

Влияние ультрадисперсных систем на основе комплексов сукцинамида хитозана с коллоидными частицами йодида серебра на иммунологическую реактивность

Л.А. Шарафутдинова¹, М.В. Базунова¹, Е.И. Кулиш¹, Н.Н. Курчатова²,
В.Г. Шамратова¹, З.Р. Хисматуллина¹, М.Р. Даминов¹

¹ – ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа

² – Всероссийский центр глазной и пластической хирургии МЗ РФ, Уфа

Контактная информация: Шарафутдинова Люция Ахтямовна, sharafla@yandex.ru

В статье представлены результаты исследования влияния натриевой соли – сукцинамида хитозана (СХТЗ) (5%) и дисперсий СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра СХТЗ:AgI (исходная концентрация СХТЗ – 5%, в объемном соотношении исходных компонентов 1:1) на активационные процессы иммунокомпетентных клеток человека *in vitro*. Показано, что растворы СХТЗ и дисперсии СХТЗ:AgI повышают фагоцитарно-метаболические характеристики нейтрофилов, вызывают умеренное повышение экспрессии активационных рецепторов CD25+, CD95+ и HLA-DR+ на лимфоцитах, увеличивают пролиферативную активность лимфоцитов наряду с возрастанием количества клеток с внутриклеточными признаками апоптоза.

Ключевые слова: хитозан, коллоидные частицы йодида серебра, фагоцитарная активность лейкоцитов, пролиферативная активность лимфоцитов.

Введение

В последние годы активно ведутся исследования по созданию систем направленной доставки лекарственных препаратов пролонгированного действия. В качестве матриц для создания таких систем часто используются наноразмерные системы на основе природных и синтетических биodeградируемых биосовместимых полимеров, в т.ч. хитозана (ХТЗ) и его производных [2, 12, 13, 16].

Одним из подходов к созданию стабильных наноструктурированных дисперсных систем с регулируемыми размерами может быть использование способности макромолекул к самосборке путем межмолекулярной ассоциации через нековалентные связи – на приме-

ре полимер-коллоидных комплексов (ПКК) ХТЗ и его производных (например, натриевой соли сукцинамида хитозана, СХТЗ) с неорганическими коллоидными частицами лиофобных зольей (например, золя йодида серебра) [14]. Результаты многочисленных исследований показывают, что препараты на основе полисахаридов проявляют иммуномодулирующее, антибактериальное, антиоксидантное, гипOLIпидемическое, ранозаживляющее действие [3, 4, 6, 8, 21].

Коллоидные неорганические частицы лиофобных зольей могут выступать в качестве ядра при капсулировании малорастворимых лекарственных веществ с использованием нано- и микроразмер-

ных контейнеров. Для материалов на основе наноразмерных частиц серебра и его соединений возможен широкий спектр медицинского применения [17, 18]. Так, известно, что в низких дозах наночастицы серебра стимулируют восстановительные процессы в тканях живых организмов, улучшают энергетический обмен, обладают хорошим иммуномодулирующим и антибактериальным действием [29]. Более перспективными для применения являются галогениды серебра – в частности, йодид серебра, частицы которого отличаются отсутствием мутагенного действия и не оказывают дестабилизирующего действия на мембраны клеток [23].

Целью данной работы явилось исследование влияния образцов р-ров СХТЗ и СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра на активационные процессы иммунокомпетентных клеток человека.

В настоящей работе представлены результаты исследования иммуномодулирующих свойств гибридных полимерных комплексов на основе натриевой соли – сукцинамида хитозана. В качестве модельных систем для исследования биологических свойств исследуемых соединений использована *культура мононуклеаров периферической крови человека*. Проведены сравнительные исследования фагоцитарно-метаболических характеристик нейтрофильного звена иммунитета как важного показателя неспецифической резистентности организма, количественной оценки пролиферативной активности лимфоцитов и апоптоза. Оценка действия указанных соединений на функцию иммунокомпетентных клеток человека может

быть полезна с точки зрения расширения представлений об иммуотропных свойствах полимер-коллоидных комплексов СХТЗ и СХТЗ с золей AgJ.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали СХТЗ с $M_n = 207$ кДа и характеристической вязкостью $[\eta] = 3,60$ дл/г (ТУ 9284-027-11734126-08) производства ЗАО «Биопрогресс» (г. Щелково, Россия).

Йодид серебра является чрезвычайно малорастворимым веществом и в водных средах обычно используется в виде коллоидного р-ра (золя). Учитывая тот факт, что с увеличением суммарной межфазной поверхности частиц биологическая активность золя повышается, а агрегативная устойчивость системы снижается (вследствие большой поверхностной энергии и небольшого их заряда) [9], были определены условия, позволяющие получить агрегативно устойчивые золи йодида серебра с малым средним размером частиц и высокой межфазной поверхностью [25]. Для получения р-ра с высоким количеством частиц размером 50-60 нм, входящего в интервал истинно-коллоидных систем и обладающего максимальной межфазной поверхностью, смешивали 0,01 Н р-ра нитрата серебра и 0,01 Н р-ра йодида калия в объемном соотношении 7:10 (AgJ-1) (концентрация частиц дисперсной фазы – 0,004 моль/л).

