

УДК 677.47.3

АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНОВ: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ СТРУКТУРЫ И СПОСОБА ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ

© 2011 г. В. Н. Давыдова, В. П. Нагорская, В. И. Горбач, А. А. Калитник, А. В. Реунов, Т. Ф. Соловьёва, И. М. Ермак

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток, 690022

e-mail: piboc@eastnet.febras.ru

Поступила в редакцию 21.11.2009 г.

Проведен ферментативный (действие лизоцима) и химический (пероксид водорода) гидролиз хитозанов с различной степенью ацетилирования (СА): 25, 17, 1.5%. Очистку и фракционирование продуктов гидролизом проводили методами диализа, ультрафильтрации и гелепроницающей хроматографии. Получены низкомолекулярные (НМ) производные полисахарида с молекулярными массами от 17 до 2 кДа. Изучена их противовирусная активность в отношении вируса табачной мозаики (ВТМ) и показано, что данные образцы ингибируют образование локальных некрозов, индуцированных вирусом, на 50–90%. Антивирусная активность НМ-хитозанов существенно возрастает с уменьшением степени их полимеризации. При этом продукты ферментативного гидролиза обладают меньшей активностью, чем образцы хитозанов, полученные в результате химического гидролиза. Установлено, что проявление противовирусной активности слабо зависит от степени ацетилирования образцов.

Хитозан (деацетилированное производное хитина) — нетоксичный, биоразрушаемый, биосовместимый полисахарид — обладает разнообразной биологической активностью, включая антибактериальную, противовирусную, антиопухолевую, антихолестериновую и др., что обеспечивает возможность его широкого использования в медицине и фармации [1]. Значительный интерес вызывает иммуностимулирующая способность хитозана, позволяющая использовать это соединение в защите организмов от стрессовых воздействий и различных заболеваний [2].

В последние годы все большее внимание исследователей привлекает способность хитозана повышать устойчивость растений к вирусам [3–8]. Показано, что хитозан может уменьшать число и размеры вирусиндуцированных локальных некрозов на листьях сверхчувствительных растений-хозяев, а также ингибировать распространение вирусов в системно поражаемых растениях [4].

По имеющимся данным, уровень противовирусной устойчивости, индуцированной хитозаном, зависит от вида растения [4]. В то же время противовирусная активность хитозана определяется его структурой и, прежде всего, степенью полимеризации молекулы [9–11]. Так, сообщалось [9], что высокополимерные препараты полисахарида обладают более высокой противовирусной активностью. С другой стороны, было показано [10, 11], что ферментативная деградация высокополимерных хитозанов хитиназами гриба *Aspergillus fumigatus* значительно повышает их противовирусную активность, что выра-

жается в подавлении местных некрозов, образующихся при инокуляции листьев табака вирусом табачной мозаики (ВТМ).

Таким образом, данные о зависимости противовирусной активности хитозана от его структуры, в частности степени полимеризации, достаточно противоречивы, что может быть обусловлено разнообразием источников выделения хитозана [4]. Более того, образцы хитозана, выделенные из одних и тех же источников, имеют различные физико-химические характеристики (молекулярная масса, количество и характер распределения ацетатных групп в полимерной цепи), что может являться причиной расхождения данных по биологической активности этих полисахаридов [12, 13].

Известно, что практическое применение коммерческого хитозана ограничено высокой вязкостью его растворов и плохой растворимостью в воде. Он, как правило, растворим при низких значениях pH, но не растворим в нейтральных и основных растворах. Для получения водорастворимых образцов полисахарида проводят деполимеризацию хитозана химическим или ферментативным гидролизом. Способы деполимеризации исходных высокомолекулярных (ВМ) образцов хитозана и методы очистки также могут влиять на биологическую активность его НМ-производных [14].

