

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТИНА И СФЕРЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

© И.В. Максимов

Хитин – один из наиболее распространенных биополимеров после целлюлозы. Благодаря своей высокой биологической активности этот биополимер активно внедряется в различные сферы жизнедеятельности человека. В обзоре проведен анализ данных о природных источниках хитина, сферах его применения, биологической активности, воздействии на морфо-физиологические показатели организмов, запуск и развитие защитных реакций на стресс. Особое место уделено участию олигомеров хитина в сигнальных системах и вовлечение их в системную экспрессию генов, кодирующих защитные белки. Высказываются предположения о возможности создания на основе хитина и хитозана препаратов нового поколения, избирательно влияющих на рост патогенов и регулирующих иммунитет.

Ключевые слова: хитин, хитозан, распространенность, биологическая активность, сферы применения, иммунитет.

### Распространенность хитина в природе, способы его получения

Хитин наряду с целлюлозой наиболее распространенный биополимер клеточных стенок грибов, водорослей и верхних покровов членистоногих. Вероятно, это единственный случай, когда в состав покровов нескольких систематически разнородных организмов в качестве структурного полимера входит один и тот же полисахарид.

Впервые хитин был выделен в 1811 г. профессором естественной истории Н. Brasconnot (Франция) при исследовании состава грибов и получил название фунгин. В 1823 г. А. Odier выделил хитин из надкрылий насекомых, а хитозан был получен в 1859 г. [1]. Хитин имеет кристаллическое строение, при этом различают три взаимопревращающиеся друг в друга формы хитина:  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -хитин, каждая из которых обладает рядом индивидуальных физико-химических свойств. В 1887 г. G. Ledderhose установил, что в состав хитина входят глю-

козамин и ацетильная группа, но только в 1931 г. Rammelberg идентифицировал фунгин и хитин как одно вещество и присвоил им общее название – хитин.

Хитозан был впервые исследован в 1894 г., когда удалось показать, что хитин, нагретый с концентрированной щелочью, становится растворимым в органических кислотах. Он при добавлении разбавленного раствора йода и кислоты был фиолетовым, в отличие от хитина, окрашивающегося в кирпичный цвет [2]. Однако относительно терминов «хитин» и «хитозан» до сих пор ведутся споры. В идеале хитин – это линейный полимер, основу которого составляют N-ацетил глюкозаминные звенья (рис.). Его официальное название – поли(1-4)-2-ацетидамо-2-дезоксид-D-глюкоза, или хитан. В идеальном хитозане все ацетамидные группировки гид-

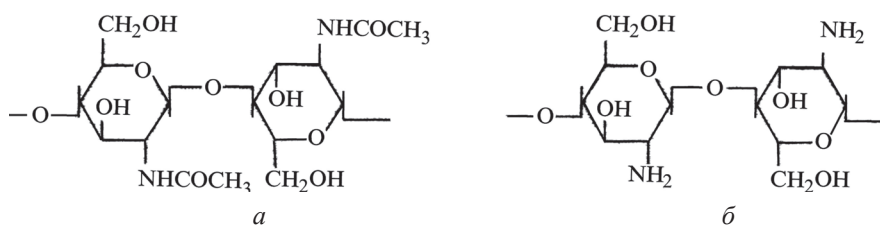


Рис. Повторяющиеся элементы хитина (а) и хитозана (б)

ролизированы до амидных, и называется это соединение поли(1-4)-2-амино-2 дезокси-Д-глюкоза. Но в природе хитин содержит некоторое количество аминокрупп, а хитозан – ацетамидных. Поэтому под термином хитин предполагают полисахарид, состоящий в основном из звеньев N-ацетил-глюкозамина, но с небольшим числом глюкозамина, а хитозан – это продукт дезацетилирования хитина [3]. Методом ИК-спектроскопии установлено, что в процессе образования хитозана уменьшается интенсивность полос поглощения карбонила ( $1625\text{ см}^{-1}$ ) амидной группы ( $3265$  и  $31100\text{ см}^{-1}$ ) и нарастает интенсивность полос при  $3365$  и  $3445\text{ см}^{-1}$ , что свидетельствует о появлении  $\text{NH}_2$ -группы. Рентгеновские исследования хитозана показывают, что он имеет ту же кристаллическую решетку, что и хитин, но меньшую упорядоченность макромолекул. Хитозан в солевой или основной форме, регенерированный в виде пленки, имеет характерную для аморфных веществ рентгенограмму. По сравнению с хитином у хитозана более низкое содержание углерода и более высокое содержание азота, что следует из элементарного анализа (табл. 1) [3].

Т а б л и ц а 1

Элементарный состав хитина и хитозана [3]

|                     | Содержание элементов, % |      |      |
|---------------------|-------------------------|------|------|
|                     | С                       | Н    | N    |
| Хитозан             | 39,9                    | 6,80 | 7,4  |
| Хитин               | 43,53                   | 6,12 | 6,26 |
| N-ацетил глюкозамин | 43,53                   | 7,15 | 6,26 |

Хитин содержится в наружных покровах членистоногих и клеточной стенке грибов в виде протяженных полимерных структур, собранных так же, как и целлюлоза, в фибриллы диаметром  $25\text{--}50\text{ нм}$ . Большая длина и ограниченная гибкость этих макромолекул является предпосылкой для образования жестких надмолекулярных структур, обеспечивающих функцию повышенной механической прочности содержащих этот биополимер тканей.

Транс-расположение в элементарном звене макромолекулы хитина заместителей (ацетамидной и гидроксильной групп) у C(2) и C(3)

соответственно обуславливает значительную гидролитическую устойчивость ацетамидных групп, в т.ч. и в условиях щелочного гидролиза. Однако и в этих условиях доля отщепившихся ацетамидных групп в расчете на одно элементарное звено не достигает единицы, составляя обычно  $0,8\text{--}0,9$ . Аминоацильная группа придает хитину гидрофобные, а аминокгруппа хитозана – катионные свойства [4].

Потенциальные источники хитина (хитозана) многообразны и широко распространены в природе. Наиболее доступные из них можно разделить на 4 группы:

- 1) отходы переработки морских продуктов;
- 2) отходы микробиологических производств [5];
- 3) прямая ферментация [4];
- 4) получение из мора домашних насекомых (пчелы, трутовый шелкопряд) или выращиваемых для цели получения хитина других видов насекомых [6].

Для получения хитина наиболее доступной следует считать хитиновую оболочку покровных тканей морских членистоногих. Так, расчеты Коhn [7] показывают, что стоимость этого полимера при использовании панцирей крабов, креветок (содержание хитина  $14\text{--}22\%$  и  $13\text{--}15\%$  соответственно) и производительности завода  $600\text{ т}$  в год будет составлять не более  $10\text{ дол/кг}$ . Сейчас основная масса производства хитина и хитозана сконцентрирована в Японии. Во всем мире сейчас в год выделяется хитина более  $3\text{ 000 т}$  [8].

Для выделения хитина из покровных тканей членистоногих их обрабатывают вначале  $5\text{--}7\%$ -м раствором соляной кислоты. Полученный при этом деминерализированный остаток, содержащий  $55\text{--}60\%$  хитина, обрабатывают щелочью для удаления белков [9]. При получении хитина ее концентрация достигает  $58\%$ , а при выделении хитозана ее доводят до  $40\text{--}50\%$  от общего объема раствора. При этом дополнительно к депротеинизации хитин подвергается деацетилированию. Оставшийся хитин (хитозан) содержит только до  $1,5\%$  зольных веществ [10]. Также была предложена методика получения хитозана в атмосфере азота с гидроксиламином при  $\text{pH}\text{--}13$  и обработка в

течение 10–12 ч в инертной атмосфере гидрозингидратом (при 120–150°C).

Однако описанные выше способы получения хитозана приводят к выходу продукта, стоимость которого оказывается многократно выше стоимости хитина. А при переработке накапливаются нежелательные отходы, которые требуют дополнительных затрат для нейтрализации.

Можно получить хитозан из мицелия грибов, остающегося после переработки отходов микробиологической промышленности, или из мицелия культивированных для этих целей культур. В табл. 2 приведены данные по содержанию хитина и хитозана в клеточных стенках грибов, выращиваемых в микробиологической промышленности. Из таблицы видно, что наиболее вероятное направление в промышленном получении хитозана – это его выделение из муковых грибов. Считается, что количество этого биополимера в клеточных стенках муковых грибов может достигать 30–40% от остальных биополимеров, что предполагает возможность использования видов микроскопических грибов *Mucor rouxii*, *Phycomyces blakesleanus*, *Zygomahyneus moelleri* для получения мелкодисперсного хитозана.

Т а б л и ц а 2

Содержание хитина и хитозана в клеточных стенках грибов, % [3, 5, 12]

| Вид гриба                          | Хитин | Хитозан |
|------------------------------------|-------|---------|
| <i>A. niger</i>                    | 22–31 | «       |
| <i>Penicillium digitatum</i>       | 45    | «       |
| <i>Penicillium allahabadense</i>   | 25    | «       |
| <i>P. notatum</i>                  | 2,9   | «       |
| <i>P. chrysogenum</i>              | 44,5  | «       |
| <i>Agaricusbisporus</i>            | 43    | 15,1    |
| <i>A.campestris</i>                | 16,2  | 15,7    |
| <i>Streptomycess.p.</i>            | 40    | «       |
| <i>M. rouxii</i>                   | 9     | 33      |
| <i>Allomyces arbuscula</i>         | 75    | «       |
| <i>Phanerochaetesanguinea16-65</i> | 59    | «       |
| <i>Ganodermaapplanatanum4-94</i>   | 74    | «       |
| <i>G. applanatanum40-90</i>        | 64    | «       |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>    | 19,0  | «       |

Примечание. « – не обнаружено.

Оригинальный метод получения хитозана был предложен Кногг и Klein [11]. Они ис-

пользуют природную активность хитин дезацетилазы из *M. rouxii* и *P. blakesleanus* для дезацетилирования хитина *Aspergillus niger*. Выращивание этих грибов на хитине позволило снизить степень ацетилирования полисахарида до 4,3–8,6% за 96 часов.

Грибной хитозан впервые был обнаружен в клеточной стенке *Phycomyces* ssp. и в дальнейшем выделен из клеточной стенки *M. rouxii*, *Choronephora cucurbitarum*, *Agaricus bisporus*, *Absida coerulea* [3]. Подобранные оптимальные по продуктивности хитина (хитозана) штаммы микроорганизмов, можно создать высокорентабельную технологию производства этого биополимера. При этом будет возможным выпуск хитина и хитозана со стандартными показателями качества. Так, Муццарелли [3], оценивая ежегодное мировое производство лимонной кислоты в 100 000 т и приняв соотношение кислота/отходы мицелия *A. niger* равным 1:5, подсчитал, что заводы мощностью 70 т кислоты в день одновременно могут производить до 14 т влажного мицелия. При содержании в сухом мицелии этого гриба 22% хитина, ежедневный его выход составит 0,7–0,8 т. Анализ содержания хитозана в клеточных стенках грибов *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Lentinus edodes* и *Pleorotus sajocaii* показал, что наиболее активным продуцентом хитозана может быть *R. oryzae* [13].

Если сравнить традиционный способ выделения и определения хитозана в клеточных стенках грибов [13] и способ дезацетилирования хитина в целях получения хитозана из хитина, можно заметить схожесть этих методов с разницей в концентрации щелочи. Оказалось, что обработка 1N NaOH в течение 36 часов (метод Хакмана) [2] приводит к дезацетилированию 14% хитина, что ведет к искусственному завышению содержания хитозана в исследуемых объектах. Исходя из этого Дотема [14] провел определение хитозана в условиях, которые не могут содействовать превращению хитина клеточных стенок в хитозан. Этот метод основан на том, что азотистая кислота может деструктурировать и деполимеризовывать полимер, содержащий свободные аминогруппы. Оказалось, что в

стенке гиф *Mucor mucedo* хитозан отсутствует. Исследования другого мукорового гриба *S. japonica* также не выявили присутствия этого полимера в клеточной стенке [2].