Для получения дисперсий полимер-коллоидных комплексов СХТЗ с золей AgJ использовали два способа. В первом, к р-ру СХТЗ исходной концентрации 0,1, 0,2 или 1% ма. добавляли золь AgJ в различном объемном соотношении компонентов. При использовании

второго способа навеска СХТЗ растворялась в заранее синтезированном золе. Растворение осуществлялось путём магнитного перемешивания при комнатной температуре в течение 24 ч.

В качестве модельной системы для оценки влияния образцов р-ров СХТЗ и СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра на активационные процессы иммунокомпетентных клеток человека использовалась *культура мононуклеаров периферической крови человека*, поскольку эти клетки контактируют с лекарственными препаратами при внутривенном или любом другом способе введения. Для выделения клеток использовали гепаринизированную кровь 10-ти здоровых доноров-волонтеров, не имеющих в анамнезе проявлений инфекционного, аутоиммунного и аллергического симптомов. Все доноры относились к одной возрастной группе – 25-30 лет.

Для подбора оптимальной дозы гибридных полимерных комплексов на основе натриевой соли – сукцинамида хитозана проводили культивирование клеток крови здоровых доноров в 24-луночных планшетах в CO_2 -инкубаторе (37°C, 5% CO_2) в течение 24 и 72 ч. По истечении срока культивирования клетки собирали и оценивали стимулирующее действие гибридных полимерных комплексов на основе натриевой соли – сукцинамида хитозана (1, 2, 5, 5, 10, 15 и 20 мкг/мл) по пролиферации клеток. Полученные показатели сравнивали с контрольными культурами клеток (без добавления исследуемых образцов) и с “положительным контролем”. В качестве контрольных образцов использовались стимулятор митогенеза Т-лимфоцитов КонА, 10мкг/мл, и В-клеточный митоген лаконоса (МЛ), 5 мкг/мл. В

культурах лимфоцитов здоровых доноров было обнаружено, что добавление гибридных полимерных комплексов на основе натриевой соли – сукцинамида хитозана приводит к усилению пролиферации клеток, начинающемуся с 24-х ч культивирования и достигающему максимума к 72-му ч культивирования. Исследуемые р-ры вызывали повышение митогенеза лимфоцитов в культуре, оцениваемое по индексу стимуляции (ИС), но не превышали показатели. Наиболее выраженное действие в стимуляции клеточного роста показала концентрация 2,5 мкг/мл. Поэтому для проведения дальнейших исследований была выбрана именно эта доза.

Оценку фагоцитарной активности нейтрофилов определяли по способности клеток поглощать частицы латекса (диаметр частицы 1,49 мкм). Кровь (40 мкл) инкубировали с равным объемом суспензии латекса с добавлением исследуемых образцов р-ров СХТЗ и СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра (2,5 мкг/мл) при температуре 37°C 30 мин в лунках полистеролового круглодонного планшета, центрифугировали и ресуспендировали в 20 мкл фосфатно-солевого буферного р-ра (ФСБР). Переносили суспензию клеток на предметные стекла, фиксировали 96% этиловым спиртом и окрашивали 0,5% р-ром нейтрального красного. Учет результата проводили в световом микроскопе под иммерсией (10x100) путем просматривания 200 клеток. Определяли фагоцитарный индекс (ФИ – процент поглотивших объекты лейкоцитов из числа потенциальных фагоцитов клеток) и фагоцитарное число (ФЧ – среднее количество поглощенных частиц в пересчёте на один фагоцит).

Определение общей окислительно-восстановительной активности нейтрофилов в тесте восстановления нитросинего тетразолия проводили традиционным способом [11]. Для постановки реакции в лунки полистеролового круглодонного планшета к 40 мкл крови добавляли 40 мкл 0,1% р-ра нитросинего тетразолия фирмы «Sigma» (спонтанный НСТ-тест). Для постановки стимулированного НСТ-теста к такому же объему крови добавляли р-р НСТ и индуктор кислородного взрыва (зимозан). Суспензии клеток инкубировали при 37°C 30 мин с добавлением исследуемых образцов (р-ров СХТЗ и дисперсий на основе ПКК СХТЗ с AgJ), центрифугировали и ресуспендировали в 20 мкл ФСБР, переносили суспензию клеток на предметные стекла, фиксировали 96% этиловым спиртом и окрашивали 0,5% р-ром нейтрального красного. Учет результата проводили в световом микроскопе под иммерсией (10x100) путем просматривания 200 клеток и определяя процент положительно прореагировавших клеток на 100 фагоцитов как в спонтанном, так и в стимулированном тесте. В каждом мазке подсчитывали количество нейтрофилов, среди которых определяли процент клеток, содержащих включения диформаза. Индекс активации нейтрофилов (ИАН) рассчитывали по формуле [10]: $ИАН = (Ax0 + Bx1 + Cx2 + Dx3) / 100$, где А – количество клеток, не содержащих диформазиновых включений; В, С и D – количество клеток, содержащих гранулы диформаза в тех или иных количествах.

Для определения активационных рецепторов CD25+, CD95+ и HLA-DR+ использовались моноклональные

антитела CD25+, CD95+ и HLA-DR+ (Caltag). Лимфоциты выделялись и культивировались с добавлением образцов р-ров СХТЗ и дисперсий СХТЗ с коллоидными частицами йодида серебра, а затем окрашивались моноклональными антителами в соответствии с требованиями фирмы-производителя. Результаты учитывались на однолазерном проточном цитофлюориметре FACSCalibur («Becton Dickinson», США).