Одним из наиболее простых и распространенных способов химической деполимеризации хитозана является гидролиз под действием пероксида водорода. Однако этот процесс зависит от условий протекания реакции и, наряду с получением оли-

госахаридов с низкой молекулярной массой, может приводить к образованию побочных продуктов реакции, способных вызывать изменение биологических свойств НМ-производных. Так, было показано, что противовирусная активность продуктов химического гидролиза хитозана увеличивается с ростом молекулярной массы [14], в то время как активность олигомеров хитозана, полученных ферментативным гидролизом, падает с увеличением их молекулярной массы [5]. Предполагается [14], что повышение антибактериальной активности НМ-образцов хитозана, в случае химического гидролиза, обуславливается не столько изменением степени полимеризации полисахарида, сколько появлением окисленных групп на олигомерных молекулах. В отличие от химического гидролиза, деполимеризация под действием ферментов исключает возможность появления окисленных групп в олигосахаридах. Вместе с тем образцы НМ-хитозанов, полученные с помощью химического и ферментативного гидролиза из одного и того же источника, могут различаться по распределению ацетатных остатков [15], что также будет влиять на проявление их биологической активности.

Цель работы – получение НМ-образцов хитозана разной степени ацетилирования с помощью ферментативного и химического гидролиза и изучение взаимосвязи их физико-химических характеристик (молекулярная масса, количество N-ацетатных групп) с антивирусной активностью.

МЕТОДИКА

Материалы. Использовали коммерческий хитозан (ООО “Биополимеры” г. Партизанск, Россия); хитозан, выделенный в ТИБОХ ДВО РАН из панциря камчатского краба; лизоцим из куриного яйца, активность 20×10^3 ед., pH_{opt} 6.24, (“Applichem GmbH”, Германия); сефадекс G-50 (“Pharmacia”, Швеция); мембраны для ультрафильтрации (“Millipore”, США); диализные мешки (“Orange Scientific”, Бельгия). Все остальные реактивы имели классификацию х.ч. (“Реахим”, Россия) и использовались без дополнительной очистки.

Аналитические методы. Спектры 1H -ЯМР полисахаридов получены на приборе DPX-300 (75.46 МГц) (“Bruker”, Германия) в растворе D_2O при $60^\circ C$. В качестве внутреннего стандарта использовали уксусную кислоту ($\delta = 23.52$ относительно тетраметилсилана). Степень N-ацетилирования (СА) НМ-образцов хитозанов определяли согласно методике, приведенной в работе [16]. ИК-спектры исследуемых образцов регистрировали на спектрофотометре Vector 22 (“Bruker”, Германия) с разрешением 4 см^{-1} . СА высокомолекулярных хитозанов определяли по методу Доузи [17].

Содержание белка в хитозанах определяли по методу Лоури [18]. Молекулярные массы (ММ)

образцов рассчитывали по методу, основанному на реакции восстанавливающих сахаров с ферроцианидом [19], или вискозиметрическим методом [20] используя уравнение Марка–Хаувинка–Куна:

$$|\eta| = K_M M^\alpha,$$

где $|\eta|$ – характеристическая вязкость, М – молекулярная масса, K_M и α – эмпирические константы, значения которых взяты из работы [21]. Вязкость растворов определяли в модифицированном вискозиметре Убеллоде (СКБ “Пушино”) с диаметром капилляра 0.3 мм в 0.1 М CH_3COOH –0.2 М $NaCl$.

Деацетилирование хитозана. Хитозан со СА 17% и ММ 300 кДа, определенной вискозиметрическим методом, деацетилировали по методике [22].

Химический гидролиз. Гидролиз пероксидом водорода проводили при 25 и $37^\circ C$, как описано ранее [23].

Ферментативный гидролиз. Растворяли 2 г ВМ-хитозана в 200 мл 1 М CH_3COOH , разбавляли до 400 мл 0.4 М $NaCl$ и доводили рН среды до 6.0 с помощью $NaOH$, добавляли раствор лизоцима (1 мг/мл) в 0.1 М KCl из расчета 10 мг фермента на 1 г хитозана. Реакционную смесь выдерживали при $37^\circ C$. Каждые 20 мин из раствора отбирали аликвоты и определяли вязкость при $25^\circ C$. В момент соответствия вязкости гидролизуемого раствора вязкости образца, полученного химическим гидролизом при $25^\circ C$, реакционную смесь охлаждали до $25^\circ C$, доводили до рН 10.0 добавлением 6 М $NaOH$ и делили на 2 части. Одну часть кипятили 30 мин для инактивации фермента нагреванием, затем осаждали полисахарид этанолом. Во второй части фермент инактивировали обработкой этанолом. Осадки отделяли центрифугированием при 2500 г, растворяли в воде при добавлении 1 М CH_3COOH и диализовали против воды в течение 48 ч.