Удобным и вполне доступным методом определения содержания биополимеров растительного и животного происхождения является использование высокоспецифичных гидролаз. Так, хитозаназы, выделенные из бактерий *Baccillus* P-4, лизировали клеточные стенки *M. mucedo* и *Risopus*. Анализ на глюкозамин показал наличие в продуктах ферментного гидролиза этого сахара. Аналогичные результаты были получены при выращивании *Streptomyces* No-6 на клеточных стенках *Mucor rammanianus* и *M. plumbeus*.

С особым интересом в последнее время исследователи стали относиться к способам получения из природных источников и использования олигомеров хитина и близких по структуре к ним липохитоолигосахаридов. Термин «олигомеры» четко не указывает число входящих в них структурных единиц. Данные литературы позволяют назвать олигосахаридами фрагменты со степенью полимеризации (СП) от 4 до 30 [15]. Существуют несколько способов их получения: 1) гидролиз хитина концентрированными кислотами [16]; 2) разрушение перекисью водорода [17]; 3) ферментативный гидролиз хитиназами [18]; 4) деполимеризация ультразвуком [19]. Все эти методы имеют свои недостатки, основным из которых является модификация функциональных групп при С1–С6 атомах.

Растворимость олигомеров хитозана выше, чем олигомеров хитина, так как первые имеют больший заряд, и зависит от степени их полимеризации. Для ХОС, степень ацетилирования которых 100%, растворимость падает с возрастанием молекулярной массы, и считается, что при степени полимеризации более 7 единиц они становятся труднорастворимыми [16].

Настоящие грибы как главный микрофибрилярный или структурный клеточно-стеночный компонент имеют хитин (хитридиомикеты, зигомицеты, аскомицеты и базидиомикеты) [12]. Хитин в клеточной стенке аскомицет-

ных и базидиомицетных грибов ацетилирован до 80% и ассоциирован с (1-3)-β/(1-6)-β-глюканом в водно-нерастворимом комплексе высоко-ковалентной связью [20].

Исследования показали, что хитин у грибов синтезируется с наружной части мембран плазмалемными белками [21]. Микрофибрилярный хитин образуется в клеточной стенке грибов хитинсинтазой, организованной в хитосомоподобные структуры во внутренней стороне клеточной стенки, а хитозан – хитинсинтазой или хитиндеацетилазой, диспергированной по наружной поверхности клеточных стенок гриба и образующей индивидуальные цепочки хитина [22]. Например, у мукоровых грибов хитин непосредственно после синтеза деацетилируется с образованием хитозана [24]. В этом активное участие принимает хитиндеацетилаза [25]. Таким образом, эти два фермента являются основными участниками синтеза хитина и хитозана в грибной клеточной стенке. При этом следует отметить, что хитинсинтаза, локализованная в хитосомах, находящихся в цитоплазме, неактивна. Активация этого фермента происходит только после его секреции на наружную сторону плазмалеммы и взаимодействия с протеазами [21]. В регуляции хитинсинтазной активности принимают участие, кроме протеаз, и фосфолипиды мембраны [23]. Таким образом, хитинсинтаза может активироваться только после ее включения в липидную среду мембраны. За экспрессию этого белка у дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae* отвечают три различных гена [26]. Причем только при подавлении активности всех генов этого фермента гриб погибает.

### **Хитин как инновационный материал в медицине и косметологии**

Хитин и его производные используются в далеких друг от друга сферах современной деятельности человека и предлагаются для использования в медицинской и парфюмерно-косметической промышленности, сельском хозяйстве, производстве биологически активных добавок (БАД) к пище, ветерина-

рии, а также для очистки воды (табл. 3) [3; 8; 25; 27–29]. Активное использование хитина связано с его высокой биологической активностью, опосредованной электростатическими особенностями [30], зависящими от структуры его олигомеров, степени их полимеризации и ацетилирования [31]. Благодаря своей химической природе хитозан способен к различным видам взаимодействия с образованием 4 основных типов связей: ионных, водородных, гидрофобных, связей по типу комплексообразования.

В медицине хитин приобрел популярность благодаря совместимости с живыми

тканями человека. В виде пленок хитозан предлагают использовать в качестве искусственной кожи, что позволяет успешно бороться за жизнь человека даже при 75%-х ожогах кожных покровов [48; 20]. В лечебной косметике хитозан применяется некоторыми врачами-косметологами при хирургических операциях на коже в виде мазей для заживления ран как пленкообразующий и противовоспалительный агент [51; 66–67]. Применение хитиновых композиций в качестве мазей может исключить дополнительную дезинфекцию раневой поверхности различными химическими соединениями (растворы перекисей,

Таблица 3

*Сферы применения хитина, хитозана и их олигомеров*

| Сфера   | Примеры  |
|---|--|
| Носитель для хроматографии                    | Для разделения оснований нуклеиновых кислот нуклеозидов, нуклеотидов, аминокислот [32–33]<br>Аффинный сорбент для сериновых протеиназ, ингибиторов трипсина, лизоцима, лектинов и хитиназ, пероксидаз и др. белков [34–39]<br>Для сорбции тяжелых металлов и радионуклидов, баксуспензий [40–42]   |
| Для очистки воды                              | Для иммобилизации ионов тяжелых металлов, при очистке бытовых и производственных сточных вод [3; 8; 43–45]   |
| Текстильная и хлопчатобумажная промышленность | Для повышения прочности волокон и износостойкости тканей и бумаги [46; 27]   |
| Биомедицина и фармацевтические материалы      | В качестве искусственных мембран для почек. Для связывания и выведения из организма вредных веществ [3; 47]<br>Для получения искусственной кожи, производства хирургических нитей [48]<br>Регулирование иммунитета [49]<br>Как антимикробный агент [50–51]<br>Для улучшения всасывания труднорастворимых лекарственных форм и эффективности их работы [3; 51]<br>Более быстрое заживление ран. Для изготовления контактных линз [27; 51]<br>Гипохолестерический агент [52–53]<br>Антираковая терапия [51; 54]<br>Гемостатик и антитромбоцидный агент антикоагулянтного и антиартрозного действия для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [2; 51; 54–55]<br>Антиоксидант [51; 56] |
| Парфюмерия и косметика                        | Выпуск шампуней, гелей, кремов, бальзамов, содержащих хитозан [28]   |
| Пищевая промышленность                        | В качестве загустителя и структурообразователя продуктов питания, создание съедобных оболочек; осветление пива, соков, вин [57]<br>Сорбция фенольных компонентов [58]  |
| Сельское хозяйство                            | Как фунгистатик, рострегулятор роста и иммуномодулятор для обработки семенного и посадочного материала [17; 59–64]<br>Добавление в почву для снижения уровня патогенов [65]  |



перманганата калия, йода) [68]. Хитозан препятствует рубцеванию ран, задерживая выработку фибрина, а отсутствие у него токсичности и аллергенности позволяет включать его в качестве гемосовместимого бионейтрального рассасывающегося шовного материала [69]. Высокая термическая устойчивость полисахарида позволяет проводить не только пастеризацию, но и стерилизацию растворов хитозана, что является необходимым условием при использовании его в качестве компонента фармацевтических препаратов.

Поскольку N-ацетилглюкозамин как структурная единица хитина входит в состав различных мукополисахаридов, его ранозаживляющая активность, вероятно, связана с быстрой иммобилизацией в биоструктуры раневой зоны [67–68], способностью стимулировать активность пролиферации фибробластов [70], концентрирующихся на его волокнах, и со способностью непосредственно ингибировать рост и размножение бактерий [70–72]. При этом влияние хитина на фибробласты было сильнее в сравнении с хитозаном [70; 73], что говорит о важности степени ацетилирования этого биополимера в этом процессе. Ограничение роста патогенных бактерий объясняется свойством хитина агглютинировать микробные тела [74], облегчать проницаемость и дезинтеграцию их клеточной стенки и плазматической мембраны [62; 75].

Высокая стойкость хитина к факторам окружающей среды и близкие физико-химические свойства с целлюлозой предполагают его использование в качестве основного компонента при получении различных фильтрационных материалов, которые можно использовать как в промышленных масштабах, так и в медицине [76]. Так, хитозан оказывает защитное действие и снижает активность развития бактерий и микромицетов на бумаге [77]. Это же свойство позволяет использовать хитин для создания нетканых материалов, которые можно применять в качестве лечебного белья или различных органически совместимых антибактериальных и антигрибных ожого- и ранозаживляющих кровоостанавливающих прокладочных и перевязочных

материалов. Кроме этого, хитозановые пленки предлагаются для купирования системного воспалительного ответа, ускорения заживления гнойных ран [78]. Обращает на себя внимание тот факт, что наиболее высокой антимикробной активностью при этом характеризовались дезацетилированные формы хитина [79–80]. Есть предложения для усиления антимикробной активности хитозана формировать его в смеси с эфирными маслами [81]. Для множественного лечебно-профилактического эффекта хитозан и его производные соединяют с органическими кислотами, витаминами, антоцианами, индолами и другими биологически активными веществами.

Свойство хитозана формировать прочные комплексы с липидами позволяет использовать его для снижения массы тела при значительной его детоксикации, что уменьшает риск заболеваний сердечно-сосудистой системы, рака прямой кишки, холецистита. Непосредственная сорбция хитозаном коклюшного и дифтерийного токсинов [62; 74] или же способность ингибировать их сорбцию на клетки-мишени путем конкурентного связывания с рецепторами [82] открывает перспективы для его использования в борьбе с болезнями желудочно-кишечного тракта [83].

Некоторые олигомеры хитина, например N-карбоксиметилхитозан-N,O-сульфат, ингибируют синтез вирусоспецифических белков, подавляют размножение вируса иммунодефицита человека HIV-1 и вируса мышинной лейкемии Раушера в культуре T-клеток периферической крови человека и мышинных фибробластов соответственно [62]. Они полностью ингибируют адсорбцию вирусов на CD4-клетки мишени и подавляют активность вирусоспецифической обратной транскриптазы. Обнаружено, что это зависит от местоположения сульфогрупп в глюкозаминовых остатках хитозана. Как высокоэффективные адъюванты иммунного ответа, хитоолигосахариды могут усиливать у животных и, вероятно, у человека выработку специфических антител [84–86]. Так, хитозан усиливал местный и системный иммунный ответ к вирусу гриппа типа А и В у мышей [62].

Хитозан вызывает изменения в структуре фагов, снижая титр вирулентности их суспензии, и влияет на процессы внутриклеточной репродукции [62]. Высказывалось предположение, что в антивирусной активности хитозанов важен заряд молекулы. Однако при использовании хитина с различной степенью ацетилирования и соответственно с различным зарядом такой корреляции пока не обнаружили. Это дало возможность сделать предположение о нескольких, относительно независимых путях развития антивирусной защиты, связанных с непосредственной блокировкой репродукции фага, нейтрализацией хитозаном их вирулентности и снижением их жизнеспособности [62] или, напротив, опосредованным усилением защитных свойств клеток хозяина. Факт ингибирования роста фагов на бактериальной культуре предполагает возможность использования олигомеров хитозана, не активных по отношению к конкретным производственным видам бактерий, для их освобождения от бактериофагов.