Оценку пролиферативной активности лимфоцитов проводили с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) *in vitro*. В данной работе применялся вариант постановки РБТЛ с использованием проточного цитофлюориметра по методу, описанному в работе [27]. В качестве исследуемого материала использовались выделенные на градиенте плотности мононуклеары периферической крови человека, культивируемые в питательной среде с добавлением соответствующих митогенов. Для оценки состояния функциональной активности лимфоцитов учитывали процент выявленных бластов.

Оценка апоптоза лимфоцитов проводилась с использованием метода окрашивания ДНК йодистым пропидием [19] при помощи проточного цитофлюориметра. Процедура окрашивания проводилась в стандартных пробирках для цитометрии. Клетки отмывали после этанола ФСБР и ресуспендировали в красящем р-ре, содержащем 0,005% йодистого пропидия, 0,1% цитрата натрия, 0,1% тритона X100. Непосредственно перед проведением процедуры к красящему р-ру добавляли РНК-азу (Sigma) в концентрации 50 мкг/мл для удаления примесей двуспиральной РНК в образцах. Анализ полученных образцов про-

водили в проточном цитофлюориметре (FL3, >600 нм), с использованием логарифмического канала флюоресценции.

Математико-статистическую обработку данных производили с использованием лицензионного пакета прикладных программ Statistica 7.0 («Stat Soft Inc.», США). В модуле «Основные статистики» («Basic Statistics») по всем изученным количественным показателям были подсчитаны следующие основные характеристики: выборочное среднее (среднее арифметическое, Mean), стандартная ошибка среднего (standard error of mean) и стандартное отклонение (standard deviation).

Для всех выборок проводили анализ соответствия вида распределения количественных признаков закону нормального распределения с помощью кри-

терия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test). Поскольку распределение признаков в группах являлось нормальным, сравнительный анализ групп проводился с помощью параметрических методов (t-критерий Стьюдента). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Количественные данные в таблице представлены в виде $M \pm Sd$, где M – выборочное среднее, Sd – стандартное отклонение.

Результаты и их обсуждение

Важным показателем состояния неспецифической резистентности организма являются характеристики фагоцитарной и метаболической активности нейтрофилов.

Результаты проведенного исследования показали (табл. 1), что р-ры СХТЗ

Таблица 1
Показатели фагоцитарной и метаболической активности нейтрофилов при действии р-ра СХТЗ концентрацией 5% мас. и дисперсий СХТЗ:AgJ (исходная концентрация СХТЗ 5%) в объёмном соотношении исходных компонентов 1:1

Группа	Фагоцитарная активность нейтрофилов $Mx \pm Sd$ (n=10)		Кислородзависимый метаболизм нейтрофилов $Mx \pm Sd$ (n=10)			
	Фагоцитарный индекс, %	Фагоцитарное число	Спонтанная активность		Зимозан-активированная активность	
			НСТ-спонтанные нейтрофилы, %	ИАН спонтанный	НСТ-индуцированные нейтрофилы, %	ИАН индуцированный
Контроль	56,10 $\pm$ 2,10	6,74 $\pm$ 0,41	8,60 $\pm$ 0,42	0,15 $\pm$ 0,01	47,80 $\pm$ 2,62	0,69 $\pm$ 0,04
СХТЗ 5%	59,60 $\pm$ 2,34	7,54 $\pm$ 0,42	14,50 $\pm$ 1,3 *	0,28 $\pm$ 0,03 *	55,20 $\pm$ 1,30 *	1,17 $\pm$ 0,03 *
СХТЗ:AgJ 5% 1:1	65,10 $\pm$ 2,53 *#	8,62 $\pm$ 0,46 *#	21,40 $\pm$ 2,25 *#	0,51 $\pm$ 0,05 *#	68,3 $\pm$ 2,04 *#	1,44 $\pm$ 0,03 *#

Примечание: * – статистически значимое отличие по сравнению с контрольной группой, # – статистически значимое отличие по сравнению с группой СХТЗ 5%.

и дисперсии СХТЗ:AgJ увеличивают количество активных фагоцитов, о чем свидетельствует повышение фагоцитарного индекса и показателя интенсивности фагоцитоза – фагоцитарного числа. Причем более выраженное повышение указанных показателей по сравнению с контролем (ФИ – $56,10 \pm 2,10$; ФЧ – $6,74 \pm 0,41$) выявлено в ответ на инкубацию клеток с СХТЗ:AgJ: ФИ составил $65,10 \pm 2,53\%$; ФЧ – $8,62 \pm 0,46$ ($p < 0,05$).

При анализе результатов спонтанного НСТ-теста установлено, что исследуемые образцы усиливают метаболическую активность нейтрофилов, причем обнаружено статистически значимое повышение числа активных фагоцитов в ответ на инкубацию с СХТЗ:AgJ ($p < 0,05$). Так, если в контроле описываемый показатель составил $8,60 \pm 0,42\%$, то в группе СХТЗ:AgJ – $21,40 \pm 2,25\%$.

Добавление индуктора респираторного взрыва (зимозана) вызывает увеличение количества диформаза-позитивных клеток и уровня активности оксидативных процессов в этих клетках по сравнению с контролем, где процент индуцированных фагоцитов составил $47,80 \pm 2,62$, тогда как в группе СХТЗ – $55,20 \pm 1,30\%$, а в группе СХТЗ:AgJ – $68,3 \pm 2,04$; индекс активности нейтрофилов в контрольной группе – $0,69 \pm 0,04$, и в группах СХТЗ и СХТЗ:AgJ – $1,17 \pm 0,03$ и $1,44 \pm 0,03$ соответственно.