НМ хитозан последовательно фракционировали с помощью диализных мешков MWCO 12000–14000 и 3500 и ультрафильтрационной мембраны (Pellicon, 1000, Millipore). К фракции хитозана с ММ выше 14 кДа добавляли 1 мл раствора лизоцима (1 мг/мл), смесь выдерживали 24 ч при $37^\circ C$, после чего проводили инактивацию фермента двумя способами, описанными выше, ультрафильтрацию и диализ продуктов гидролиза.

Гельпроникающая хроматография. Для очистки хитозанов и их фракционирования по молекулярным массам использовали метод гельпроникающей хроматографии на колонке с сефадексом G-50. Полисахарид (20 мг) растворяли в 0.1 М CH_3COOH –0.2 М $NaCl$ буфере, наносили на колонку (24×1.5 см), элюировали тем же буфером и собирали фракции объемом 2.5 мл. Калибровку колонки проводили декстранами с ММ 10 и 20 кДа и ламинараном с ММ 6 кДа. Содержание полисахаридов в собранных фракциях определяли по реакции аминокруппы хитозана с тринитробензолсульфокислотой [24].

Образцы хитозана лиофилизировали. Относительное содержание ацетатных групп в образцах определяли с помощью ЯМР-спектроскопии.

Антивирусная активность. Антивирусную активность препаратов хитозана оценивали по отношению к штамму ВТМ, выделенному из зараженных растений *Nicotiana tabacum* L. сорта Самсун по методике Отсуки и др. [25]. Исследования проводили на локально поражаемых ВТМ листьях 4-недельных растений *N. tabacum* L. сорта Ксанти-нк, выращенных в теплице. Листья среднего яруса отделяли от растений, разрезали вдоль средней жилки и напыляли карборундом. Затем опытные половинки листьев инокулировали смесью вируса и хитозана, а контрольные – только вирусом. Инокулированные листья промывали водой и переносили во влажные камеры. Через 4 сут после заражения листьев подсчитывали число образующихся на них локальных некрозов, определяющих инфекционность вируса [26]. В каждом из 3 проведенных опытов использовали половинки 10 листьев. Антивирусную активность препаратов определяли по их ингибиторному действию на образование вирусиндуцированных локальных некрозов на листьях и выражали в процентах относительно контроля как $(100 - N_0 100 / N_k)$, где N_0 и N_k – числа локальных некрозов, образующихся соответственно на опытных и контрольных половинках листьев. Относительную ошибку средних (30 повторностей) значений вычисляли с использованием критерия Стьюдента при доверительной вероятности, равной 0.95 [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

НМ-производные хитозана. Данные литературы показывают, что основными факторами, влияющими на антивирусную активность производных хитозана, являются: молекулярная масса НМ-образцов [5], источники выделения исходного хитозана [4], способ деполимеризации – ферментативный или химический гидролиз [14], химическая структура полисахаридов, в частности степень их N-ацетилирования [28].

В настоящей работе был проведен анализ влияния этих факторов на антивирусную активность хитозанов.

Для получения различных НМ-производных хитозана были использованы 2 исходных образца полисахарида с высокой степенью полимеризации. Один из них с ММ 300 кДа и СА 17% (ТИБОХ ДВО РАН, **Х-ВМ-300**), другой – коммерческий образец с ММ 500 кДа и СА 25% (**Х-ВМ-500**), изготовлен ООО “Биополимеры”. Из образца Х-ВМ-300 методом деацетилирования получен продукт с ММ 130 кДа и СА 1.5% (**Х-ВМ-130**).

Очистку и фракционирование НМ-продуктов проводили методами диализа и ультрафильтрации. Затем образцы очищали от низкомолекулярных при-

Таблица 1. Характеристика производных хитозанов, полученных в результате гидролиза пероксидом водорода

Хитозан	Условия гидролиза		Выход, %	Молекулярная масса, кДа
	°С	ч		
Х-ВМ-500, СА 25%	37	48	5.7	6.0
	37	24	13.8	6.0
	25	48	39.6	10.5
	25	24	30.4	17.0
Х-ВМ-300, СА 17%	37	48	18.1	17.0
Х-ВМ-130, СА 1.5%	37	48	25.5	15.0
	37	72	15.2	5.0

месей методом гелипроникающей хроматографии на колонке с сефадексом G-50. Фракции образцов, характеризующиеся узким молекулярно-массовым распределением, были выделены, лиофилизованы и использованы для анализа их антивирусной активности.

