



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-1-95-101>
УДК 619:615.37:576.54



Цитотоксические свойства хитозана *in vitro*

Е. И. Ярыгина, О. А. Минькова, В. Ю. Лага

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина»
(ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина), ул. Академика Скрябина, 23, г. Москва, 109472, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Хитозан, благодаря иммуномодулирующим и мукоадгезивным свойствам, является перспективным адъювантом для вакцин. Безопасность, в частности отсутствие цитотоксичности, – ключевое требование к адъювантам. Исследования *in vitro* позволяют определять биосовместимость препарата хитозана до тестирования на животных.

Цель исследований. Исследовать цитотоксическое действие раствора низкомолекулярного хитозана в концентрации 10 мг/мл на культурах фибробластов эмбриона кур и эпителиоподобных клеток коронарных сосудов телят для обоснования его дальнейшего применения в качестве вакцинного адъюванта.

Материалы и методы. Применяли низкомолекулярный хитозан (степень деацетилирования – 90%) в 1%-м растворе глутаминовой кислоты, pH 6,9. Цитотоксичность определяли комплексно, используя метод витального окрашивания трипановым синим (оценка жизнеспособности), прижизненное микроскопическое наблюдение (оценка морфологии) и расчет индекса пролиферации после 72-часовой инкубации при температуре +37 °C в атмосфере 5%-го диоксида углерода.

Результаты и обсуждение. Количество жизнеспособных клеток фибробластов эмбриона кур и коронарных сосудов телят после двухчасовой инкубации с хитозаном соответствовало значениям 97,4 и 98,7%, не имеющим статистически значимых отличий от контролей (97,6 и 96,4%). При микроскопическом наблюдении клетки в опытной группе через 72 ч инкубации формировали плотный однородный монослой без признаков цитопатического эффекта, вакуолизации, без изменений морфологии, аналогичный таковому в контрольных лунках. Индексы пролиферации в опытных и контрольных группах были сопоставимы: для фибробластов эмбриона куры – 3,9 и 3,6, для коронарных сосудов телят – 3,7 и 3,8, что свидетельствует об отсутствии цитостатического действия изучаемого препарата.

Заключение. Хитозан низкомолекулярный в концентрации 10 мг/мл не проявляет цитотоксических или цитостатических свойств *in vitro* в отношении тестируемых клеток. Полученные данные подтверждают его биосовместимость и являются основанием для дальнейших исследований *in vivo* с целью разработки безопасных и действенных вакцин для ветеринарного применения.

Ключевые слова: хитозан, цитотоксичность, адъювант, жизнеспособность клеток, пролиферация, клеточные культуры, первичная культура фибробластов эмбриона кур, перевиваемая линия эпителиоподобных клеток коронарных сосудов телят, *in vitro*

Благодарности: Авторы выражают благодарность научным сотрудникам Л. М. Акбаевой и Л. М. Чомаевой (научно-исследовательская лаборатория биотехнологии и прикладной иммунологии ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина) за рекомендации по совершенствованию исследований.

Для цитирования: Ярыгина Е. И., Минькова О. А., Лага В. Ю. Цитотоксические свойства хитозана *in vitro*. *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (1): 95–101. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-1-95-101>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Минькова Ольга Александровна, ассистент кафедры вирусологии и микробиологии имени академика В. Н. Сюрица, ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина, ул. Академика Скрябина, 23, г. Москва, 109472, Россия, minkowa.olga2012@ya.ru

In vitro evaluation of chitosan cytotoxic properties

Elena I. Yarygina, Olga A. Minkova, Vita Yu. Laga

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K. I. Skryabin, ul. Akademika Skryabina, 23, Moscow 109472, Russia

ABSTRACT

Introduction. Chitosan immunomodulatory and mucoadhesive properties render it a promising vaccine adjuvant. Safety – particularly the absence of cytotoxicity – is a key requirement for adjuvant candidates. *In vitro* biocompatibility assessments enable evaluation of chitosan preparations prior to animal testing.

Objective. To evaluate low molecular weight chitosan solution at a concentration of 10 mg/mL for its cytotoxic effect on chicken embryo fibroblast (CEF) cultures and calf coronary artery epithelial-like cells (CCEC) to justify its further use as a vaccine adjuvant.

Materials and methods. Low molecular weight (LMW) chitosan (degree of deacetylation: 90%) prepared with a 1% glutamic acid solution (pH 6.9) was used. Cytotoxicity was comprehensively assessed using three methods: trypan blue vital staining (for cell viability), live-cell microscopy (for morphological evaluation), and calculation of the proliferation index after 72 hours of incubation at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

Results and discussion. Following 2-hour incubation with chitosan, viable CEF and CCEC were 97.4 and 98.7%, respectively, with no significant differences from controls (97.6 and 96.4%). Microscopy at 72 hours showed dense, homogeneous monolayers in test groups, free of cytopathic effects, vacuolization, or morphological changes – indistinguishable from controls. Proliferation indices aligned closely (CEF: 3.9 and 3.6; CCEC: 3.7 and 3.8), evidencing no cytostatic effect of the chitosan preparation.

