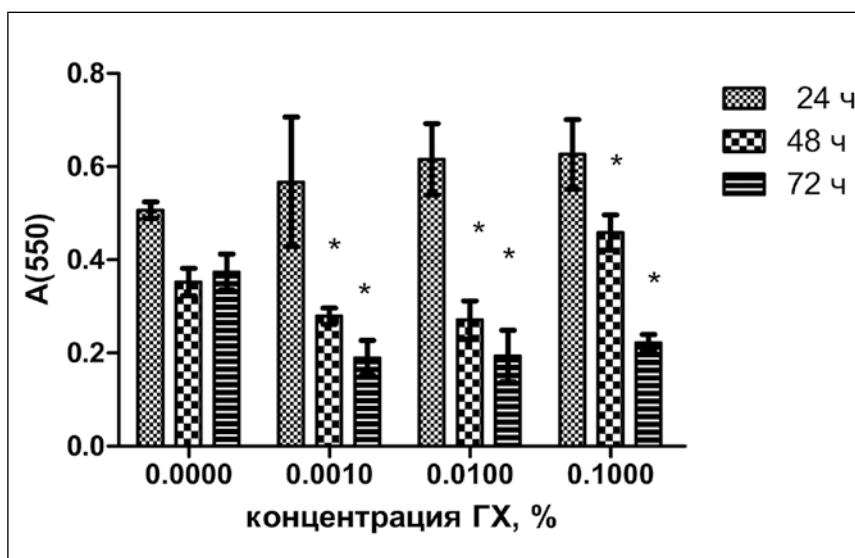


Рисунок 2.



роста-β1 [7]. Возможный механизм прямой активации тромбоцитов и агрегации связан с разрушением тромбоцитарной мембраны. В отличие от хитозана, ряд его производных, например, сульфатированный хитозан, обладают гепариноподобными свойствами [17], что подтверждено в настоящем исследовании также в отношении CX. Вероятный, механизм антикоагуляции объясняется связыванием производных хитозана с белками плазмы и изменением их активных центров. CX и GX, подобно аспирину, уменьшают адгезию тромбоцитов, но по выраженности влияния на индукцию агрегации тромбоцитов производные хитозана сильно различаются. CX достоверно ее не уменьшает, а GX totally ингибирует, что, вероятно, связано с взаимодействием GX с мембранными структура-

ми тромбоцитов. Возможно, этот же эффект вызвал снижение жизнеспособности клеток в культуре на вторые сутки после добавления GX к культуральной среде в МТТ-тесте.

Отсутствие изменений системной гемодинамики подтверждает данные, полученные *in vitro* об отсутствии активации тромбоцитов и плазменных прокоагулянтов. Известно, что формирование тромбов в венах большого круга кровообращения ведет к гемодинамическим нарушениям, которые могут проявляться резким падением АД с изменениями ЧСС и ЧДД.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии острой цитотоксичности CX. Эти результаты согласуются с полученными ранее в тестах *in vitro*, в которых показано, что наноча-

стицы СХ не вызывают гемолиза эритроцитов и не снижают жизнеспособность клеток в МТТ-тесте [11]. Результаты, полученные в МТТ-тесте с ГХ не противоречат данным по влиянию ГХ на индуцированную агрегацию. Цитотоксический эффект ГХ, вероятно связан с взаимодействием ГХ с мембраной клеток и изменением ее функции, что проявилось при оценке индуцируемой агрегации тромбоцитов в ее тотальном ингибировании. Необходима дальнейшая модификация ГХ для уменьшения его влияния на жизнеспособность клетки.

Заключение

В настоящей работе получены данные о цитотоксичности ГХ и подтверждены ранее полученные данные об ее отсутствии у СХ. Цитотоксичность ГХ возможно, связана с взаимодействием ГХ с мембраной клеток и изменением ее функции, что проявилось в МТТ-тесте и при оценке индуцируемой агрегации тромбоцитов в ее тотальном ингибировании. Оба карбоксициальных производных хитозана оказывают аспириноподобный эффект на адгезию тромбоцитов и антикоагулянтный эффект, причем СХ в большей степени, чем ГХ. Внутривенное введение СХ и ГХ не сопровождается гемолизом и не влияет на системную гемодинамику у наркотизированных крыс в остром эксперименте. Результаты исследования обосновывают дальнейшее использование СХ в разработке наноразмерных носителей для направленной доставки лекарственных средств. ГХ требует дальнейшей модификации с последующим биологическим тестированием для поиска меньшей цитотоксичности.

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-15-00473).

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Berezin AS, Lomkova EA, Skorik YuA. Chitosan conjugates with biologically active compounds: design strategies, properties, directed transport to the biological target. *Izvestija Akademii nauk. Serija himicheskaja = Russian Chemical bulletin*. 2012; 61(4): 778-793. In Russian. [Березин А. С, Ломкова Е. А, Скорик Ю. А. Конъюгаты хитозана с биологически активными соединениями: стратегии конструирования, свойства, направленный транспорт к биомишени. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2012; 61(4): 778-793].

2. Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010; 62(1): 28-41.

3. Kato Y, Onishi H, Machida Y. Contribution of chitosan and its derivatives to cancer chemotherapy. *In Vivo*. 2005; 19(1): 301-310.

4. Carreno-Gómez B, Duncan R. Valuation of the Biological Properties of Soluble Chitosan and Chitosan Microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997; 148(2): 231-240.

5. Minami S, Suzuki H, Okamoto Y, Fujinaga T, Shigemasa Y. Chitin and chitosan activate complement via the alternative pathway. *Carbohydrate Polymers*. 1998; 36: 151-155.