Образцы Х-ВМ-130, Х-ВМ-300 и Х-ВМ-500 были подвергнуты химическому гидролизу с использованием пероксида водорода при 37°С, и получены НМ-производные хитозана с ММ в пределах 5–17 кДа (табл. 1). Образец Х-ВМ-500 был более эффективно подвержен действию пероксида водорода, чем Х-ВМ-300. При 37°С наблюдалась значительная фрагментация ВМ-полисахарида с образованием производных хитозанов с ММ, не превышающими 6 кДа, выход которых был низким (не более 13%). В связи с этим деполимеризацию Х-ВМ-500 проводили при 25°С, в этом случае выход НМ-производных хитозана возрастал до 40%, а их ММ составили – 10.5 и 17 кДа (табл. 1).

Таким образом, Х-ВМ-300 и Х-ВМ-130 более устойчивы к гидролизу под действием пероксида водорода при 37°С. Можно предположить, что это обусловлено более высокой степенью ацетилирования Х-ВМ-500 по сравнению с двумя другими хитозанами. Так, было показано, что скорость деградации хитозана под действием ультразвука [29] или ферментов крови человека увеличивалась пропорционально степени N-ацетилирования образца [30].

Параллельно химической модификации, образец Х-ВМ-500 подвергали ферментативному гидролизу. В качестве фермента для деполимеризации был выбран лизоцим. Выбор лизоцима был не случаен, поскольку в последнее время хитозан широко используется в качестве биологически активной добавки (**БАД**), а лизоцим, присутствующий в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта млекопитающих, является наиболее эффективным

Таблица 2. Характеристика производных хитозана, полученных в результате ферментативного гидролиза лизоцимом образца X-ВМ-500

Способ инактивации фермента	Молекулярная масса, кДа	Содержание белка, %
Кипячение, 100°C	160.0	1.31 ± 0.22
	—	—
Обработка этанолом	2.2	1.36 ± 0.3
	160.0	0.73 ± 0.3
	12.0	0.86 ± 0.2
	4.4	0.85 ± 0.3

Таблица 3. Антивирусная активность хитозанов, полученных путем ферментативного и химического гидролиза

Гидролизующий агент	Молекулярная масса, кДа	Антивирусная активность, %
Хитозан, СА 1.5%		
Пероксид водорода	130	32 ± 3.8
	15.0	75 ± 8.1
	5.0	87 ± 9.0
Хитозан, СА 25%		
Пероксид водорода	17.0	84 ± 8.7
	6.0	75 ± 7.9
Лизоцим	160	17 ± 2.0
	12.0	58 ± 6.1
	4.0	60 ± 6.5

Таблица 4. Антивирусная активность хитозанов с разной СА

СА, %	Молекулярная масса, кДа	Антивирусная активность, %
1.5	15.0	75 ± 8.1
17	17.0	73 ± 7.8
25	17.0	84 ± 8.9
1.5	130	32 ± 3.5
9*	130	22 ± 2.3
15*	130	34 ± 3.8

* Образцы получены методом частичного N-ацетилирования.

ферментом для расщепления частично дезацетилированного хитозана [31].

Деполимеризацию проводили при 37°C, pH 6.0. Для инактивации фермента использовали кипячение и обработку этанолом. Общепринятым мето-

дом инактивации лизоцима является кипячение реакционной смеси в течение 30 мин. В нашем случае при температурной инактивации фермента после осаждения полисахарида этанолом, его диализа и гель-фильтрации получали два образца НМ-производных хитозана с ММ 2.2 и 160 кДа. В то же время, осаждение продуктов деполимеризации хитозана этанолом, без предварительного кипячения, приводило к образованию 3 НМ-фракций (табл. 2). Можно предположить, что в результате термической обработки происходит дополнительная деполимеризация.