Формирование устойчивости животных к вирусам под влиянием хитина связано с активацией вспомогательных клеток иммунной системы, в первую очередь, макрофагов и Т-хелперов [87] и запуском генерации активных форм кислорода клетками полиморфноядерных лейкоцитов [79]. Фагоцитируемые частицы хитина и хитозана вызывали дополнительно к повышению NO-синтазной активности и синтез сигнальных молекул, запускающих защитные реакции, например арахидоновой кислоты [88], образование активных форм кислорода и индукцию продукции цитокинов [49], которые, в свою очередь, запускали синтез  $\gamma$ -интерферона в культуре мышечных спленоцитов, обусловленный взаимодействием примированных макрофагов с природными киллерами [62]. Особо следует заметить, что активация синтеза в клетках интерферона приводит соответственно к активации их противовирусной активности. Антиаллергические свойства хитина проявляются в том, что под его влиянием происходит подавление синтеза иммуноглобулинов IgE [89]. Это еще один пример регуляции хитином неспе-

цифического иммунного ответа, позволяющий использовать его как важный иммунопотенциатор для предупреждения послеоперационной иммуносупрессии [74] и профилактики аллергических реакций [89]. Особый интерес вызывает то, что иммуномодулирующую активность хитина можно регулировать путем модификации структуры олигосахаридов, что четко продемонстрировано в работе группы М. Morimoto [79].

Эффект запуска иммунитета под влиянием хитина у животных зависит от степени ацетилирования биополимера и при его снижении теряется [89–90]. Поскольку хитин индуцировал в клетках продукцию цитокинов, хемокинов и  $\gamma$ -интерферона, экспрессию MyD88-ассоциированных T<sub>001</sub>-подобных рецепторных белков [49], а маннаны, напротив, ингибировали ее [89], можно предположить, что рецепторы сигнальной трансдукции, участвующие в регуляции выработки этих соединений, представлены одним и тем же белком [89], подобным киназным рецепторам, например *FIBCD1* [90]. При этом показано, что хитин и маннаны противоположно регулируют защитные свойства клетки [91]. Такой рецептор, обнаруженный у рыб, характеризовался высокой специфичностью к тетрахитоолигосахаридам в концентрации  $10^{-9}$  М и был представлен внеклеточными регулирующими киназами [90]. Замена одного-двух остатков в олигосахариде на глюкозу приводила к потере их активности, что говорит о высокой специфичности этого рецептора именно к олигомерам хитина.

Возрастание неспецифической устойчивости печени к действию эндотоксинов и липополисахаридов под влиянием хитозана [92] позволило сделать вывод о способности препаратов, содержащих этот биополимер, повышать адаптационные возможности организма на фоне липополисахарид-индуцированной эндотоксемии. Снижение содержания холестерина в крови при включении в рацион крыс хитозана позволяет использовать его в качестве гипохолестерического агента [52–53].

Для лечения и профилактики тромбозов в медицине широко применяют природный антикоагулянт крови гепарин, по химичес-

кой структуре близкий к олигомерам хитина. Следовательно, наиболее близкий его структурный аналог – сульфат хитозан, обладающий подобной активностью, можно включать в перечень соединений для создания лекарственных препаратов антикоагулирующего, гемостатического и антисклеротического действия [93–94].

Хитин агрегирует раковые клетки [54] и ингибирует их рост [55; 95]. Так, из гриба *Lentinus edodes* (Shiitake) в Японии выделено биологически активное соединение, содержащее производные хитина и составляющее основу препарата «Лентинан», успешно используемого для лечения онкологических заболеваний. Конъюгат карбоксиметил-хитозана с митомицином также оказался успешным в борьбе с этой сложной болезнью, а конъюгат с RGDS-пептидом даже ингибировал рост опухолевых метастаз [96]. Такое свойство хитина и хитозана связано с их избирательным концентрированием вокруг раковых клеток и соответственно уменьшением интенсивности миграции последних и торможением развития кровеносных сосудов в ткани опухоли [69].

Способность гидрофобно-модифицированных производных хитина и хитозана образовывать гели с упорядоченной внутренней наноструктурой мицеллярного типа позволяет использовать их для микрокапсулирования биологически активных веществ и создавать биodeградируемые носители для фармацевтических препаратов [8; 51; 68; 97–99]. Биокапсулы, содержащие хитозан, могут быть применены: 1) для создания полимерных покрытий с иммобилизованными на них терапевтическими агентами; 2) для получения пероральных и назальных вакцин и доставки лекарств с пролонгированным высвобождением из полимерной матрицы [100]; 3) для конструирования ДНК-содержащих носителей [101], необходимых при получении генетически модифицированных универсальных неаутологичных клеточных линий, которые могут быть использованы для лечения пациентов с одним и тем же заболеванием. Эти клетки могут быть и клетками других организмов, но упакованными в полупроницаемые,

не аллергенные и антииммунные хитозановые микрокапсулы, позволяющие вырабатывать рекомбинантные лекарственные средства, используя потенциал хозяина и не запуская его защитные системы. Полученная технология может решить задачу, связанную с частым использованием иммунодепрессантов. Спектр болезней, которые можно лечить таким способом, разнообразен. Это и моногенные наследственные болезни (гемофилия, анемия, дефицит некоторых ферментов, гормонов и витаминов), и средо-зависимые мультифакториальные (диабет, болезни нервной системы) [68], и аутоиммунные [102].

В комплексе с гидроксипатитом производные хитозана можно использовать и для изготовления зубных протезов [12; 103], а в комплексе с различными наполнителями хитозан предложен для приготовления антикариесных зубных паст, применение которых снизит адгезивные свойства бактерий, вызывающих кариес [103].

Шампуни с добавлением хитозана характеризуются антистатическими свойствами, усиливают эластичность волос, обладают противоперхотной активностью. Антибактериальные свойства хитозана и его гипоаллергенность позволяют включать его в качестве композитов в кремы для проблемной кожи. Гелеобразующее свойство хитозана может быть употреблено в качестве природного соединения для укладки и завивки волос, а хорошая совместимость с кожей позволяет включать в различные профилактические антибактериальные средства [28].

### **Хитин в промышленной и пищевой биотехнологии**

Хитозан и хитин соответствуют требованиям, предъявляемым к носителям для иммобилизации ферментов [32–33]. Во многих случаях это приводит к улучшению их каталитических свойств по сравнению с иммобилизацией на других матрицах. Эффективное разделение смесей аминокислот было достигнуто при лигандообменной хроматографии на медно-хитозановом комплексе. Хи-



тин и хитозан используют в качестве аффинного сорбента для очистки сериновых протеиназ [34; 104], ингибиторов трипсина [35], лизоцима, лектинов, хитиназ [36], глюкоамилазы [41], особо чистых лекарственных пептидных или белковых препаратов [105].

Хитиновые сорбенты можно использовать для аффинного выделения рекомбинантных белков [106]. Для этого к гену целевого белка присоединяется фрагмент гена, кодирующего С-концевой участок хитиназы A1 *Bacillus circulans* WL-12, состоящий из 52-х аминокислотных остатков и имеющий высокое сродство к хитину. Конструкция экспрессируется, и полученный белок наносится на хроматографическую колонку с хитином. Затем, после отмывки от примесей, колонка остается в буфере, содержащем дитиотреитол или β-меркаптоэтанол. Белок гидролизуется по зоне «аланин (нативного белка) – цистеин (хитин-связывающего фрагмента)» и легко элюируется с колонки [107].

Способность хитозановых пленок образовывать хелаты позволяет использовать их в качестве искусственных мембран [3; 76], сорбентов тяжелых металлов и радионуклидов [43; 108] и характеризует хитозан как антиканцерогенное и антимуtagenное соединение [109]. Следует обратить внимание на то, что при подборе хитозана, например, для иммобилизации тяжелых металлов, важная роль отводится степени ацетилирования носителя [44]. Такое свойство хитозана может быть применено в атомной промышленности для локализации утечек радиоактивных веществ, концентрирования отходов ядерного топлива и очистки воды от жидких радиоактивных отходов.

В качестве пищи хитинсодержащие продукты употребляют с древнейших времен, но только в последнее время хитозан и его производные стали использоваться в этой сфере жизнедеятельности человека в чистом виде. В обзорной работе Т.М. Сафоновой [110] описываются не менее 15 направлений пищевой промышленности, где можно использовать хитозан. Так, например, хитозан как сорбент удобен для извлечения из различных сыво-

роток и промывных вод питательных веществ. Кроме этого, хитозан используется для очистки воды и осветления различных напитков, в том числе и алкогольных; освобождения продуктов питания от перекисных соединений липидов, нарушающих товарные и пищевые качества продуктов. Свойство хитозана формировать гели различной консистенции позволяет проводить загущение, желирование и уплотнение продуктов питания и разрабатывать новые виды термоустойчивых, биологически активных, желирующих заливок низкой энергетической ценности [110–111]. Особое внимание следует обратить на дезинфицирующие свойства хитозана и его производных, которые позволяют включать его в пищевые продукты в качестве природных консервантов [93], использовать для удаления из продуктов, в особенности из воды, различных ароматических соединений, токсинов, быстрой и эффективной ее очистки. Так, распыление хитозана на яблоках и апельсинах приводило к более эффективной их защите от возбудителей различных гнилей [112–113]. El-Ghaouth с соавторами [112] предложили хитозан для послепосевной защиты клубники, болгарского перца и огурцов от гнилей, вызываемых *Botrytis cinerea* и *Rhizopus stolonifer*. Обнаруженное свойство снижения интенсивности потери воды в продуктах питания, хранящихся в хитозановых пленках, на фоне их антигрибной активности позволяет использовать этот биополимер в качестве надежного материала, сохраняющего пищу в свежем состоянии [114].

### **Хитин и индуцированная защита растений от патогенов**

Возможность использования хитина и его олигомеров в растениеводстве, в первую очередь для защиты посевов от пагубного воздействия фитопатогенных организмов, обсуждается давно, и с каждым годом ассортимент биологически активных веществ на основе хитина расширяется. Например, в отличие от пленок на основе карбоксиметил-целлюлозы, широко используемых в настоящее

время, хитозан имеет оптимальную для семян влагоудерживающую способность, а также обладает селективным свойством по отношению к кислороду [61; 114].

При оценке биологического действия хитина и его производных обращают внимание на то, что они характеризуются свойствами средств защиты растений и регуляторов роста. Обработка посевного материала зерновых олигомерами хитина приводила к увеличению урожая до 35% при более низких затратах, чем применение пестицидов. При этом олигомеры хитина проявляли как фунгистатическую, так и рострегулирующую активность [17; 40; 59–61; 84].

Свойство хитозана ингибировать рост грибов варьирует в зависимости от химического состава их клеточных стенок [115], структуры и концентрации вносимого препарата [40]. Наиболее сильно ингибировался под влиянием хитина рост грибов, имеющих целлюлозно-глюкановую клеточную стенку, а грибы с хитин-глюкановой клеточной стенкой реагировали на обработку этим биополимером в меньшей степени. Различия в размере грибных колоний, растущих на хитине, проявляются даже у штаммов одного и того же вида гриба. Например, для подавления роста *F. solanii* f. sp. *phaseoli* эффективна была концентрация хитина 31 мг/мл, а *F. solanii* f. sp. *pisi* – 62 мг/мл [40].