Следовательно, можно сделать вывод о том, что проведенный индуцированный тест с НСТ, позволяющий оценить функциональный резерв кислородзависимого механизма бактерицидности фагоцитов, свидетельствует о сохранении внутриклеточной антибактериальной активности в фагоцитах при добавлении исследованных образцов.

Интересным моментом является тот факт, что испытанные образцы, усиливая оксидативность нейтрофилов, действуют очень мягко, поскольку количество диформаза-позитивных нейтрофилов не выходит за пределы нормальных значений, оцениваемых у здоровых людей (1-9%). Это очень важно, поскольку известно, что избыточная активация метаболитов кислорода, генерируемых гранулоцитами и моноцитами, может привести к повреждению мембран клеток в организме, репарации ДНК клеток, что ведёт к деструктуризации тканей и конечном итоге повышает риск развития аутоиммунных процессов [7].

Таким образом, влияние р-ров СХТЗ и дисперсий на основе ПКК СХТЗ с AgJ на фагоцитарно-метаболические характеристики нейтрофильного звена иммунитета можно оценить как стимулирующее.

Лимфоциты – единственный тип клеток крови, для которых пролиферация в периферических тканях является физиологической нормой и *обязательным этапом* в развитии иммунного ответа. Поэтому количественная оценка пролиферативной активности лимфоцитов в спланированных экспериментальных условиях может служить мерой реактивности лимфоцитов на тот или иной внешний стимул. Процесс активации лимфоцита, исходом которого является клональная экспансия, или пролиферация, начинается с экспрессии активационных рецепторов на мембране клетки.

Одним из важнейших маркёров, появляющихся на клетках и служащих признаком активации лимфоцитов, является рецептор к ИЛ-2 – CD25+. Этот рецептор экспрессирует на себе акти-

вированные Т-лимфоциты, стимулирующие антителообразование и цитотоксичность. В нашем исследовании мы провели оценку уровня экспрессии рецептора CD25+, результаты которой представлены в табл. 2. В работе мы использовали часовую инкубацию выделенных моноклеаров с исследуемыми образцами СХТЗ.

Анализ уровня экспрессии рецептора CD25+ показал увеличение этого показателя при добавлении СХТЗ и СХТЗ:AgJ, причем более существенное – при инкубации с СХТЗ:AgJ ($19,9 \pm 0,5\%$ против $15,7 \pm 1,3\%$ в контроле, $p < 0,05$).

Одновременно определялась экспрессия иммунокомпетентными клетками антигена CD95+, указывающего на готовность к программируемой клеточной гибели в случае необходимости устранения избытка активированных клеток, а также клеток с нарушенной генетической программой. Результаты исследования показали повышение экспрессии активационных рецепторов CD95+, при этом более существенное – при культивировании в среде с СХТЗ:AgJ 5% 1:1 ($21,01 \pm 0,95\%$ против $18,2 \pm 1,25\%$ в контроле, $p < 0,05$).

Определение экспрессии маркеров поздней и длительной активации лейкоцитов – HLA-DR+ продемонстрировало

повышение указанного показателя как в случае культивирования с СХТЗ, так и СХТЗ:AgJ.

Для правильного понимания формирования полного иммунного ответа на попавший в организм антиген необходимо хорошо представлять, какие процессы развиваются в клетке после этого события и какую роль играют кооперативные взаимодействия различных популяций клеток (лимфоциты, макрофаги).

При попадании в организм антигена происходит активация лимфоцитов, под которой понимают серию событий, происходящих в покоящихся клетках, в результате которых лимфоциты стимулируются. Это процесс, на котором базируются практически все иммунологические реакции. Пролиферация служит главной предпосылкой иммунного ответа, т.к. на стимулятор реагирует небольшое число клеток, и для развития достаточно интенсивной реакции необходимо их дополнительное размножение.

В данной работе в качестве активатора иммунокомпетентных клеток использовали образцы СХТЗ и СХТЗ:AgJ. Анализ пролиферативной активности лимфоцитов проводился в реакции бласттрансформации лимфоцитов (БТ)

Таблица 2

Экспрессия CD25+, CD95+ и HLA-DR+ при инкубации р-ра СХТЗ концентрацией 5% мас. и дисперсий СХТЗ:AgJ (исходная концентрация СХТЗ 5%) в объёмном соотношении исходных компонентов 1:1

Показатель	Контроль	СХТЗ 5%	СХТЗ:AgJ 5% 1:1
Экспрессия CD25+, %	$15,7 \pm 1,3$	$16,1 \pm 0,9$	$19,9 \pm 0,5^*$
Экспрессия CD95+, %	$18,2 \pm 1,25$	$19,04 \pm 0,68$	$21,01 \pm 0,95^*$
Экспрессия HLA-DR+, %	$3,9 \pm 0,35$	$4,6 \pm 0,2$	$4,21 \pm 0,33$

Примечание: * – статистически значимое отличие по сравнению с контрольной группой.

с использованием проточного цитофлюориметра БТ – это способность лимфоцитов пролиферировать и делиться в ответ на воздействие митогенов. При этом происходит превращение лимфоцитов в бласты – большие пиронинофильные клетки, способные к пролиферации и дифференцировке, что приводит к увеличению в лимфоидной ткани количества реагирующих клеток.

Поскольку результаты исследования показали, что СХТЗ и его соединение с йодидом серебра вызывают умеренное повышение экспрессии активационных рецепторов CD25+, CD95+ и HLA-DR+ на лимфоцитах уже через 1 ч после их добавления в культуру, большой интерес для исследования представляло определение судьбы активационных сигналов через 24 ч воздействия (начало изменений внутри клетки) и через 72 ч после воздействия, когда ответ клетки на стимулятор достигает своего максимального значения.

Результаты суточного культивирования моноклеаров с р-рами СХТЗ и СХТЗ:AgJ (табл. 3) убедительно демонстрируют их действие на иммунные

клетки как стимулирующее (пролиферация), о чем свидетельствует повышение количества бластных клеток в культуре. При этом возрастает количество клеток с признаками деструкции ядра, выявляемое флюорохромами, что может свидетельствовать о процессе позитивной активации клеток, вызванной митоген-индуцирующими свойствами исследуемых образцов. Так, через сутки инкубирования количество клеток увеличивается ($p < 0,05$) как при добавлении СХТЗ 5% ($16,29 \pm 1,60\%$), так и СХТЗ:AgJ 5% ($16,22 \pm 1,65\%$), тогда как в контроле этот показатель составил $11,14 \pm 1,10\%$. Аналогичная картина наблюдается и через 72 ч культивирования: количество клеток статистически значимо выше при добавлении в среду испытываемых образцов ($p < 0,05$).

В последние годы стало очевидным, что развитие многих иммунопатологических состояний обусловлено нарушением функционирования клеток иммунной системы, процессов пролиферации и дифференцировки лимфоцитов. Доказано, что при врожденных и приобретенных иммунодефицитных

Таблица 3

Пролиферативная активность и апоптоз лимфоцитов при добавлении р-ра СХТЗ концентрацией 5% мас. и дисперсий СХТЗ:AgJ (исходная концентрация СХТЗ 5%) в объёмном соотношении исходных компонентов 1:1 через 24 и 78 ч культивирования, %

Группа	Пролиферация, 24 ч, % Mx±Sd (n=10)	Апоптоз, 24 ч, % Mx±Sd (n=10)	Пролиферация, 72 ч, % Mx±Sd (n=10)	Апоптоз, 72 ч, % Mx±Sd (n=10)
Контроль	11,14±1,10	2,93±0,23	13,83±1,26	3,35±0,19
СХТЗ 5%	16,29±1,60*	3,63±0,27	17,94±1,21*	3,91±0,31
СХТЗ:AgJ 5%	16,22±1,65*	4,29±0,32*#	15,19±1,09*#	5,36±0,24*#

Примечание: * – статистически значимое отличие по сравнению с контрольной группой; # – статистически значимое отличие по сравнению с группой СХТЗ 5%.

состояниях, аутоиммунных заболеваниях, аллергиях нарушены функции Т-лимфоцитов, осуществляющих регуляцию эффекторных иммунных реакций в организме. Результаты проведенного нами исследования убедительно демонстрируют, что введение образцов СХТЗ 5% и СХТЗ:AgJ в культуру клеток оказывает стимулирующее влияние на пролиферативную активность Т-лимфоцитов в реакции бластной трансформации.

Активационные процессы, происходящие в организме, результатом которых является достижение конкретной цели – пролиферация и накопление определённого клона клеток – неразрывно связаны с альтернативными механизмами, которые приводят к клеточной гибели. Отдельная клетка может погибнуть как в результате некроза, вызванного прямым повреждающим действием окружающей среды, так и в результате программируемой клеточной смерти или апоптоза.

В связи с этим представляла интерес оценка программированной клеточной гибели лимфоцитов – апоптоза. В данной работе использовался метод оценки апоптоза по структурным изменениям ядерной ДНК путем окрашивания клеток йодистым пропидием.

При суточном культивировании мононуклеаров с исследуемыми образцами было показано, что количество клеток с внутриклеточными признаками апоптоза увеличивается к третьим суткам и достигает значений $3,91 \pm 0,31\%$ и $5,36 \pm 0,24$ в группах СХТЗ 5% и СХТЗ:AgJ против $3,35 \pm 0,19$ в контроле. Причем более выраженная реакция наблюдалась в случае культивирования с СХТЗ:AgJ ($p < 0,05$).

Сопоставляя полученные данные с результатами оценки пролиферативной активности, следует отметить, что к третьим суткам культивирования сохраняется высокое количество пролиферирующих клеток в культурах культивирования, и к этому же сроку начинают работать механизмы запрограммированной гибели клеток, что выражается в увеличении количества лимфоцитов с внутриклеточными признаками апоптоза. Этот факт является отражением физиологических процессов обеспечения нормального баланса клеток иммунной системы и их взаимодействия между собой и факторами окружающей среды.

Программированная клеточная смерть путем апоптоза рассматривается в настоящее время как основной механизм поддержания иммунного гомеостаза, играющего ключевую роль в регуляции численности иммуокомпетентных клеток, их созревания и дифференцировки Т- и В-клеток, обеспечения адекватной силы и продолжительности иммунного ответа, сохранения ауто-толерантности [22, 24, 28]. Благодаря апоптозу в организме обеспечивается баланс между пролиферацией клеток, их дифференцировкой и элиминацией. В ходе иммунного ответа путём апоптоза удаляются лимфоциты, не получившие адекватного стимула и не способные выполнить свою функцию, а по завершении иммунного ответа необходимо избавиться от большого числа активированных клеток, которые опасны в плане развития аутоагрессии и повреждения собственных тканей. «Дефицит» апоптоза является важным звеном патогенеза многих аутоиммунных реакций и причиной лимфопролиферативной патологии, а преобладание

апоптоза иммунокомпетентных клеток приводит к нарушениям иммунологической защиты [20]. Нарушения механизмов программированной клеточной смерти иммунокомпетентных клеток нередко лежат в основе иммуотоксичности ксенобиотиков [10, 15]. Выяснение характера влияния изучаемых соединений на пролиферативную активность и апоптоз лимфоцитов представляется весьма важным для понимания механизмов иммуномодулирующего действия полисахаридов.

В результате проведенного нами исследования показана сбалансированная реакция между пролиферацией и программированной клеточной гибелью, она может рассматриваться как находящаяся под контролем иммунной системы для обеспечения необходимых регуляторных процессов.

Полученные в ходе работы данные позволяют заключить, что полимер-коллоидные комплексы натриевой соли – сукцинамида хитозана с неорганическими коллоидными частицами золя йодида серебра оказывают иммуномодулирующий эффект. Хорошо известно, что в низких дозах наночастицы серебра стимулируют восстановительные процессы в тканях живых организмов, улучшают энергетический обмен, обладают хорошим иммуотропным и антибактериальным действием. Частицы йодида серебра отличаются отсутствием мутагенного действия и не оказывают дестабилизирующего действия на мембраны клеток [23, 30]. Однако Ag^0 начинает проявлять антимикробные свойства только после поверхностного окисления, т.е. при образовании ионов Ag^+ [30]. К тому же, водорастворимые соли серебра в некоторой степени ток-

сичны и могут вызывать аргирию. В связи с этим в нашей работе использованы более перспективные для применения в медицине соединения – галогениды серебра. Возможно, обнаруженный нами иммуномодулирующий эффект комплекса СХТЗ:AgJ достигается присутствием сукцинамида хитозана, выбранного в качестве наностабилизирующего компонента, предотвращающего агрегацию наночастиц и обладающего комплексом уникальных свойств, среди которых – биосовместимость, биodeградируемость, антибактериальное и антиоксидантное действия.

Все вышесказанное аргументирует целесообразность применения гибридных полимерных комплексов натриевой соли – сукцинамида хитозана с неорганическими частицами золя йодида серебра в составе средств направленной доставки лекарственных препаратов или исходных систем для получения полимерных композиционных материалов биомедицинского назначения (ранозаживляющих покрытий в виде гелей и плёнок, матриц для тканевой инженерии и др.).

Список литературы

1. **Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В.** Иммунологические проблемы апоптоза. - М.: Эдиториал УРСС. 2002. 320 с.
2. **Болотова Г.В.** Полимерные носители для противотуберкулёзных лекарственных средств на основе хитозана // Молодой учёный. 2010. № 5 (16). Т. 2.
3. **Быков В.П.** Состояние и перспективы развития производства хитина, хитозана и продуктов на их основе из панциря ракообразных // Материалы 5-й конф. «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана». - М.: ВНИРО. 1999. С. 12-15.
4. **Бычков А.В., Быкова В.М., Кривошеина Л.И.** Применение «Хитана» в клинической практике // Современные перспективы в ис-

- следовании хитина и хитозана / Мат-лы 7-й Междунар. конф. / Под ред. В.П. Варламова и др. - М.: ВНИРО. - 2003. - С. 156-157.
5. **Гамзаде А.И.** Производные хитина/хитозана контролируемой структуры в качестве потенциально новых биоматериалов: Автореф. дисс. ... д.х.н. - М. 2005. 48 с.
 6. **Гамзаде А.И., Насибов С.М., Лукин О.В.** Антибактериальная активность хитозанов / Мат-лы 8-й Междунар. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». - Казань. 2006. С. 183-186.
 7. **Долгушин И.И., Бухарин О.В.** Нейтрофилы и гомеостаз. - Екб.: УрО РАН. 2001.
 8. **Жоголев К.Д., Щедрина В.Ю., Никитин В.Ю., Ващенко В.И.** Иммунокорректирующее действие препарата хитозан при бактериально и гриппозной инфекции // Иммунокоррекция при инфекционной патологии. - Л. 1998. С. 32.
 9. **Иванова О.С., Шекунова Т.О., Иванов В.К. и др.** Доклады Академии наук. 2011. 437. № 5. С. 638.
 10. **Имельбаева Э.А., Теплова С.Н., Камиллов Ф.Х., Ахметова Б.Х.** Иммунотропные эффекты феноксигербицидов. - Уфа: Из-во Башкирского ун-та. 2000. 116 с.
 11. **Имельбаева Э.А., Хайруллина Р.М., Медведев Ю.А.** Методические указания к занятиям по иммунологии и серологии: Уч.-мет. пособ. для спец. по клин. и лаб. диагностике. - Уфа. 2006. 87 с.
 12. **Иноземцева О.А.** Российские нанотехнологии. 2007. Т. 2. № 9. С. 68-80.
 13. **Карпищенко А.И.** Медицинские лабораторные технологии. - СПб.: Интермедика. - 2002. - 600 с.
 14. **Корчагина Е.В.** Агрегация хитозана и его производных в разбавленных водных растворах: автореф. дисс. ... к. ф.-м.н. - М.: МГУ им. М.В. Ломоносова. - 2012. - 232 с.
 15. **Кулиш Е.И., Базунова М.В., Валиев Д.Р.** Перспективы использования полимер-коллоидных дисперсий на основе сукцината-хитозана и зольей йодида серебра в биомедицинских целях // В кн.: Тезисы докладов X Всероссийской конференции «Химия и медицина» с Молодежной научной школой. 2015. С. 104-105.
 16. **Мочалова А.Е., Никищенкова Л.В., Смирнова Н.Н., Смирнова Л.А.** Термодинамические свойства гидрогелей на основе хитозана в области от Т→0 до 350 К // Высокомолекулярные соединения. Серия Б. 2007. Т. 49. № 2. С. 371-376.
 17. **Нежинская Г.И., Копейкин В.В., Гмиро В.Е.** Препринт № 4. - Новосибирск: СО РАМН. 1995. С. 151.
 18. **Савадян Э.Ш., Мельников В.М., Беликов Г.П.** Антибиотики и химиотерапия. 1989. Т. 34. № 11. 874 с.
 19. **Сибиряк С.В., Вахитов В.А., Курчатова Н.Н.** Цитохром Р450 и иммунная система: факты, гипотезы, перспективы. - Уфа: ГИЛЕМ. 2003. 211 с.
 20. **Сибиряк С.В., Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А.** Оценка апоптоза в иммунологических исследованиях. - Екб. 2008. 59 с.
 21. **Сливкин А.И., Лапенко В.Л., Арзамасцев А.П. и др.** Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2005. № 2. С. 73.
 22. **Чередеев А.Н., Ковальчук Л.В.** Апоптоз, как важный этап оценки иммунной системы по патогенетическому принципу // Клин. лаб. диагностика. 1997. № 7. С. 31-34.
 23. **Шамратова В.Г., Шарафутдинова Л.А., Хисматуллина З.Р., Базунова М.В. и др.** Биомедицина. 2015. № 3. С. 69.
 24. **Ярилин А.А.** Апоптоз и его место в иммунных процессах // Иммунология. 1996. № 6. С. 10-23.
 25. **Bazunova M.V., Valiev D.R., Zamula Yu.S., Chernova V.V., Kolesov S.V., Kulish E.I.** Russian J. of Physical Chemistry. 2017. V. 11. P. 513-520.
 26. **Eliopoulos P., Mourelatos D.** Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis. 1998. V. 18. Issue 6. P. 303.
 27. **Gaines H., Andersson L., Biberfeld G.** A new method measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry // J. Immun. Methods. 1996. Vol. 195. P. 63-72.
 28. **Krammer P.** CD95's deadly mission in the immune system // Nature. 2000. Vol. 407. P. 789-800.
 29. **Pandey D., Ortiz C., Torres R.** Int. J. Nanomedicine. 2013. V. 3. No. 9. P. 1361.
 30. **Wright J.B., Lam K., Burrell R.E.** Am. J. of Infection Control. 1998. V. 26. No. 6. P. 572.

References

1. **Baryshnikov A.Yu., Shishkin Yu.V.** Immunologicheskie problemy apoptoza. - М.: Ehditorial URSS. 2002. 320 s.
2. **Bolotova G.V.** Polimernye nositeli dlya protivotuberkulyoznyh lekartsvennyh sredstv na osnove hitozana // Molodoj uchyonyj. 2010. № 5 (16). Т. 2.
3. **Вукот В.Р.** Состояние и перспективы развития производства хитина, хитозана и продуктов на