Результаты свидетельствуют о том, что одним из продуктов ферментативного гидролиза является фракция хитозана с ММ 160 кДа (табл. 2), которая не подвергается дальнейшей деградации под действием фермента. Как было предположено ранее [32], для начала гидролиза необходимо образование комплекса лизоцима с полисахаридом, которое происходит в результате взаимодействия гексасахаридного фрагмента молекулы хитозана, имеющего специфическую конформацию углеводных колец, с активным центром фермента. В нашем случае этот процесс может быть затруднен вследствие способности молекул ВМ-хитозана образовывать в растворе ассоциаты за счет межмолекулярных взаимодействий и водородных связей [23, 33].

Для оценки влияния СА на биологические свойства НМ-хитозанов из исходного образца с ММ 130 кДа и СА 1.5% методом частичного N-ацетилирования были получены образцы хитозана, содержащие различное количество N-ацетатных групп — 9 и 15%.

Антивирусная активность. Проведен сравнительный анализ антивирусной активности НМ-производных хитозана в отношении ВТМ, которая проявлялась в уменьшении количества вирусиндуцированных локальных некрозов, образующихся на листьях табака Ксанти-нк при инокуляции их смесью ВТМ и хитозана, в сравнении с листьями, инокулированными только вирусом.

Исследуемые образцы НМ хитозанов были разделены на 3 группы.

Первая группа включала хитозаны, полученные деполимеризацией X-ВМ-130 под действием пероксида водорода, с разной молекулярной массой и СА 1.5%. (табл. 3). Вторая группа — продукты ферментативного и химического гидролиза X-ВМ-500, СА 25% (табл. 3). Третья группа — НМ-производные ВМ хитозанов (пероксид водорода) с различной СА: 25% (из X-ВМ-500), 17% (из X-ВМ-300) и 1.5% (из X-ВМ 130 кДа) и ММ от 15 до 17 кДа, а также образцы хитозанов, полученные путем ацетилирования хитозана с ММ 130 кДа (табл. 4).

Анализ данных, представленных в табл. 3–4, свидетельствует о том, что наиболее высокой антивирусной активностью обладали образцы хитозана с относительно низкой молекулярной массой. Для НМ-производных, образующихся в результате гидролиза

пероксидом водорода X-ВМ-130, при уменьшении молекулярной массы исходного ВМ-полисахарида в 8.7 раз его антивирусная активность возрастала более чем в 2 раза. Однако дальнейшее уменьшение ММ олигомера до 5 кДа не вызывало существенного изменения его антивирусной активности (табл. 3). Антивирусная активность НМ-производных с ММ 17 и 6 кДа, полученных из X-ВМ-500 под действием пероксида водорода, также существенно не различалась (табл. 3). Аналогичная зависимость прослеживается и для продуктов ферментативного гидролиза X-ВМ-500. При уменьшении ММ от 160 до 12 кДа наблюдалось увеличение активности в 3.4 раза, в то время как активность олигомеров с ММ 12, 4 и 2.2 кДа существенно не отличалась (табл. 3). Как видно из табл. 3, способ инактивации фермента не оказывает существенного влияния на антивирусную активность НМ-хитозанов. Вместе с тем активность НМ продуктов ферментативного гидролиза несколько ниже активности образцов, полученных при обработке пероксидом водорода (табл. 3).

Для образцов с ММ 130 кДа, полученных путем введения ацетатных групп с помощью реакции ацетилирования, отмечается возрастание антивирусной активности при росте СА от 9 до 15% (табл. 4).

Данные о зависимости противовирусной активности хитозана от его молекулярной массы достаточно противоречивы [5, 14]. Так, Чирков с соавт. [9] показали, что противовирусная активность хитозана в отношении вируса мозаики люцерны возрастала с увеличением его молекулярной массы. Аналогичная зависимость была обнаружена при изучении влияния хитозана на системную инфекцию, обусловленную X-вирусом картофеля [34]. Вместе с тем для хитозана, полученного методом ферментативного гидролиза с использованием хитиназ, на модели ВТМ было отмечено повышение противовирусной активности полисахарида с уменьшением его молекулярной массы [10]. Куликов с соавт. [5] высказали предположение, что это противоречие обусловлено разными источниками выделения хитозана, а также исходной гетерогенностью НМ-производных этого полисахарида. Используя образцы хитозанов с достаточно узким молекулярно-массовым распределением, авторы показали, что противовирусная активность хитозана в отношении вируса мягкой мозаики фасоли возрастала с уменьшением молекулярной массы хитозана [5].