Выявлена зависимость роста грибов от размеров молекул экзогенного хитозана и степени его ацетилирования [40; 116]. Например, фунгистатичность по отношению к *Aphanomyces eutieches*, *Phytophthora megasperma* f. ssp. *glycinea*, *Phytophthora parasitica* f. ssp. *lindemutiana*, *Rhizoctonia solani*, *B. cinerea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solanii* f. ssp. *pisi*, *F. avenaceum*, *F. oxysporium* f. ssp. *phaseoli* наблюдали при использовании высокомолекулярного хитозана [40]. Однако некоторые исследователи указывают на наиболее сильное ингибирование роста грибов низкомолекулярным (30 кДа) хитозаном или на частицах хитина размером менее 0,05 мкм [61; 40]. Фунгистатическую или фунгицидную активность хитозана можно увеличить путем его химичес-

кой модификации. Так, азотнокислый хитозан проявлял фунгицидный эффект по отношению к возбудителю корневых гнилей зерновых, грибу *F. solanii* уже в концентрациях от 3 до 9 мг/мл. Эти значения были на порядок выше, по сравнению с действием немодифицированного хитозана [40]. Значительную роль в фунгицидных свойствах хитозана занимает степень ацетилирования. Так, если под действием гептасахарида со степенью ацетилирования 0% рост гриба сильно ингибировался, то ацетилированные формы таким эффектом не обладали [117].

Особый интерес вызывают работы, где показано снижение количества и видового состава патогенных микроорганизмов и нематод в почве, содержащей хитин [65]. Так, опудривание семян препаратом олигомеров хитина с расходом всего 2 г/т повышало урожай корнеплодов моркови на 24–26 ц/га [17]. Замачивание в растворе хитозана семян томатов индуцировало системную нематодоустойчивость, способствовало образованию мощной корневой системы и утолщению стеблей. На иммунизированных растениях количество и плодовитость половозрелых самок нематод снижались вдвое [118].

Высокая эффективность хитина в защите растений от болезней установлена при формировании его баковых смесей с микроудобрениями и некоторыми органическими кислотами, например янтарной [61], а также при формировании смеси с препаратами, содержащими живые клетки эндофитных бактерий [6; 119]. В то же время при использовании хитина и его производных следует обратить внимание и на возможность снижения продуктивности сельскохозяйственных культур, например бобовых, при их культивировании на почвах с высоким содержанием хитина, что, как предполагают, связано с его способностью супрессировать вирулентность симбиотрофов-азотфиксаторов [65]. Одним из первых результатов работы российских ученых по разработке эффективных способов использования хитина в растениеводстве было создание препарата «Нарцисс» компанией «Восток-МТД» [63]. На современном рынке

для протравливания семян и обработки растений рекомендуют применение таких препаратов, как «Агрохит», «Хитозар Ф» [61].

### Механизмы индуцированной хитином устойчивости на примере растений

Следует учитывать несколько условий, влияющих на ответную реакцию растений при обработке хитином и соответственно необходимых при составлении рекомендаций по использованию препаратов на основе хитина и его производных в практических целях.

В индукции развития ответных защитных реакций растительных клеток важным показателем является степень полимеризации и ацетилирования хитоолигосахаридов. Ацетилированные хитоолигосахариды вызывают более активный иммунный ответ клеток пшеницы и риса в сравнении с неацетилированными формами [120–121]. Олигомеры хитина активируют транскрипцию множества генов, среди которых наиболее чувствительны гены, кодирующие стрессовые белки. Так, клетки ячменя реагировали на внесение в среду культивирования олигомеров со степенью полимеризации 6–8 и степенью ацетилирования 100% активацией синтеза фенилаланинаммиак-лиазы, хитиназы,  $\beta$ -(1-3)глюканазы [120; 122], а клетки риса – изменениями в транскрипционной активности 71 гена [123]. Из семи изоформ  $\beta$ -(1-3)-глюканазы через 24 ч после обработки элиситором активировалась транскрипция гена только одной, что свидетельствует о наличии среди гомологичных генов специфически экспрессирующихся в ответ на хитин [122]. Согласно работам группы P. Vander [124], в отрезках листьев пшеницы олигосахариды со степенью ацетилирования 50–80%, полимеризации 6–10 кДа и концентрации 100 мг/л вызывают активацию пероксидазы и фенилаланинаммиак-лиазы. Обработка хитином, а не хитозаном, приводила к формированию некрозов на отрезках листьев пшеницы и риса [121; 124]. Самые массивные некрозы при этом обнаружены после инъекции хитина с молекулярной массой 96 кДа и степенью ацетилирования 45%,

а хитозан со степенью ацетилирования 1% такого эффекта не вызывал. Следует обратить внимание на то, что развитие некротической реакции в растениях риса под влиянием хитоолигосахаридов многократно снижалось, но не ингибировалось под влиянием ингибиторов НАДФН-оксидазы [121], что предполагает участие этого фермента в сигнальных путях развития гиперчувствительности под влиянием хитина. Особо следует отметить, что индукция под влиянием хитоолигосахаридов продукции  $H_2O_2$  оказалась связанной с посттранскрипционными модификациями фермента [121]. Кроме этого, неполное ингибирование некрозов дифенилениодиниумом предполагает наличие альтернативных путей развития некротической реакции с участием хитина, не связанных с НАДФН-оксидазной системой. Не исключено, что этот путь связан с активацией альтернативных оксидаз, подобно их активации под влиянием салициловой кислоты [125].

Высокомолекулярный хитин индуцировал накопление хитиназы и синтез дитерпенов в среде культивирования клеток риса, но не оказывал никакого воздействия на биохимический статус суспензионных культур клеток гороха и петрушки [117; 126]. На картофеле и томатах более эффективными были олигомеры хитозана со степенью полимеризации 5 кДа и степенью ацетилирования 15%. При этом в растениях обоих видов накапливались фитоалексины, а уровень стероидов, необходимых для жизнедеятельности грибов, снижался [16].

Фитофтороустойчивость иммунизированных растений картофеля оказалась пролонгированной и распространялась как на клубни во время хранения, так и на вегетирующие растения, кроме того, остаточная индуцированная хитином устойчивость сохранялась и на новом урожае [127]. Сокращение количества стеринов, а также параллельное накопление ришитина, к которому лишенный стеринов патоген приобретает повышенную чувствительность, является одним из механизмов устойчивости индуцированной хитозаном в патосистемах «картофель – возбуди-

тель фитотрофа» и «томаты – галловая нематода» [16].

В контроле развития серой гнили на растениях огурца наибольшую эффективность проявил, как и в случае с картофелем и томатом [16], низкоацетилованный хитозан [80]. Удивление вызывает то, что этот эффект проявляется на фоне меньшей активации хитозаназы и пероксидазы хитозаном в сравнении с олигомерами хитина. Высокую биологическую активность оказывали низкоацетилованные хитоолигосахариды и на растениях арабидопсиса [128]. Однако по отношению к активности фенилаланинаммиак-лиазы, кроме полностью дезацетилованных форм олигомеров хитинаолигосахаридов, на растениях этого вида работали и хитоолигосахариды со степенью ацетилирования 75%. Это предполагает другие, не связанные с активацией этих защитных ферментов хозяина механизмы устойчивости растений к патогенам.

По предположениям О.Л. Озерецковской с сотрудниками [15] и С.Н. Чиркова [62], в случае хитина и его производных не исключено высокоспецифическое связывание с мембранными и рецепторами растений лектиновой природы. Фрагменты хитозана и его дезаминированных производных действуют, скорее всего, за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных молекул элиситора с отрицательно заряженными компонентами мембран [129], такими как фосфолипиды и пектины клеточной стенки или молекулы ДНК. Доказано, что олигомеры хитина, взаимодействуя с отрицательно зараженной плазмалеммой, могут приводить к нарушению ее структуры, к активации липоксигеназы, участвующих в синтезе жасмоновой кислоты [130]. Кроме этого, вероятно, ответная реакция растений значительно зависит от их видового состава, соответственно генетически обусловленного количества и функциональных особенностей рецепторов хитоолигомеров на поверхности плазматической мембраны. Однако эти гипотезы требуют более детальных исследований, что позволит использовать этот биополимер и его производные эффективнее и с учетом видового состава растений.

Растения с высоким содержанием апопластных защитных белков способны сдерживать действие высоких концентраций метаболитов гриба, нарушающих морфологическую и физиологическую целостность клеток. При этом локальное повышение уровня антиоксидантных ферментов, таких как каталаза и пероксидаза, может предотвращать избыточно-глобальную продукцию активных форм кислорода, вызываемую олигомерами хитина, и может быть весьма необходимым для растения не только из-за опасности самоповреждения, но и потому, что низкие, а не высокие концентрации  $H_2O_2$  наиболее эффективно стимулируют экспрессию генов защитных белков растений [131]. Следует заметить, что большинство из защитных патоген-индуцируемых белков характеризуется высокой специфичностью к ацетилованному хитину [132]. Обнаруженный нами феномен сорбции анионной пероксидазы и оксалатоксидазы на мицелии гриба так же предполагает специфическую генерацию активных форм кислорода и последующую лигнификацию мицелия, содержащего ацетилованный хитин [37].

Необходимо помнить и о специфических рецепторах, содержащихся на плазмалемме и физиологически направленных на рецепцию элиситоров. Действительно, на поверхности мембран растительных клеток были идентифицированы белки размером 55–80 кДа [129; 133]. Например, у сои и риса [129] они обладали сродством как к Nod-факторам, так и к хитоолигосахаридам и наибольшую аффинность проявляли к  $(GlcNAc)_8$  [122; 134]. Неацетилованный  $(GlcN)_8$  и октамер галактозамина  $(GalNAc)_8$  у риса с этим рецептором не взаимодействовали.

Показана ключевая роль двухкомпонентных трансмембранных белков в передаче сигнала от хитинового элиситора. Рецепторные плазмалеммные белки CEBiP (Chitin Elicitor Binding Protein) и CERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase) оказались представлены гетеродимерами, содержащими аминокислотные последовательности, богатые лизином (LysM), и гомологичные – серин-треониновым киназам



[122; 135]. Эта аминокислотная последовательность была гомологична гидролазам, разрушающим клеточные стенки бактерий и грибов. К тому же Miya с сотрудниками [136] и Wan с сотрудниками [137] практически независимо друг от друга сообщили, что LysM домен, содержащий рецептор-подобные киназы 1 (LysM domain-containing receptor-like kinase 1 (LysMRLK1)), и CERK1 критичны для прохождения хитинового сигнала в арабидопсисе. В то же время исследования Каку с сотрудниками [122] показали, что хотя CEVbP белок и имеет LysM домен и играет критическую роль в сигнальной системе, чувствительной к хитину у риса, но не содержит внутриклеточный киназный домен. В дальнейшем было определено, что для эффективной передачи хитинового сигнала CEVbP белок нуждается в партнере, содержащем рецептор, подобный киназу [137; 138]. Подобная структура рецепции липохитоолигосахаридов и хитоолигосахаридов на растениях бобовых и риса соответственно [122; 133; 138; 139] предполагает близость системы рецепции этих олигосахаридов. Полученные данные подчеркивают важность степени ацетилирования при формировании симбиотических отношений ризобияльных бактерий у Nod-факторов [140] и защитного антипатогенного эффекта с участием олигомеров хитина [137]. Подобные киназные рецепторы, например *FIBCD1* [141], воспринимающие хитоолигомеры, состоящие из не менее трех остатков N-ацетилглюкозамина, обнаружены и у других видов живых организмов [90].

Соответственно гетеродимерный комплекс LysMRLK1/CERK1 с CEVbP-подобными белками может участвовать как в формировании последующей защитной реакции организма от патогенов, так и в формировании симбиоза с симбиотрофами. Это предполагает способность последних вмешиваться в систему иммунитета посредством изменений в структуре молекул рецепции (олигосахаридов). Например, рецепторы у Nod-факторов и олигомеров хитина более чувствительны к ацетилированному хитину, но не хитозану. В этом случае выработка дезацетилаз патоген-

ном и последующее дезацетилирование полисахаридов своей клеточной стенкой исключает рецепцию хозяином [142]. Другим механизмом маскировки патогена от иммунной системы может быть выработка последним эффекторов, обманывающих ее [143–145].