- ih osnove iz pancirya rakoobraznyh // Mat-ly 5-j konf. «Novye perspektivy v issledovanii hitina i hitozana». - M.: VNIRO. 1999. S. 12-15.
4. **Bychkov A.B., Bykova V.M., Krivosheina L.I.** Primenenie «Hitana» v klinicheskoy praktike // Sovremennye perspektivy v issledovanii hitina i hitozana / Mat-ly 7-j Mezhdunar. konf. / Pod red. V.P. Varlamova i dr. - M.: VNIRO. - 2003. - S. 156-157.
5. **Gamzazade A.I.** Proizvodnye hitina/hitozana kontroliruemoy struktury v kachestve potencial'no novyh biomaterialov.: Avtoref. diss. ...d.h.n. - M. 2005. 48 s.
6. **Gamzazade A.I., Nasibov S.M., Lukin O.V.** Antibakterial'naya aktivnost' hitozanov / Mat-ly 8-j Mezhdunar. konf. «Sovremennye perspektivy v issledovanii hitina i hitozana». - Kazan'. 2006. S. 183-186.
7. **Dolgushin I.I., Buharin O.V.** Nejtrofily i gomeostaz. - Ekb.: UrO RAN. 2001.
8. **Zhogolev K.D., Shchedrina V.Yu., Nikitin V.Yu., Vashchenko V.I.** Immunokorrigiruyushchee dejstvie preparata hitozan pri bakterial'no i grippoznoj infekcii // Immunokorrekcija pri infekcionnoj patologii. - L. 1998. S. 32.
9. **Ivanova O.S., Shekunova T.O., Ivanov V.K. i dr.** Doklady Akademii nauk. 2011. 437. № 5. S. 638.
10. **Imel'baeva Eh.A., Teplova S.N., Kamilov F.H., Ahmetova B.H.** Immunotropnye ehffekty fenoksigerbicidov. - Ufa: Iz-vo Bashkirskogo un-ta. 2000. 116 s.
11. **Imel'baeva Eh.A., Hajrullina R.M., Medvedev Yu.A.** Metodicheskie ukazaniya k zanyatiyam po immunologii i serologii: Uch.-met. posob. dlya spec. po klin. i lab. diagnostike. - Ufa. 2006. 87 s.
12. **Inozemceva O.A.** Rossijskie nanotekhnologii. 2007. T. 2. № 9. S. 68-80.
13. **Karpishchenko A.I.** Medicinskie laboratornye tekhnologii. - SPb.: Intermedika. - 2002. 600 s.
14. **Korchagina E.V.** Agregaciya hitozana i ego proizvodnyh v razbavlenykh vodnykh rastvorah: avtoref. diss. ... k.f.-m.n. - M.: MGU im. M.V. Lomonosova. - 2012. - 232 s.
15. **Kulish E.I., Bazunova M.V., Valiev D.R.** Perspektivy ispol'zovaniya polimer-kolloidnyh dispersij na osnove sukcinatahitozana i zolej jodida srebra v biomedicinskih celyah // V kn.: Tezisy dokladov X Vserossijskoj konferencii «Himiya i medicina» s Molodezhnoj nauchnoj shkoloj. 2015. S. 104-105.
16. **Mochalova A.E., Nikishchenkova L.V., Smirnova N.N., Smirnova L.A.** Termodinamicheskie svojstva gidrogelej na osnove hitozana v oblasti ot T→0 do 350 K // Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya B. 2007. T. 49. № 2. S. 371-376.
17. **Nezhinskaya G.I., Kopejkin V.V., Gmiro V.E.** Preprint № 4. - Novosibirsk: SO RAMN. 1995. S. 151.
18. **Savadyan Eh.Sh., Mel'nikov V.M., Belikov G.P.** Antibiotiki i himioterapiya. 1989. T. 34. № 11. 874 s.
19. **Sibiryak S.V., Vahitov V.A., Kurchatova N.N.** Citohrom R450 i immunnaya sistema: fakty, gipotezy, perspektivy. - Ufa: GILEM. 2003. 211 s.
20. **Sibiryak S.V., Hajdukov S.V., Zurochka A.V., Chereshev V.A.** Ocenka apoptoza v immunologicheskikh issledovaniyah. - Ekb. 2008. 59 s.
21. **Slivkin A.I., Lapenko V.L., Arzamashev A.P. i dr.** Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya. 2005. № 2. S. 73.
22. **Cheredeev A.N., Koval'chuk L.V.** Apoptoz, kak vazhnyj ehtap ocenki immunnnoj sistemy po patogeneticheskomu principu // Klin. lab. diagnostika. 1997. №7. S. 31-34.
23. **Shamratova V.G., Sharafutdinova L.A., Hismatullina Z.R., Bazunova M.V. i dr.** Biomedicina. 2015. № 3. S. 69.
24. **Yarilin A.A.** Apoptoz i ego mesto v immunnykh processah // Immunologiya. 1996. № 6. S. 10-23.
25. **Bazunova M.V., Valiev D.R., Zamula Yu.S., Chernova V.V., Kolesov S.V., Kulish E.I.** Russian J. of Physical Chemistry. 2017. V. 11. P. 513-520.
26. **Eliopoulos P., Mourelatos D.** Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis. 1998. V. 18. Issue 6. P. 303.
27. **Gaines H., Andderrsson L., Biberfeld G.** A new method measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry // J. Immun. Methods. 1996. Vol. 195. P. 63-72.
28. **Krammer P.** CD95's deadly mission in the immune system // Nature. 2000. Vol. 407. P. 789-800.
29. **Pandey D., Ortiz C., Torres R.** Int. J. Nanomedicine. 2013. V. 3. No. 9. P. 1361.
30. **Wright J.B., Lam K., Burrell R.E.** Am. J. of Infection Control. 1998. V. 26. No. 6. P. 572.

Influence of ultradisperse systems on the basis of complexes of a chitosan and its derivatives with colloidal particles of silver iodide on the immune status

**L.A. Sharafutdinova, M.V. Bazunova, E.I., Kulish, N.N. Kurchatova,
Z.R. Hismatullina, M.R. Daminov**

The article presents the results of a study of the solution of the sodium salt of chitosan succinamides (5%) effect and dispersions of the sodium salt of chitosan succinamide with AgI (1:1) on the activation processes of immunocompetent cells *in vitro*. It is shown that the solutions of the sodium salt of chitosan succinamide and dispersion of colloidal particles of silver iodide increase the phagocytic and metabolic characteristics of neutrophils, cause a moderate increase in expression of activation receptors CD25+, CD95+ and HLA-DR+ lymphocytes, and increase the proliferative activity of lymphocytes along with an increase in the number of cells with intracellular apoptosis signs.

Key words: chitosan, colloidal particles of silver iodide, phagocytic activity of leukocytes, proliferative activity of lymphocytes.