Эти данные согласуются с нашими результатами, показывающими, что антивирусная активность хитозанов возрастает с уменьшением их молекулярной массы. Наиболее значительное увеличение антивирусной активности наблюдается при уменьшении ММ хитозанов от 500–130 до 15–17 кДа, тогда как при дальнейшем снижении молекулярной массы олигосахаридов значительной разницы в их активности не наблюдается (табл. 3). Эта зависимость наблюдается как в случае ферментативного, так и хи-

мического гидролиза (табл. 3). В то же время в результате химического гидролиза образовывались производные хитозана с большей активностью (табл. 3). Причиной более высокой активности может быть образование в процессе гидролиза пероксидом водорода побочных продуктов, что, как отмечалось ранее, может влиять на антивирусную активность хитозана [35]. Однако в ЯМР- и ИК-спектрах наших образцов отсутствовали сигналы, свидетельствующие о наличии каких-либо посторонних продуктов деградации. Это согласуется с работой Лина и соавт. [36], которые, проведя тщательный анализ продуктов химического гидролиза хитозана, показали, что они имеют структуру, полностью соответствующую структуре исходного полимера.

Причиной более низкой активности НМ-продуктов ферментативного гидролиза (табл. 3) может быть также разное распределение ацетатных остатков в молекулах производных хитозана. Так, известно, что олигомеры – НМ-продукты химического и ферментативного гидролиза одного и того же хитозана могут отличаться по распределению остатков уксусной кислоты [15]. Однако согласно данным, приведенным в табл. 4, антивирусная активность хитозанов с разной СА, выделенных как из природных источников, так и химически модифицированных, существенно не отличается. В то же время полностью исключить влияние этого параметра мы не можем, так как не имеем исчерпывающих данных о надмолекулярной структуре и характере распределения ацетильных групп в препаратах, полученных в результате ферментативного и химического гидролиза.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что антивирусная активность НМ-производных хитозанов повышается с уменьшением их молекулярной массы, что справедливо для образцов, полученных как химическим, так и ферментативным гидролизом. Антивирусная активность НМ-производных хитозанов природного происхождения и химически модифицированных мало зависит от СА.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и ДВО–УрО РАН № 09-П-УО-05-001.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002. 368 с.
2. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Зиновьева С.В. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002. С. 339–345.
3. *Pospieszny H., Atabekov J.G.* // Plant Sci. 1989. V. 62. № 1. P. 29–31.
4. *Чирков С.Н.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 1. С. 5–13.