Элиситоры усиливают защитный эффект, активируя выход защитных белков, в том числе и оксидоредуктаз, во внеклеточную фазу [132]. Вероятно, процесс ингибирования ростовых характеристик грибов защитными белками и лигнификация происходят специфически концентрированно в месте инфекции. Это приводит к изоляции соседних растительных тканей от инфицированной зоны. Эффективность лигнификации, опосредованной активацией синтеза фенольных соединений и активных форм кислорода, а также их окислением пероксидазой, может многократно возрастать в связи с появлением в зоне инфицирования элиситоров [146], например, ацетилированных хитоолигомеров [133].

Поскольку относительно уязвимым у оксидоредуктаз, задействованных в защитных реакциях, является узкий диапазон pH, при котором они обладают высокой ферментативной активностью, следует помнить и о том, что высвобождение ацетильных остатков под влиянием дезацетилаз, а также жизнедеятельность самих грибов влияют на кислотность апопласта в инфекционной зоне [25; 147]. Не исключено, что в целях снижения эффекта подкисления и в качестве защитной реакции при любой стрессовой ситуации в растениях включаются механизмы закачки ионов кальция в эту фракцию [148], нейтрализующие образующуюся кислоту. Так, патогены и их элиситоры, в особенности ацетилированные олигомеры хитина [133], приводят к активному выделению ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из клеточных стенок растений и осцилляции их уровня с кратковременно высокими и низкими концентрациями в цитозоле [149–150]. При этом происходит быстрое подщелачивание среды инкубации клеток [120; 133–134]. Особо следует заметить, что в суспензионных клетках риса ацетилированные олигомеры влияли на отмеченные параметры более активно в срав-

нении с их деацетилированными аналогами [120]. Выдвигаются предположения, что сами олигомеры хитина, связываясь с рецепторами на плазмалемме клеток растения, прилежащих к гифам гриба, способствуют передаче сигнала для экспрессии генов стрессовых белков [123; 133; 151], в т.ч. и кальцийсвязывающих. Изменение уровня ионов  $Ca^{+2}$  в клетке и в апопласте приводит к нарушениям в процессах общего метаболизма, что впоследствии может привести к активации генов каспаз и  $Ca^{+2}$ -опосредованной программированной гибели клеток растений [152]. Концентрация кальция оказывает влияние на систему сигнальной трансдукции, происходящей в растительной клетке под воздействием элиситоров [130].  $Ca^{+2}$  влияет на активность 1-3- $\beta$ -глюкансинтазы [153], наиболее активно синтезирующей каллозу в месте локализации патогена, что часто связывают с формированием устойчивости к проникновению в растительные клетки патогенного агента, в том числе и вирусов [62]. Ингибирование работы кальциевых каналов и хелирование ионов  $Ca^{+2}$  [125; 154] отключают индуцируемые элиситорами  $Ca^{+2}$ -сигналы [152] и доказывают значительную роль ионов  $Ca^{+2}$  в регулируемой хитоолигосахаридами транскрипционной активности растительного генома. Интересно, что экспрессия синтеза  $Ca^{+2}$ -связывающих белков под влиянием хитоолигосахаридов оказалась подобной процессу, происходящему под влиянием кальциевого ионофора А-23187.

Само формирование олигомеров хитина в растениях, подвергшихся инфицированию патогенными грибами, связано с активностью хитиназ [123; 155], которые, однако, способны к деградации хитина только со степенью ацетилирования от 40 до 80% [40; 156]. Это же положение предполагает, что грибы-паразиты, занимая богатую питательными веществами экологическую нишу, могут каким-то образом «обмануть» гидролазы хозяина, что проявляется, например, в низкой эффективности защитных свойств хитиназы в инфицированных некоторыми возбудителями болезней растений, трансгенных по гену этого

фермента. Действительно, в инфекционных структурах патогенов вместо хитина в процессе инфицирования часто обнаруживается хитозан [142]. Это дополнительно доказывается отсутствием взаимодействия агглютини на зародышей пшеницы, высокоспецифичного к N-ацетилглюкозамину, с проникшими в ткани растений гифами патогенов. Следовательно, у патогенных грибов есть белки, играющие значительную роль в модификации клеточных стенок [21], маскирующие свои инфекционные структуры от защитной системы хозяина [157] для успешного его инфицирования. В пользу такого предположения говорят и недавно полученные нами данные о высокой деацетилирующей активности культурально-го фильтра агрессивного штамма *S. nodorum* в сравнении со слабоагрессивными [158].

Деацетилирование хитина может в первую очередь привести к формированию устойчивости клеточных стенок патогенов к деградации хитиназами [156]. Это положение распространяется не только на хитиназы, но также на амидогидролазы (папаин) [159] и лизоцим [160]. Кроме этого, деацетилирование хитина может привести к снятию эффекта локального и концентрированного оксидативного взрыва через механизм снижения сорбционной активности оксидоредуктаз на деацетилированный хитин клеточной стенки вирулентного гриба [37; 161].

### **Хитин деацетилазы патогенов как фактор агрессивности**

Хитин-деацетилазы (хитин – амидогидролаза к.ф. 3.5.1.41.) относятся к обширному семейству углеводных эстераз [<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY>] и впервые были обнаружены у *M. rouxii* [24; 23; 11]. В табл. 4 суммированы основные характеристики некоторых представителей хитин-деацетилаз, которые были выделены из различных грибов. Хитин-деацетилазы являются гликопротеинами и секретируются в культуральную среду [25; 162]. Обнаружено, что у дрожжей хитин-деацетилазы синтезируются во время аскоспорирования (сумкообразования) [163].

Описаны структурные особенности деацетилаз и механизм деацетилирования полисахаридов ферментами этого семейства [160; 164]. Хитин-деацетилазы из разных видов грибов обладают разнообразием ферментативной активности по отношению к различным олигосахаридам. Процесс гидролиза ацетильных групп от субстрата происходит по механизму множественной атаки, предусматривающий первоначальное образование фермент-полимерного комплекса с последующим их гидролизом вдоль полимерной цепи [165]. Наиболее подробно исследован механизм действия хитин-деацетилаз на примере мукоровых грибов, дрожжей и патогенного гриба *Colletrichum lindemutianum* (штамм 63144). Для инициации фермента на хитине важно наличие трех или четырех (в зависимости от вида и даже штамма гриба) последовательно соединенных остатков N-ацетилглюкозамина в хитине [25; 166]. Только при таком условии происходит деацетилирование последнего третьего или четвертого остатка N-ацетилглюкозамина [25; 164; 167]. Хитин-деацетилаза этих грибов не активна в отношении моно- и димерных глюкозамин производных хитина и ингибируется ими [23–24].

Фермент в клетках грибов функционирует только на дисперсных цепочках хитина [23], деацетилируя до 30% ацетильных групп гликольхитина и хитина, но не N-ацетилированного гепарина, N-ацетилированного галактозамина, диацетилхитобиозы и мономера N-ацетил глюкозамина [24], пептидогликана [162]. Обнаружено, что деацетилазы из некоторых грибов, например *A. nidulans* и *C. lindemutianum* (штамм ATCC 56676), могут деацетилировать низкомолекулярные олигомеры хитина (GlcNAc)<sup>2</sup> [167]. Фермент специфически ингибируется при избытке ацетат-анионов [167]. В этих условиях, как предполагают, деацетилазы работают как ацетилазы и могут ацетилировать олигомеры β-D-GlcNAc-(1-4)-GlcN до хитобиозы. Это говорит об их разнообразии по субстратной специфичности.

Многokратно повышает активность фермента внесение в ферментативную среду ионов кобальта [164; 162]. Интересно то, что в присутствии ионов Co<sup>+2</sup> высокую хитин-деацетилазную активность проявляют и ксиланэстеразы некоторых организмов, например *Streptomyces lividans* [162]. Этого не наблюдалось у хитиндеацетилаз и ксиланэстераз по отношению к ацетилированным ксиланам [162].

Таблица 4

Характеристика хитиндеацетилаз из различных источников [25, 164, 166–171]

| Источник                                      | Молекулярный вес, кДа  | Изоэлектрическая точка | Оптимальный pH работы фермента | Оптимальная температура, °C | Ингибирование ацетатом |
|---|------------------------|------------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| <i>Mucorrouxii</i>                            | 75                     | 3,0                    | 4,5–5,0                        | 50                          | Да                     |
| <i>Absidacoerulia</i>                         | 75                     | 5,0                    | 5,0<br>5,8                     | 50                          | Да<br>Нет              |
| <i>Aspergillus nidulans</i>                   | 27,5<br>27,3           | 2,75                   | 7,0                            | 50                          | Нет                    |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>               | 43                     | «                      | 8,0                            | 50                          | Да                     |
| <i>Colletrichum lindemutianum</i> (ATCC56676) | 24                     | «                      | 11,5                           | 50                          | Нет                    |
| <i>C. lindemutianum</i> (UPS9)                | 25                     | «                      | 8,0                            | 60                          | Нет                    |
| <i>C. lindemutianum</i> (DSM 63144)           | 150                    | 3–5                    | 8,5                            | 50                          | Нет                    |
| <i>Uromyces viciae-fabae</i>                  | 48,1;<br>30,7;<br>25,2 | «                      | 5,5–6,0                        | «                           | «                      |

Примечание. « – исследования не проведены.

## Заключение

Анализ известных литературных данных показывает, что такой широко распространенный в природе биополимер, как хитин, обладает рядом свойств, позволяющих применить его в различных сферах производственной деятельности. Уникальной следует считать его высокую сорбционную активность, меняющуюся от аффинных до ионообменных, в зависимости от изменений в степени ацетилирования биополимера. Особый интерес хитин и его олигомеры представляют для медицины и сельского хозяйства, проявляя значительную биологическую активность, связанную с тем, что растения и животные, в том числе и человек, выработали в процессе миллионов лет эволюции своеобразные способы рецепции хитина и последующего запуска защитных свойств организма, поскольку этот биополимер является одним из важных компонентов покровов патогенной для них микрофлоры и фауны.