6. Samohvalov IM, Golovko K.P, Reva VA et al. The use of local hemostatic agent "Celox" in experimental model of massive mixed external bleeding. *Vestnik Rossijskoj voenno-medicinskoj akademii=Journal of russian military medical academy*. 2013; 4(44): 187-191. In Russian. [Самохвалов И. М, Головко К. П, Рева В. А. и др. Применение местного гемостатического средства «Celox» в экспериментальной модели массивного смешанного наружного кровотечения. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2013; 4(44): 187-191].

7. Okamoto Y, Yano R, Miyatake K, et al. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate Polymers*. 2003; 53(3): 337-342.

8. Vikhoreva G, Bannikova G, Stolbushkina P, et al. Preparation and anticoagulant activity of low-molecular-weight sulfated chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2005; 62(4): 327-332.

9. Kamiyama K, Onishi H, Machida Y. Biodisposition characteristics of N-succinyl-chitosan and glycol-chitosan in normal and tumor-bearing mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 1999; 22(2): 179-186.

10. Kato Y, Onishi H, Machida Y. Lactosaminated and intact N-succinyl-chitosans as drug carriers in liver metastasis. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001 226(1-2): 93-106.

11. Zubareva A. A, Shcherbinina T. S, Varlamov V. P. Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives. 2014; 19: 145-154.

12. Dasha M, Chiellina F, Ottenbriteb R. M, Chiellina E. Chitosan — A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2011; 36: 981-1014.

13. Panevin A. A. Slugbottomoffset the effect of N-succinyl-chitosan in a model of acute acoustic subparagtagh impact. *Rossijskaja otorinolaringologija = Russian otorhinolaryngology*. 2015; 3: 107-110. In Russian. [Паневин А. А. Слуховосстанавливающий эффект N-сукцинил-хитозана в условиях модели острого акустического субповреждающего воздействия. *Российская оториноларингология*. 2015; 3: 107-110].

14. Hirano S, Moriyasu T. N-(Carboxyacyl)chitosans. *Carbohydrate Research*. 1981; 92(2): 323-327.

15. Korolev D. V, Aleksandrov I. V, Galagudza M. M. i dr. Automation of data acquisition and processing of physiological experiment. *Regionarnoe krovoobrashhenie i mikrocirkuljacija = Regional haemodynamics and microcirculation*. 2008; 7(2): 79-84. In Russian. [Королев Д. В, Александров И. В, Галагудза М. М. и др. Авто-

матизация получения и обработки данных физиологического эксперимента. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2008; 7(2): 79-84].

16. Niks M, Otto M. Towards an optimized MTT assay. *Journal of Immunological Methods*. 1990; 130(1): 149-151.

17. Huang R, Du Y, Yang J, et al. Influence of functional groups on the in vitro anticoagulant activity of chitosan sulfate. *Carbohydrate Research*. 2003; 338(6): 483-489.

Информация об авторах

Сонин Дмитрий Леонидович — кандидат медицинских наук, заведующий НИЛ метаболизма миокарда ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ассистент кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России;

Скорик Юрий Андреевич — доктор химических наук, заведующий лабораторией природных полимеров ФГБНУ «ИВС» РАН;

Васина Любовь Васильевна — доктор медицинских наук, старший научный сотрудник НИЛ микроциркуляции Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Костина Дарья Алексеевна — аспирант ФГАОУ ВО «СПбПУ», младший научный сотрудник Группы генно-клеточной инженерии, Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Малашичева Анна Борисовна — кандидат биологических наук, заведующая НИЛ Молекулярной кардиологии, Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, доцент кафедры эмбриологии, биологического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»;

Почкаева Евгения Игоревна — младший научный сотрудник, НИЛ математического моделирования и НИЛ метаболизма миокарда Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Васютина Марина Львовна — аспирант кафедры биологической химии и физиологии ФГБОУ ВО «СПбГВМУ», младший научный сотрудник Научно-исследовательской группы экспериментальной патоморфологии, ветеринарный врач Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Костарева Анна Александровна — кандидат медицинских наук, директор института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Галагудза Михаил Михайлович — доктор медицинских наук, профессор РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, профессор кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И.П.Павлова» Минздрава России.

Author information

Dmitriy L. Sonin, MD, Candidate of medical sciences, Head of the Laboratory of Myocardial Metabolism, Institute

of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Assistant professor at the Department of Pathophysiology, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg;

Yury A. Skorik, DSc (Chemistry), Head of the Laboratory of Natural Polymers, Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences;

Lyubov V. Vasina, MD, Dr. Med. Sci., Senior Researcher, Laboratory of Microcirculation, Institute of Experimental Medicine of Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Darya A. Kostina, PhD student, Saint-Petersburg University n.a. Peter the Great (SPPU), Junior Researcher, Research Group of Genetic Cell Engineering, Institute of Molecular Biology and Genetics, Federal Almazov North-West Medical Research Centre

Anna B. Malashicheva, PhD, Group Leader of Molecular Cardiology Lab, Institute of Molecular Biology and Genetics, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Associate Professor at Department of Embryology, Saint Petersburg State University.

Evgeniya I. Pochkaeva, Junior Researcher, Laboratory of Mathematical Modeling, Laboratory of Myocardial Metabolism of Federal Almazov North-West Medical Research Centre

Marina L. Vasyutina, Postgraduate Student, Department of Biological Chemistry and Physiology of Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, junior researcher of Experimental Patomorfology Research Group and vivarium veterinarian of Institute of Experimental Medicine of Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Anna A. Kostareva, MD, PhD, Director of the Institute of Molecular Biology and Genetics, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Michael M. Galagudza — MD, Dr. Med. Sci., Professor of Russian Academy of Science, Director of the Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre; Professor at the Department of Pathophysiology, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg.