

III. МЕДИЦИНА И ВЕТЕРИНАРИЯ

III. MEDICINE AND VETERINARY MEDICINE

ПОЛУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ СОЛЕЙ ХИТОЗАНА, ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ТОКСИЧНОСТИ И РАДИОЗАЩИТНОГО ЭФФЕКТА

*Г.Е. Банникова**, *В.П. Варламов**, *И.Е. Андрианова***, *В.А. Глушков***

*Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, E-mail: varlamov@biengi.ac.ru

**Государственный научный центр – Институт биофизики МЗ РФ, Москва,
E-mail: ibphgen@srcibph.ru

PREPARATION SOME CHITOSAN SALTS, INVESTIGATION OF ITS TOXICITY AND RADIOPROTECTIVE EFFICIENCY

*G.E. Bannikova**, *V.P. Varlamov**, *I.E. Andrianova***, *V.A. Glushkov***

*Centre "Bioengineering" of Russian Academy of Science, Moscow,
E-mail: varlamov@biengi.ac.ru

**State Research Centre – Institute of Biophysics, Ministry of Health, Moscow,
E-mail: ibphgen@srcibph.ru

ABSTRACT

The preparation some chitosan salts (molecular mass 10 kDa) and its radioprotective efficiency in mice experiments were investigated. The results showed a similar toxicity different chitosan salts. It was founded that chitosan hydrochloride and acetate had near radioprotective properties, the survival of mice increased up to 55–71.4% respectively at intravenous injection 15–30 min before a whole-body exposure to γ -irradiation at dose of 8 Gy ($LD_{97/30}$).

На протяжении многих лет в Институте биофизики проводились работы по изучению противолучевых свойств и механизма действия природного биополимера хитозана высокомолекулярного (65–70 кДа), завершившихся созданием на его основе лекарственных препаратов РС-10 и РС-11. Эти препараты представляли собой монохлорацетат и ацетат хитозана. Однако в процессе их наработки выявилась неполная идентичность отдельных серий по молекулярной массе (ММ), токсичности и эффективности, что явилось одной из причин прекращения выпуска препаратов. Разработка новой технологии получения низкомолекулярного хитозана ферментативным гидролизом возродила интерес к изучению радиопротекторных свойств этого полимера. Было установлено, что ацетат хитозана со средневязкостной молекулярной массой M_n 30 и 10 кДа, вводимый за 10–30 мин до облучения в дозе, близкой к абсолютно летальной, способствует выживанию

85–100% защищенных мышей. При дальнейшем снижении M_n до 5 кДа наступала практически полная потеря его противолучевой активности [1–3].

Известно, что при хранении ацетата хитозана в сухом виде происходит самопроизвольное удаление кислоты с одновременной дегидратацией кристаллов хитозана. Процесс этот зависит от влажности образца и, вероятно, является следствием конформационной стабилизации молекулы хитозана [4], с чем может быть связано ухудшение его растворимости при хранении.

Цель дальнейших исследований – сравнительное изучение биологической активности различных солей хитозана низкомолекулярного и выбор образцов, обладающих (при наименьшей токсичности и максимальной противолучевой активности) лучшей растворимостью, большей устойчивостью при хранении и простой получения.

Экспериментальная часть

В работе использовали низкомолекулярный хитозан, полученный ферментативным гидролизом крабового хитозана. Характеристическая вязкость определена в растворителе: 2%-ная уксусная кислота : 0,2 М натрийацетат – 1:1, при 25 °С и средневязкостная молекулярная масса M_n посчитана по уравнению $[\eta] = 1,38 \cdot 10^{-4} \cdot M_n^{0,85}$ (для степени дезацетилирования 85%) [5]. Образец имел характеристическую вязкость $[\eta] = 0,34$ дл/г, степень дезацетилирования 85% и M_n 10 кДа. Степень дезацетилирования определяли по методике, описанной в работе [6]. На основе этого образца был получен набор солей – хлоргидрат, аскорбат, глутамат, сукцинат.

Приготовление растворов солей хитозана. К раствору 2,5 г хитозана в 100 мл воды добавляли раствор 1 М NaOH до pH 9–10, выпавший осадок отделяли центрифугированием. К осадку добавляли при перемешивании дистиллированную воду (100 мл). Суспензию диализовали против дистиллированной воды (8 л) в течение ночи и высушивали лиофильно. Для приготовления растворов солей брали навеску хитозана с учетом поправочного коэффициента (300 мг при коэффициенте 1) и добавляли 1 мл воды и 5 мл 1 М кислоты небольшими порциями при перемешивании до полного растворения хитозана. Полученные растворы диализовали против воды (3 раза по 1 л). Часть 5%-ных растворов использовали для определения острой токсичности и радиозащитного эффекта без дальнейшей обработки, часть высушивали лиофильно и растворы готовили из лиофильно высушенной соли хитозана.

Расчет поправочного коэффициента:

масса звена хитозана со свободной аминогруппой для степени дезацетилирования 85% $(203,2 \cdot 0,15) + (161 \cdot 0,85) = 167,33$, N-ацетилглюкозамин глюкозамин;

масса звена хитозана с анионом кислоты $(161 + A) \cdot 0,85 + 30,48$, где А – анион кислоты.

Таблица 1. Поправочный коэффициент для приготовления растворов хитозана

Кислота	Молекулярная масса	Масса звена хитозана с анионом	Поправочный коэффициент
Уксусная	60,05	218,37	1
Соляная	36,5	198,35	0,91
Янтарная	118,09	267,70	1,23
L-Глутаминовая*	147,13	292,40	1,34
Аскорбиновая	176,1	317,02	1,45

*Из-за ограниченной растворимости L-глутаминовой кислоты в воде ее использовали в 0,25 М концентрации.

Острая токсичность солей хитозана изучена на мышах при внутривенном введении. Срок наблюдения составил 15 суток. Параметры токсичности вычисляли по методу наименьших квадратов.

Проведенными исследованиями установлено, что изученные соли хитозана оказались близкими по токсичности (табл. 2). Величина СД₅₀ колебалась в пределах 88–135 мг/кг. Выявлено лишь незначительное уменьшение токсических свойств у аскорбата.

Таблица 2. Острая токсичность для мышей (мг/кг) различных солей хитозана при внутривенном введении

Соль	СД ₅₀	СД ₁₆	СД ₈₄
Ацетат	111,8	52,9	170
Хлоргидрат	122,7	77,3	168,2
Аскорбат	134,8	97,8	171,9
Аскорбат (в виде 5%-ного раствора)	>250 (не наблюдали гибель мышей при дозах 120, 150, 180 и 250 мг/кг)		
Глутамат	87,7	59,1	116,3
Глутамат (в виде 5%-ного раствора)	143	102,8	182,8
Сукцинат	104,8	83,0	126,5
Сукцинат (в виде 5%-ного раствора)	124,6	99,6	149,6

Образцы в виде 5%-ных растворов не подвергались лиофильному высушиванию.

Противолучевые свойства. Мыши подвергались однократному тотальному облучению γ -лучами ¹³⁷Cs на источнике ИГУР с мощностью 2,08 рад/с в дозе 8 Гр.

Соли хитозана растворяли в изотоническом растворе NaCl и вводили однократно внутривенно за 10–30 мин до лучевого воздействия. Показателями эффективности служили выживаемость и средняя продолжительность жизни павших мышей.

Изучение противолучевых свойств солей хитозана показало, что все они обладают радиозащитным действием при введении в оптимальных дозах за короткий срок до облучения (табл. 3). При этом эффективность ацетата, хлоргидрата и сукцината была приблизительно одинаковой. Выживаемость защищенных мышей повышалась до 55–71,4% (в контроле 2,7%). Меньший эффект наблюдался при введении глутамата и аскорбата (33 и 25% соответственно).

Таблица 3. Эффективность солей хитозана в опытах на мышах при введении внутривенно за 15–30 мин до облучения в дозе 8 Гр

Название соли	Доза, мг/кг	Кол-во мышей	Выжило		Средняя продолжительность жизни павших, сут
			абс.	%	
Ацетат	50	29	19	65,5*	12,0
Хлоргидрат	30-50	28	20	71,4*	10,3
Сукцинат	40	31	17	54,8*	12,0
Глутамат	40	30	10	33,3*	10,0
Аскорбат	40-50	20	4	25*	13,9
Контроль	–	74	2	2,7	10,3

*Различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$.

Полученные данные свидетельствуют, что различные соли хитозана низкомолекулярного в той или иной степени способствуют повышению радиорезистент-

ности облученных животных. Аналогичные результаты были получены ранее и для хитозана с более высокой ММ [7]. Наибольшая активность отмечена у трех солей (ацетат, хлоридрат и сукцинат), среди которых по совокупности показателей (соотношение токсичность/эффективность) преимуществом обладает хлоридрат. Кроме того, было установлено, что эта соль по сравнению с ацетатом лучше хранится: характеристическая вязкость образцов хлоридрата и их растворимость практически не изменяется в течение 120 дней [8]. Противолучевые свойства субстанции хитозана хлоридрата сохраняются, по нашим данным, в течение 2 лет. Другие соли (аскорбат, глутамат) помимо меньшей активности хуже растворяются, что затрудняет их практическое использование. В связи с изложенным хлоридрат является наиболее перспективной солью хитозана низкомолекулярного для создания на его основе нового противолучевого средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Варламов В.П., Ильина А.В., Банникова Г.Е., Немцев С.В., Ильин Л.А., Чертков К.С., Андрианова И.Е., Платонов Ю.В., Схрябин К.Г. Способ получения низкомолекулярного хитозана для противолучевых препаратов. Пат. РФ № 2188829. 2002.
2. Ильин Л.А., Андрианова И.Е., Глушков В.А. Изучение зависимости радиозащитной активности хитозана от его молекулярной массы // Радиационная биология. Радиозащита. 2004. Т.44, № 2. С. 176–178.
3. Ильин Л.А., Андрианова И.Е., Глушков В.А., Банникова Г.Е., Варламов В.П. Лечебно-профилактические свойства низкомолекулярного хитозана при экспериментальном лучевом поражении // Радиационная биология. Радиозащита. 2004. Т. 44, № 5. С. 547–549.
4. Ogawa K., Kavada J., Yui T., Okuyama K. Crystalline behavior of chitosan / Advan. Chitin Sci., M.G. Peter, F.Domard and R.A.A.Muzzarelli, eds. 1999. V. 4. P. 324–329.
5. Gamzazade A.I., Shlimak V.M., Skljar A.M., Shtukova E.V., Pavlova S.S.A., Rogozhin S.V. Investigation of the hydrodynamic properties of chitosan solutions // Acta Polymerica. 1985. V. 36, № 8. P. 420–424.
6. Гамзазаде А.И., Скляр А.М., Рогожин С.В. Некоторые особенности получения хитозана // ВМС (А). 1985. Т. 27, № 6. С. 1179–1184.
7. Разоренова В.А., Шокин В.Н., Андрианова И.Е., Шапошников Г.И. Радиозащитное действие некоторых солей препарата РС-10 // Бюл. радиац. мед. 1968. № 3. С. 18–24.
8. Банникова Г.Е., Ильина А.В., Варламов В.П. Некоторые свойства солей низкомолекулярного хитозана в растворах и в сухом виде / Матер. Шестой конференции “Новые достижения в исследовании хитина и хитозана”. М.: ВНИРО. 2001. С. 265–269.