Недавними исследованиями обнаружено, что у млекопитающих и растений механизмы распознавания и последующего реагирования на воздействие хитина и хитозана в общих деталях сходны и связаны с сигнальной киназной системой. В то же время прослеживаются и серьезные различия в механизмах передачи хитинового сигнала в разных таксонах, которые могут быть связаны с относительной степенью чистоты и неоднородностью использованного в экспериментах хитина и хитозана, в частности, неоднородностью степени ацетилирования. Кроме того, прослеживается обратная зависимость между размером частиц и иммунологической активностью препаратов на основе хитина и временем запуска ответной реакции. Хотя в выяснении того, как растения распознают хитин и хитозан значительный прогресс и достигнут, рецепторы млекопитающих и человека, ответственные за это, предстоит еще определить. Соответственно в сфере изучения биологической активности хитина и его дезацетилированного производного хитозана остается еще много вопросов, на которые

еще предстоит ответить. Но самое важное, что следует отметить, что у хитина и его олигомеров, идеально подходящих для использования в различных сферах жизнедеятельности человека, большое будущее.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Domard A. Some Physicochemical and Structure Basis for Applicability of chitin and chitosan / A. Domard // Second Asia Pacific chitin Symposium. Bangkok, 1966. P. 1–12.
2. Феофилова Е.П. Ключевая роль хитина в образовании клеточной стенки грибов // Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука. 2002. С.91–99.
3. Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C. Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. Adv. Polym. Sci. 2004. V. 186. P. 151–209.
4. Тесленко А.Я., Попов В.Г. Хитин и его производные в биотехнологии, 1982. М.: ОНТИ ТЭИ микробиопром. 44 с.
5. Унрод В.И., Лега Ю.Г., Солодовник Т.В. Использование промышленного отхода гриба *Aspergillus niger* для получения хитин содержащих комплексов // Новые достижения в исследовании хитина и хитозана. М.: Изд. ВНИИРО, 2001. С.58–61.
6. Немцев С.В., Зуева О.Ю., Хисматуллин Р.Г., Хисматуллин М.Р., Лариков В.В., Варламов В.П. Пчела как потенциальный источник хитозана // Новые достижения в исследовании хитина и хитозана. М.: Изд. ВНИИРО, 2001. С. 39–42.
7. Kohn A. Chitin and its derivatives: opportunities in diverse niches. \$335b million US market foreseen // Bioprocess technol. 1987. V. 9. P. 4–6.
8. Гольбрайх Л.С. Хитин-хитозан: сторение, свойства, применение // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7. С. 51–56.
9. Khanafari A., Marandi R., Sanatei Sh., recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods // Iran J. Environ. Halth Science. 2008. V. 5. P. 19–24.
10. Тиунова Н.А. Хитинолитические ферменты микроорганизмов // Успехи биологической химии 1989. Т. 30. С. 199–219.
11. Knorr D., Klein J., Production and conversation of chitosan with cultures of *Mucor rouxii* or



- Phycomyces blakesleanus // Biotechnol. Letter. 1986. V. 8. P. 691–694.
12. Нудьга Л.А. Производные хитина и хитозана и их свойства // Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука. 2002. С. 141–177.
13. Pochanavanich P., Suntornsuk W., Fungal chitosan production and its characterization // Letters in Applied Microbiology. 2002. V. 35. P. 17–21.
14. Datema R., Wessels J.G.H., Van den Ende H. The hyphal wall of *Mucor mucedo*. 2. Hexosamin – containing polymers // Europ. J. Biochem. 1977. V. 80. P. 621–626.
15. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Зиновьева С.В. Хитозан как элиситор индуцированной устойчивости растений // Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука. 2002. С. 339–345.
16. Максимов В.И., Родоман В.Е., Лунцевич В.Г. Фитоактивные хитиновые соединения (Обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 1997. Т. 33, № 4. С. 355–362.
17. Муллагалиев И.Р., Галиаскарова Г.Г., Монаков Ю.Б. О деструкции хитозана под действием перекиси водорода // Доклады АН. 1995. Т. 345, № 2. С. 199–204.
18. Lopatin S.A., Ilyin M.M., Pustobaev V.N. et al. Mass-spectrometric analysis of N-acetyl-chitooligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of chitosan // Anal. Biochem. 1995. V. 227, № 2. P. 285–288.
19. Cho Y.-W., Cho Y.-N., Chung S.-H. et al. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator // Biomaterials. 1999. V. 20. P. 2139–2145.
20. Kamada T., Takemaru T. Modification of cell wall polysaccharides during stripe elongation in the basidiomycete *Corpinus cinereus* // J. Gen. Microbiol. 1983. V. 76. P. 319–330.
21. Cabib E., Bowers B., Roberts R.L. Vectorial synthesis of polysaccharide by isolated plasma membranes // PNAS USA. 1983. V. 80. P. 3318–3321.
22. Davis L.L., Bartnicki-Garsia L. Chitosan synthesis by the tandem action of chitin sintetase and chitin deacetylase from *Mucor rouxii* // Biochemistry, 1984. V. 23. P. 1065–1072.
23. Duran A., Cabib E., Solubilisation and partial purification of yeast chitin syntetase // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. P. 4419–4425.
24. Araki Y., Ito E., A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii* // Eur. J. Biochem. 1975. V. 55. P. 71–78.
25. Tsigos I., Martinou A., Kafetzopolus D., Bouriotis V. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology // Trends in Biotechnol. 2000. V. 18. P. 305–312.
26. Bulava C. *CSD2*, *CSD3*, and *CSD4*, genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the *CSD2* gene product is related to chitinsintases and developmently regulated proteins in *Rhizobium species* and *Xenopus laevis* // Mol. Cell. Biol. 1992. V. 12. P. 1764–1776.
27. Flese A.P., Panda T. Studies on application of chitin and its derivatives // Bioprocess Engineering. 1999. V. 20. P. 505–512.
28. Албулов А.И., Самуйленко А.Я., Фролова М.А. Хитозан в косметике // Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука, 2002. С. 360–363.
29. Tharanathan R.N., Kuttur F.S. Chitin – the undisputed biomolecule of great potential // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2003. V. 43. P. 61–87.
30. Sorlier P., Denusiere A., Viton C. Domard A. Relation between the degree of acetylation and the elctrostatic properties of chitin and chitosan // Biomacromolecules. 2001. V. 2. P. 765–772.
31. Dornish M., Kaplan D., Skaugrud O. Standards and gudelines for biopolimers in tissue-engineered medical products. ASTN alginate and chitosan standard guides // Annals of New York Acad. Sci. 2001. V. 944. P. 388–397.
32. Finley J.W., Stanley W.C., Walters G.G. Removal of chill haze from beer with papain immobilized on chitin // Biotech. Bioeng. 1977. V. 19. P. 1895.
33. Synowiecki J., Sihorski L.E., Nozk M. Immobilization of invertase on krill chitin // Biotehmol. Bioeng. 1981. V. 23. P. 291–293.
34. Бендикене В.Г., Песлякас И.Г. Хроматография сериновых протеиназ на хитине и его производных // Прикл. биохимия и микробиология. 1981. Т. 17(3). С. 441–447.
35. Senstad C., Mattiasson B. Affinity-precipitation using chitosan as ligangd carrier // Biotechnol Bioeng. 1989. V. 33. P. 216–220.
36. Лахтин В.М. Лектины в исследовании белков // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Биотехнология, 1998. Т. 2. С. 1–288.

37. Максимов И.В., Черепанова Е.А., Ярулли-на Л.Г., Ахметова И.Э., Выделение «хитин-специфич-ных» оксидоредуктаз пшеницы // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41, № 6. С. 616–620.
38. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications // Prog. Polym. Sci. 2006. V. 31. P. 603–632.
39. Kao P.M., Chen C.I., Huang S.C., Lin K.M., Chang Y.C., Liu Y.C. Preparation of fermentation-processed chitin and its application in chitinase affinity adsorption // Process Biochem. 2009. V. 44. P. 343–348.
40. Hirano S., Yamamoto T. et al., Chitinase activity in seed coated with chitosan derivatives // Agr. Biol. Chem. 1990. V. 54. P. 2719–2720.
41. Denise G.F., Geraldo L.S. Characterization of glucoamilase immobilized on chitin // Biomass. 1990. V. 23(1). P. 71–78.
42. Camci-Unal G., Pohl N.L.B. Quantitative Determination of Heavy Metal Contaminant Complexation by the Carbohydrate Polymer Chitin // J. of Chem. & Engineering Data. 2009. V. 55. P. 1117–1121.
43. Yoshihide K., Hiroyuki Y., Satoru H., Hiroaki T. Break-through curve for adsorption of mercury (II) on polyaminated highly porous chitosan beads // Water Sci. Tech. 1997. V. 35. P. 97–105.
44. Kim C.Y., Choi H.M., Cho H.T. Effect of acetylation on sorption of dyes from chromium on chitin // J. Appl. Poly. Sci. 1997. V. 63. P. 725–736.
45. Trimukhe K.D., Varma A.J. Complexation of heavy metals by crosslinked chitin and its deacetylated derivatives // Carbohydr. Polym. 2008. V. 71. P. 66–73.
46. Pacheco N., Garnika-Gonzalez M., Ramirez J.Y., Flores-Albino B., Gimeno M., Bárzana E., Shirai K. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. P. 2849–2854.
47. Ballassa L.L., Chitin and chitin derivatives for promoting wound healing // Пат. США №117085. 02.09.75.
48. Seng J.M. Chitine, Chitosane et derives: de nouvelles perspectives pour l'industrie // Biofutur. 1988. V. 71. P. 40–44.
49. Koller B., Müller-Wiefel A.S., Rupec R., Korting H.C., Ruzicka T. Chitin modulates innate immune responses of keratinocytes // PLoS ONE. 2011. V. 6. e16594. doi:10.1371/journal.pone.0016594
50. Badawy M.E.I., Rabea E.I. A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogen and Their Applications in Crop Protection // Inter. J. of Carbohydrate Chemistry V. 2011, ID460381, 29 p. doi:10.1155/2011/460381.
51. Ravi Kumar M.N.V., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb A. J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives // Chem. Rev. 2004. V. 104 (12). P. 6017–6084.
52. Sugano M., Fujidawa T., Hiratsji Y. et al. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats // Amer. J. Chem. Nutr. 1980. V. 33. P. 787–793.
53. Yulitalo R., Lehtinen S., Wuolijoki E., Yulitalo P., Lehtimäki T., Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan // Arzneimittelforschung. 2002. V. 52. P. 1–7.
54. Ouchi T., Banda T., Huang T.Z., Ohya Y., Design of polysaccharide-5-fluoro uracil conjugates exhibiting antitumor activities // Polymer reprints. 1990. V. 31. P. 202–203.
55. Hiroyuki K., Ikuo S., Yu I., Ichiro A., Seiichi T., Masayoshi K., Atsushi O., Mitsunori O., Isamu I., Conjugation of RGDS peptide with CM-chitin augments the peptide mediated inhibition of tumor metastasis // Carbohydrate Poly. 1993. V. 21(4). P. 299–307.
56. Yen M.T., Yang J.H., Mau J.L. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells // Carbohydr. Polym. 2009. V. 75. P. 15–21.
57. Speiciene V., Guilmineau F., Kulozik U., Leskauskaitė D. The effect of chitosan on the properties of emulsions stabilized by whey proteins. Food Chem. 2007. V. 102. P. 1048–1054.
58. Spagna G., Pifferi P.G., Rangoni C., Mattivi F., Nicolini G., Palmonari R. The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan // Food Res. Int. 1996. V. 29. P. 241–248.
59. Freepons D.E. Plant growth regulators derived from chitin: Пат. США 4812159 МКИ с 05 F1100, С 05 G3/00/ N25586. Заявка 130387.
60. Гольшин Н.М. Новые средства защиты растений от болезней // Защита растений. 1992. № 8. С. 50–54.
61. Тютюрев С.Л. Научные основы индуцированной болезнестойчивости растений. СПб., 2002. 328 с.
62. Чирков С.Н. Противовирусная активность хитозана // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. С. 5–13.
63. Бегунов И.И., Калугин Н.Ф., Довгаленко В.Н., Стрелков Е.В. Нарцисс – альтернатива химическим протравителям // Новые достижения в ис-

следовании хитина и хитозана. М.: Изд. ВНИИРО, 2001. С. 76–77.

64. Максимов И.В., Валева А.Ш. Степень ацетилирования хитина и его биологическая активность в явлении фитоиммунитета // Микология и фитопатология. 2007. Т. 41. С. 393–402.

65. Sarathchandra S.U., Watson R.N., Cox N.R., di Menna M.E., Brown J.A., Burch G., Nevile F.J. Effects of chitin amendment of soil on microorganisms, nematodes, and growth of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perene* L.) // Biology and Fertility of soils. 1996. V. 22. P. 221–226.

66. Гафуров Ю.М., Мамонтова В.А., Рассказов В.А., Средства наружного применения препаратов «Полимед», «Автохит», «Гидрохит» // Новые достижения в исследовании хитина и хитозана. М.: Изд. ВНИИРО, 2001. С. 150–152.

67. Tucci M. G., Ricotti G., Mattioli-Belmonte M., et al., Chitosan and Gelatin as Engineered Dressing for Wound Repair // J. Bioactive and Compatible Polymers. 2001. V. 16. P. 145–157.

68. Марквичева Е.А. Хитозан и его производные в биоинкапсулировании // Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука. 2002. С. 315–326.

69. Фролова М.А., Албулов А.И., Еремец В.И. и др. Практические аспекты применения хитозана и его производных в различных областях народного хозяйства // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. М.: Изд. ВНИИРО, 2006. С. 68–70.

70. Okamoto Y., Watanabe M., Miyatake K., Morimoto M., Shigemasa Y., Minami S. Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on migrations of fibroblasts and vascular endothelium // Biomaterials 2002. V. 23. P. 1975–1979.

71. No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Hwang H.J., Meyers S.P. Antibacterial activities of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from tofu // J. Food Sci., 2002. V. 67. P. 1511–1514.

72. Xie W.M., Xu P.X., Wang W., Liu Q. Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative // Carbohydr. Polym. 2002. V. 50. P. 35–40.

73. Prasitsilp M., Jenwithisuk R., Kongsuwan K., Damrongchai N., Watts P. Cellular responses to chitosan

in vitro: The importance of deacetylation // J. Materials Science: Materials In Medicine. 2000. V. 11. P. 773–778.

74. Большаков И.Н., Насибов С.М., Куклин Е.Ю., Приходько А.А. Использование хитозана и его продуктов при воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта // Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука. 2002. С. 280–301.

75. Бондаренко В.М., Рыбалченко О.В., Вербицкая Н.Б., Антонов С.Ф. Воздействие хитозана на ультраструктуру клеток патогенных и условно патогенных микроорганизмов // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. М.: Изд. ВНИИРО, 2006. С. 175–179.

76. Вихорева Г.А., Гальбрайт Л.С. Пленки и волокна на основе хитина и его производных // Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука, 2002. С. 254–279.

77. Великова Т.Д., Ганичева С.И., Трепова Е.С. и др., Исследование прочностных характеристик и биостойкости бумаги после обработки растворами хитозана и его производных // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. М. Изд. ВНИИРО, 2006. С. 278–281.

78. Карапетян Г.Э., Винник Ю.С., Якимов С.В. и др. Мембранный диализ гнойных ран с использованием аскорбата хитозана // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. М.: Изд-во ВНИИРО. 2006. С. 206–209.

79. Morimoto M., Saimoto H., Shigemasa Y. Control of Functions of Chitin and Chitosan by Chemical Modification // Trends in Glycoscience and Glycotechnology. 2002. V. 14. P. 205–222.

80. Ben-Shalom N., Ardi R., Pinto R., Aki C., Falik E. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan // Crop Protection. 2003. V. 22. P. 285–290.

81. Zivanovic S., Li J., Davidson P. M., Kit K. Physical, Mechanical, and Antibacterial Properties of Chitosan/PEO Blend Films // Biomacromolecules. 2007. V. 8(5). P. 1505–1510.

82. Keusch G.T., Jacewicz M. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea VII. Evidence for a Cell Membrane Toxin Receptor Involving  $\beta$ -1 – 4-Linked N-Acetyl-D-Glucosamine Oligomers // J. Exp. Med. 1977. V. 146. P. 535–546.

83. Sakkinen M. Biopharmaceutical Evaluation of Microcrystalline Chitosan as Release-Rate-Controlling

Hydrophilic Polymer in Granules for Gastro-Retentive Drug Delivery // The Academic Dissertation. Helsinki 2003. 63 с.

84. Взнуздаева О.А., Зверева Г.А., Молодцов Н.В. Влияние хитозана на IgM и IgG-антителообразование клеток мышей // Иммунология. 1984. № 1. С. 22–25.

85. Wu G.-J., Tsai G.-J. Cellulase degradation of shrimp chitosan for the preparation of a water-soluble hydrolysate with immunoactivity // Fisheries Sci. 2004. V. 70. P. 1113–1120.

86. Кузнецов Д.П., Шинкарев С.М. Албулов А.И. и др. Исследование адъювантных свойств сукцината хитозана // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. М.: Изд-во ВНИИРО, 2006. С. 217–219.

87. Diegelmann R.F., Dunn J.D., Lindblad W.J., Cohen K. Analysis of the effects of chitosan on inflammation, angiogenesis, fibroplasias, and collagen deposition in polyvinyl alcohol sponge implants in rat wounds // Wound Repair Regen. 1996. V. 4. P. 48–52.

88. McNeela E.A., O'Connor D., Jabbal-Gill I. et al. A mucosal vaccine against diphtheria: formulation of cross reacting material (CRM (197)) of diphtheria toxin with chitosan enhances local and systemic antibody and Th2 responses following nasal delivery // Vaccine. 2000. V. 19. P. 1188–1198.

89. Shibata Y., Honda I., Justice J.P., Van Scott M.R., Nakamura R.M., Myrvik Q.N. Th1 adjuvant N-acetyl-D-glucosamine polymer up-regulates Th1 immunity but down-regulates Th2 immunity against a mycobacterial protein (MPB-59) in interleukin-10-knockout and wild-type mice // Infection and Immunity. 2001. V. 69. P. 6123–6130.

90. Snaar-Jagalska B.E., Krens S.F.G., Robina I., Wang L.-X., Spaank H.P. Specific activation of ERK pathways by chitin oligosaccharides in embryonic zebrafish cell lines // Glycobiology. 2003. V. 13. P. 725–732.

91. Zang J., Tachado S.D., Pattel N. et al. Negative regulatory of mannose receptors on human alveolar macrophage prion inflammatory cytokine release in vitro // J. Leukocyte Biology. 2005. V. 78. P. 665–674.

92. Ермак И.М., Горбач В.И., Давыдова В.Н. и др. Комплексы хитозана с бактериальными эндотоксинами и их биологическая активность // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. М.: Изд-во ВНИИРО. 2006. С.193–197.

93. Rao M.S., Chander R., Sharma A. Development of Shelf-stable intermediate-moisture meat

products using active edible chitosan coating and irradiation // J. Food Sci. 2005. P. 325–331.

94. Дрозд Н.Н., Макаров В.А. Антикоагулянтная активность сульфатированных производных хитозана // Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука, 2002. С. 302–314.

95. Jeon Y.J., Kim, S.K. Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in ultrafiltration membrane reactor system // J. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 12. P. 503–507.

96. van Eijk M., van Roomen C.P., Renkema G.H., Bussink A.P., Andrews L., Blommaert E.F., Sugar A., Verhoeven A.J., Boot R.G. Aerts J.M. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity // Inter. Immunol. 2005. V. 17. P. 1505–1512.

97. Chandu T., Rao G.H.R., Wilson R.F., Das G.S. Delivery of LMW heparin via surface coated chitosan/peg-alginate microspheres prevents thrombosis Drug Deliv. 2002. V. 9. P. 87–96.

98. Mi F.L., Lin Y.M., Wu Y.B., Shyu S.S., Tsai Y.H. Chitin/PLGA blend micro spheres as a biodegradable drug-delivery system: phase-separation, degradation and release behavior // Biomaterials. 2002. V. 23. P. 3257–3267.

99. Балабушевич Н.Г., Варламов В.П., Ларионова Н.И. Белки в хитозан-содержащих микрочастицах. Получение и свойства // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. М.: Изд-во ВНИИРО, 2006. С. 17–20.

100. Onal S., Zihnioglu F. Encapsulation of insulin in chitosan-coated alginate beads: Oral therapeutic peptide delivery // Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 2002. V. 30. P. 229–237.

101. Fukusaki E., Kato T., Maeda H. et al. DNA Aptamers that bind to chitin // Bioorg. Med. Chem. Letters. 2000. V. 10(3). P. 423–425.

102. Трескунов К.А. Клиническая фитология и фитохитодезтерапия аутоиммунных заболеваний. Отдаленные результаты. // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. М.: Изд-во ВНИИРО, 2006. С. 68–70.

103. Tarsi R., Muzzarelli R.A.A., Guzmanl C.A., Pruzzol C. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans // J Dent Res 1997. V. 76. P. 665–672.

104. Иголкина Л.А., Руденская Ю.А., Руденская Г.Н. Аффинные сорбенты на основе хитозана



- для выделения протеолитических ферментов // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2000. Т. 41, № 6. С. 398–401.
105. Канарская З.А., Гамаюрова В.С., Канарский А.В., Гуславский А.И. Применение хитин-глюканового адсорбента в технологии получения картона для осветляющей и стерилизующей фильтрации биопрепаратов // Новые достижения в исследовании хитина и хитозана. М.: Изд-во ВНИИРО, 2001. С. 25–26.
106. Курек Д.В., Лопатин С.А., Варламов В.П. Перспективы использования хитинсвязывающих доменов для выделения и очистки рекомбинантных белков методом аффинной хроматографии // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. С. 5–13.
107. Лопатин С.А. Хитозан в хроматографии // Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука, 2002. С. 247–252.
108. Велешко И.Е., Косяков В.Н., Велешко А.Н. Синтез и свойства новых модификаций микотона для сорбции радиостронция из растворов // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. М.: Изд-во ВНИИРО, 2006. С. 92–95.
109. Костеша Н.Я., Гулик Е.С., Албулов А.И. и др. Противолучевая активность препаратов хитозана с растительными экстрактами // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. М.: Изд-во ВНИИРО, 2006. С. 210–212.
110. Сафронова Т.М. Применение хитозана в производстве пищевых продуктов // Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука, 2002. С. 346–359.
111. Быканова О.Н., Максимова С.Н., Тарасенко Г.А. Перспективы использования хитозана в качестве БАД к пище // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. М.: Изд-во ВНИИРО, 2006. С. 275–276.
112. El-Ghaouth E.A., Arul J., Wilson C., Benhamou N. Biochemical and cytochemical aspects of the interaction of chitosan and *Botrytis cinerea* of bell pepper fruit // Postharvest Biol. Technol. 1997. V. 12. P. 183–194.
113. Du J., Gemma H., Iwahori S. Effect of chitosan coating on the storage of peach, Japanese pear, and kiwifruit // J. Jpn. Soc. Hortic Sci. 1997. V. 66. P. 15–22.
114. Sebti I., Martial-Gros A., Carnet-Pantiez A., Grelier S., Coma V. Chitosan Polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination // J. of food science. 2005. V. 70. P. 100–104.
115. Carolin A., Hadwiger L.A. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall compositions // Exp. Mycol. 1979. V. 3. P. 285–287.
116. Pikta D., Pastucha A., Struszczyk H., Niekraszewicz A.: The use of chitosan in controlling bean (*Phaseolus coccineus* L.) diseases. Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives, ed. Polish Chitin Soc. IX. 2003. P. 119–127.
117. Kendra D.F., Hadwiger L.A. Calcium and calmodulin may not regulate the disease resistance and pisatin formation response of *Pisum sativum* to chitosan of *Fusarium solani* // Mol. Phis. Plant Pathol. 1987. V. 31. P. 337–349.
118. Зиновьева С.В., Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. Биохимические аспекты взаимодействия растений с паразитическими нематодами // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. С. 133–142.
119. Yuen G.Y., Steadman J.R., Lindgren D.T., Schaff D., Jochum C. Bean rust biological control using bacterial agents // Crop Protection. 2001. V. 20. P. 395–402.
120. Tsukada, K., Ishizakac M., Fujisawad Y. et al. Rice receptor for chitin oligosaccharide elicitor does not couple to heterotrimeric G-protein: Elicitor responses of suspension cultured rice cells from Daikoku dwarf (d1) mutants lacking a functional G-protein a subunit// Physiol. Plant. 2002. V. 116. P. 373–382.
121. Ning W., Chen F., Mao B., Li Q., Liu Z., Guo Z., He Z. N-acetylchitoooligosaccharides elicit rice defense responses including hypersensitive response-like cell death, oxidative burst and defense gene expression // Physiol. Mol. Plant Pathol. 2004. V. 64. P. 263–271.
122. Kaku H., Shibuya N., Xu P. et al. N-acetylchitoooligosaccharides elicit expression of a single (1-3)  $\beta$ -glucanase gene in suspension-cultured cells from barley (*Hordeum vulgare*) // Physiol. Plant. 1998. V. 100. P. 111–118.
123. Ramonell K.M., Zhang B., Ewing R.M. et al. Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Plant Pathol. 2002. V. 3. P. 301–311.
124. Vander P., Varum K.M., Domard A. et al. Comparison of the ability of partially N-acetylated

- chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance in wheat leaves // *Plant Physiol.* 1998. V. 118. P. 1353–1359.
125. Kawano T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction // *Plant Cell Rep.* 2003. V. 21. P. 829–837.
126. Yamada A., Shibuya N., Kodama O., Akatsuka T. Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice by N-acetylchitosaccharides // *Biosci. Biotech. Biochem.* 1993. V. 57. P. 405–409.
127. Переход Е.А., Чаленко Г.И., Герасимов Н.Г. и др. Хитозан – регулятор фитофтороустойчивости картофеля // *Доклады АН.* 1997. Т. 355. С. 120–122.
128. Cabrera J.C., Messiaen J., Cambrier P., Van Cutsen P. Size, acetylation and concentration of chitoooligosaccharide elicitor determine the switch from defense involving PAL activation to cell death and water peroxide production in *Arabidopsis* cell suspension // *Physiol. Plantarum.* 2006. V. 127. P. 44–56.
129. Shibuya N., Minami E. Oligosaccharide signaling for defense responses in plant // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2001. V. 59. P. 223–233.
130. Rakwal R., Tamogami S., Agrawal G.K., Iwahashi H. Octadecanoid signaling component burst in rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2002. V. 295. P. 1041–1045.
131. Cheong Y.H., Kim C.Y., Chun H.J. et al. Molecular cloning of a soybean class III  $\beta$ -1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection // *Plant Sci.* 2000. V. 154. P. 71–81.
132. Veronese P., Ruiz M.T., Coca M.A. et al. In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy // *Plant Physiol.* 2003. V. 131. P. 1580–1590.
133. Day R. B., Okada M, Ito Y., Tsukada K., Zaghouani H, Shibuya N, Stacey C. Binding site for chitin oligosaccharides in the soybean plasma membrane // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. P. 1162–1173.
134. Yamaguchi T., Ito Y., Shibuya N. Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant defence responses // *Tr. Glycisci. Glykotech.* 2000. V. 12. P. 113–120.
135. Silipo A., Erbs G., Shinya T., Dow J.M., Parrilli M., Lanzetta R., Shibuya N., Newman M-A. and Molinaro A. Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity // *Glycobiology.* 2010. V. 120. P. 406–419.
136. Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. // *Proc Natl Acad Sci USA* 2007. V. 104. P. 19613–19618.
137. Wan J, Zhang X.C., Neece D., Ramonell K.M., Clough S., Kim S.Y., Stacey M.G., Stacey G. A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2008. V. 20. P. 471–481.
138. Liu T., Liu Z., Song C., Hu Y., Han Z., She J., Fan F., Wang J., Jin C., Chang J., Zhou J.-M., Chai J. Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor // *Science.* 2012. V. 336. P. 1160–1163.
139. Gough C., Cullimore J. Lipo-chitoooligosaccharide Signaling in Endosymbiotic Plant-Microbe Interactions // *MPMI* 2011. V. 24. P. 867–878.
140. Ovtsyna A.O., Geurts R., Bisseling T., Lugtenberg B.J.J., Tikhonovich I.A., Spaik H.P. Restriction of host range by the sym2 allele of Afghan pea is non-specific for the type of modification at the reducing terminus of nodulation signals // *Mol Plant Microbe Interact.* 1998. V. 11. P. 418–422.
141. Schlosser A., Thomsen T., Moeller J.B., Nielsen O., Tornøe I., Mollenhauer J., Moestrup S.K., Holmskov U. Characterization of FIBCD1 as an Acetyl Group-Binding Receptor That Binds Chitin // *The J. of Immunology.* 2009. P. 3800–3809.
142. El Gueddari N.E., Rauchhaus U., Moerschbacher B.M., Deising H.B. Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi // *New Phytologist.* 2002. V. 156. P. 103–112.
143. Marshall R., Kombrink A., Motteram J., Loza-Reyes E., Lucas J., Hammond-Kosack K.E, Thomma B.P.H.J., Rudd J.J. Analysis of Two in Planta Expressed LysM Effector Homologs from the Fungus Reveals Novel Functional Properties and Varying Contributions to Virulence on Wheat // *Plant Physiology.* 2011. V. 156. P. 756–769.
144. Mentlak T.A., Kombrink A., Shinya T., Ryder L.S., Otomo I., Saitoh H., Terauchi R., Nishizawa Y., Shibuya N., Thomma B.P.H.J., and Talbot N.J. Effector-Mediated Suppression of Chitin-Triggered Immunity by *Magnaporthe oryzae* Is Necessary for Rice Blast Disease // *The Plant Cell,* 2012. V. 24. P. 322–335.

145. Pel M.J.C., Pieterse C.M.J. Microbial recognition and evasion of host immunity // *J. Exp. Bot.* 2012. doi: 10.1093/jxb/ers262.
146. Peltonen S., Mannonen L., Karjalainen R. Elicitor-induced changes phenylalanine ammonia-lyase activity in barley cell suspension cultures // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 1997. V. 50. P. 185–193.
147. Gormade V., Kulkarni S., Diphode N., Rajamohanam P.R., Deshpande M.V. Chitin deacetylase: A comprehensive account on its role in nature and its biotechnological applications // *Curr. Research. Technology and education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Ed. Mendez-Vilas. Formatex. 2010. P. 1054–1066.
148. Медведев С.С. Кальциевая сигнальная система // *Физиология растений*. 2005. Т. 52. С. 282–305.
149. Walker S.A., Viprey V., Downie J.A. Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers // *PNAS USA*. 2000. V. 97. P. 13413–13418.
150. Klusener B., Young J.J., Murata Y., et al. Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in arabidopsis guard cells // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. P. 2152–2163.
151. Saito M, Chikazawa T, Matsuoka H. et al. Elicitor action via cell membrane of a cultured rice cell demonstrated by the single-cell transient assay // *J. Biotech.* 2000. V. 76. P. 227–232.
152. Zuppini A. Baldan B., Millions R. et al. Chitosan induced Ca<sup>2+</sup>-mediated programmed cell death in soybean cells // *New Phytologist*. 2003. V. 161. P. 557–568.
153. Skalamera D., Heath M. Cellular mechanisms of callose deposition in response to fungal infection or chemical damage // *Can. J. Bot.* 1996. V. 74. P. 1236–1242.
154. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L. et al. Early signaling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured french bean cells involve cAMP and Ca<sup>2+</sup> // *New Phytologist*. 2001. V. 151. P. 185–194.
155. Zhang B., Ramonell K., Summerville S., Stacey G. Characterization of early, chitin-induced gene expression in Arabidopsis // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2002. V. 15. P. 963–970.
156. Brunner F., Stintzi A., Fritig B. Legrand M. Substrate specificities of tobacco chitinases // *Plant J.* 1998. V. 14 P. 225–234.
157. De Jonge R., van Esse H.P., Kombrink A., Tomonori S., Desaki Y., Bours R., van der Krol S., Shibuya N., Joosten M.H.A.J., Thomma B.P.H.J. Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants // *Science*. 2010. V. 329. P. 953–955
158. Максимов И.В., Валеев А.Ш., Сафин Р.Ф. Степень ацетилирования хитина в защитном ответе растений пшеницы // *Биохимия*. 2011. Т. 76, вып 12. С. 1665–1670.
159. Черкасова Е.И., Душкова З.Г., Фролов В.Г., Гидролитическое расщепление хитозана папаином: эффект молекулярной массы и степени ацетилирования // *Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана*. М.: Изд-во ВНИИРО, 2006. С. 318–320.
160. Blair D.E, Hekmat O., Schuttelkopf A.W., Shrestha B., Tokuyasu K., Withers S.G., Van Aalten D.M.F. Structure and mechanism of chitin deacetylase from the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* // *Biochemistry*. 2006. V. 45. P. 9416–9426.
161. Хайруллин Р.М., Юсупова З.Р., Максимов И.В. Защитные реакции пшеницы при инфицировании грибными патогенами. 1. Взаимодействие анионных пероксидаз пшеницы с хитином, хитозаном и телиоспорами *Tilletia caries* (DC.) Tul. // *Физиология растений*. 2000. Т. 47. С. 108–113.
162. Caufrier F., Martinou A., Dupont C., Bouriotis V. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity // *Carbohydrate Research*. 2003. V. 338. P. 687–692.
163. Christodoulidou A., Bouriotis V., Thireos G. Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae* // *J. of Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 31420–31425.
164. Martinou A., Koutsioulis D., Bouriotis V. Expression, purification and characterization of a cobalt-activated chitin deacetylase (Cda2p) from *Saccharomyces cerevisiae* // *Prot. Expression and Purification*. 2002. V. 24. P. 111–116.
165. Aye K.N., Karuppuswamy R., Ahamed T., Stevens W.F. Peripheral enzymatic deacetylation of chitin and reprecipitated chitin particles // *Bioresource Technology*. 2006. V. 97. P. 5677–582.
166. Shrestha B., Blondeau K., Stevens W.F., Hegarat F.L. Expression of chitin deacetylase from in *Phichia pastoris*: purification and characterization // *Protein expression and purification*. 2004. V. 38. P. 196–204.

167. Gao X.-D., Katsumoto T., Onodera K. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absida coerulea* // J. Biol. Chem. 1995. V. 117. P. 257–263.

168. Tokuyasu K, Mitsutomi M, Yamaguchi I, Hayashi K., Mori Y. Recognition of chitooligosaccharides and their N-acetyl groups by putative subsites of chitin deacetylase from deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 8837–8843.

169. Alfonso C., Nuero O.M., Santamaria F., Reyes F. Purification of a heat stable chitin deacetylase

from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation // Curr. Microbiol. 1995. V. 30. P. 49–54.

170. Desing H., Siegrist J. Chitin deacetylase activity of the rust *Uromyces viciae-fabae* is controlled by fungal morphogenesis // FEMS Microbiol. Lett. 1995. V. 127. P. 207–212.

171. Blair D.E, Schuttelkopf A.W., MacRae J.I., Van Aalten D.M.F. Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor // PNAS USA. 2005. V. 102. P. 15429–15434.



## **BIOLOGICAL ACTIVITY OF CHITIN AND SPHERE OF ITS APPLICATION**

© **I.V. Maksimov**

Chitin is one of the most common biopolymer after cellulose. Due to its high biological activity this biopolymer comes to use in different areas of human activity. This review analyzes the data on the natural sources of chitin, the field of its biological activity application, the impact on the morphological parameters of organisms, on triggering and development of the defense reactions. Special attention in this work is paid to the participation of chitin oligomers in signalling and systemic expression of genes encoding defense proteins. The paper also discusses the possibility of the development of next-generation chitin and chitozan based drugs immunomodulating and selectively affecting pathogens growth.

Key words: chitin, chitozan, prevalence, biological activity, sphere of application, immunity.