5. Куликов С.Н., Чирков С.Н., Ильина А.В., Лопатин С.А., Варламов В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 224–228.
6. Pospieszny H., Chirkov S., Atabekov J.G. // Plant Sci. 1991. V. 79. № 1. P. 63–68.
7. Iriti M., Sironi M., Gomarasca S., Casazza A.P., Soave C., Faoro F. // Plant Physiol. Biochem. 2006. V. 44. № 11–12. P. 893–900.
8. Zhao X.M., She X.P., Du Y.G., Liang X.M. // Pestic. Biochem. Physiol. 2007. V. 87. № 1. P. 78–84.
9. Чирков С.Н., Сургучева Н.А., Гамзадае А.И., Абдулабеков И.М., Поспешны Г. // Докл. РАН. 1998. Т. 360. № 2. С. 271–273.
10. Pospieszny H., Struszczyk H., Cajza M. // Chitin enzymology / Ed. R.A.A. Muzzarelli. Ancona: Atec. Grottamare, 1996. V. 2. P. 385–389.
11. Struszczyk M.H., Pospieszny H., Schanzenbach D., Peter M.G. // Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives / Ed. H. Struszczyk. Lodz: Polish Chitin Soc. 1998. V. 5. P. 71–77.
12. Otterlei M., Vårum K.M., Ryan L., Espevik T. // Vaccine. 1994. V. 12. № 9. P. 825–832.
13. Prasitsilp M., Jenwithisuk R., Kongsuwan K., Damrongchai N., Watts P. // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2000. V. 11. № 12. P. 773–778.
14. Rhoades J., Roller S. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 1. P. 80–86.
15. Cabrera J.C., Van Custem P. // Biochem. Enj. J. 2005. V. 25. № 2. P. 165–172.
16. Hasegawa M.I., Isogai A., Onabe F. // Carbohydr. Res. 1994. V. 262. № 1. P. 161–166.
17. Dowzy J., Roberts G.I. // Macromol. Chem. 1985. V. 186. № 8. P. 1671–1677.
18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
19. Душе З. // Методы химии углеводов / Ред. Н.К. Кочетков. М.: Мир, 1967. С. 53, 54.
20. Жэнь-Юань Ц. Определение молекулярных весов биополимеров / Ред. С.Р. Рафиков. М.: Изд-во ИЛ, 1962. 234 с.
21. Maghami G.G., Roberts G.A.F. // Macromol. Chem. 1988. V. 189. № 1. P. 195–200.
22. Набережных Г.А., Горбач В.И., Лихацкая Г.Н., Давыдова В.Н., Соловьева Т.Ф. // Биохимия. 2006. Т. 73. № 3. С. 530–541.
23. Давыдова В.Н., Ермак И.М., Горбач В.И., Дроздов А.Л., Соловьева Т.Ф. // Биофизика. 2000. Т. 45. № 4. С. 641–647.
24. Imman J., Dintzins H. // Biochemistry. 1969. V. 8. № 8. P. 4074–4082.
25. Otsuki Y., Takebe I., Onho T., Fukuda M., Okada Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 5. P. 1913–1917.
26. Мэтьюз Р. Вирусы растений. М.: Мир, 1973. 600 с.
27. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1973. 352 с.
28. Day R.B., Okada M., Ito Y., Tsukada K., Zaghoulani H., Shibuya N., Stacey G. // Plant Physiol. 2001. V. 126. № 3. P. 1162–1173.
29. Trzcinski S., Staszewska D.U. // Carbohydr. Polym. 2004. V. 56. № 4. P. 489–498.
30. Vårum K.M., Myhr M.M., Hjerde R.J., Smidsrød O. // Carbohydr. Res. 1997. V. 299. № 1–2. P. 99–101.
31. Nordtveit R.J., Vårum K.M., Smidsrød O. // Carbohydr. Polym. 1996. V. 29. № 2. P. 163–167.
32. Рус Э., Стернберг М. Введение в молекулярную биологию. М.: Мир, 2002. С. 48–50.
33. Philippova O.E., Volkov E.V., Sitnikova N.L., Khokhlov A.R. // Biomacromolecules. 2001. V. 2. № 2. P. 483–490.
34. Чирков С.Н., Ильина А.В., Сургучева Н.А., Летунова Е.В., Варицев Ю.А., Татарина Н.Ю., Варламов В.П. // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 6. С. 890–896.
35. Kim S.-K., Rajapakse N. // Carbohydr. Polym. 2005. V. 62. № 4. P. 357–368.
36. Lin F., Jia X.C., Lei W.X., Li Z.J., Zhang T.Y. // Spectroscopy and Spectral Analysis. 2009. V. 29. № 1. P. 43–47.

Chitosan Antiviral Activity: Dependence on Structure and Depolymerization Method

V. N. Davydova, V. P. Nagorskaya, V. I. Gorbach, A. A. Kalitnik, A. V. Reunov,
T. F. Solov'eva, and I. M. Ermak

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

e-mail: piboc@eastnet.febras.ru

Received November 21, 2009

Abstract—Enzymatic (the action of lysozyme) and chemical (hydrogen peroxide) hydrolysis of chitosans with various degree of acetylation (DA)—25, 17, and 1.5%—was performed. Purification and fractioning of the hydrolysis products were performed using dialysis, ultrafiltration, and gel-penetrating chromatography. Low-molecular (LM) derivatives of the polysaccharide with molecular masses from 17 to 2 kDa were obtained. The study of their antiviral activity against the tobacco mosaic virus (TMV) showed that these samples inhibited the formation of local necroses induced by the virus for 50–90%. The antiviral activity of the LM chitosans significantly increased with the lowering of their polymerization degree. Furthermore, the products of the enzymatic hydrolysis possessed higher activity than the chitosan samples obtained as a result of chemical hydrolysis. It was revealed that the exhibition of the antiviral activity weakly depended on the degree of acetylation of the samples.