Conclusion. Low-molecular-weight chitosan (10 mg/mL) exhibited no *in vitro* cytotoxic or cytostatic effects on the tested cell lines. The findings confirm its biocompatibility and justify advancement to *in vivo* studies for developing safe, effective vaccines for veterinary use.

© Ярыгина Е. И., Минькова О. А., Лага В. Ю., 2026

Keywords: chitosan, cytotoxicity, adjuvant, cell viability, proliferation, cell cultures, primary chicken embryo fibroblasts (CEF), continuous calf coronary artery epithelial-like cells (CCEC), *in vitro*

Acknowledgements: The authors express their gratitude to L. M. Akbaeva and L. M. Chomaeva, Researchers of the Research Laboratory for Biotechnology and Applied Immunology of the Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K. I. Skryabin, for their recommendations on the study improvement.

For citation: Yarygina E. I., Minkova O. A., Laga V. Yu. *In vitro* evaluation of chitosan cytotoxic properties. *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (1): 95–101. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-1-95-101>

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interests.

For correspondence: Olga A. Minkova, Assistant, Department of Virology and Microbiology named after Academician V. N. Syurin, Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K. I. Skryabin, ul. Akademika Skryabina, 23, Moscow 109472, Russia, minkova.olga2012@ya.ru

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционные болезни, такие как грипп птиц, ньюкаслская болезнь, инфекционный бронхит кур, метапневмовирусная инфекция птиц, наносят значительный экономический ущерб промышленному птицеводству во всем мире [1, 2]. Возбудители этих заболеваний характеризуются высокой контагиозностью, широким распространением и способностью вызывать массовую гибель птицы, что приводит к экономическим потерям и ограничениям международной торговли. Существующие коммерческие вакцины хотя и широко применяются, не всегда обеспечивают стерильный иммунитет и полную защиту привитого поголовья, особенно в условиях интенсивного птицеводства и высоко давления полевых штаммов вирусов. Это диктует необходимость поиска новых путей повышения иммуногенности и продолжительности действия вакцин [3, 4].

Одним из перспективных направлений вакцинологии является разработка и применение современных адъювантов – веществ, которые при добавлении в состав вакцины способны усиливать, пролонгировать и модулировать иммунный ответ на антиген вакцины [5]. Механизмы действия современных адъювантов разнообразны и направлены на активацию врожденного иммунитета, что в конечном счете способствует формированию более сильного и напряженного адаптивного иммунного ответа [6]. При этом безопасность, в частности отсутствие цитотоксичности, остается ключевым требованием к любым новым адъювантным композициям [7, 8].

Хитозан – это натуральный полимер, который получают путем деацетилирования хитина, основного структурного компонента панцирей ракообразных и клеточных стенок грибов. Его ключевым преимуществом является низкая токсичность для теплокровных организмов и способность разлагаться без вреда для окружающей среды [9, 10, 11]. Благодаря этому набору свойств, а также наличию свободных химических реактивных аминогрупп хитозан широко применяется в медицине и фармацевтике как компонент раневых повязок, в качестве носителя для доставки лекарственных средств и, что особенно важно, в качестве адъюванта для вакцин [12].

В вакцинологии хитозан рассматривается как многофункциональный адъювант, особенно для мукозального применения (интраназального, окулярного, перорального) [13, 14]. Его адъювантные свойства связывают с комплексом механизмов. Во-первых, хитозан, будучи катионным полимером, способен временно снижать прочность плотных контактов между эпителиальными клетками слизистых оболочек, увеличивая их проницаемость и облегчая проникновение антигена [15, 16]. Во-вторых, производные хитозана могут формировать депо антигена в месте введения, обеспечивая пролонгированное высвобождение действующего вещества. В-третьих, хитозан оказывает прямое стимулирующее действие на клетки врожденного иммунитета, вероятно,

за счет взаимодействия с паттернраспознающими рецепторами, такими как TLR-2, что приводит к активации антигенпрезентирующих клеток и продукции провоспалительных цитокинов [17]. Зарубежные исследователи показали, что хитозан способен усиливать как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунный ответ [16, 17, 18], что делает его особенно востребованным для разработки новых вакцин. Важно отметить, что адъювантный эффект может варьироваться в зависимости от молекулярной массы и степени деацетилирования полимера [9, 14].

Особый интерес представляет использование низкомолекулярного хитозана в составе вакцин для птиц, в частности против ньюкаслской болезни. Низкомолекулярные фракции, как правило, обладают лучшей растворимостью при физиологическом pH и, по данным ряда исследований, проявляют меньшую потенциальную токсичность по сравнению с высокомолекулярными аналогами [9]. Однако перед изучением иммуногенности принципиально важно установить базовую безопасность и отсутствие прямых токсических эффектов исследуемого препарата на клеточном уровне.

Определение цитотоксичности *in vitro* в клеточных линиях является первым обязательным этапом доклинических исследований любого нового соединения, претендующего на биомедицинское или ветеринарное применение. Этот подход, регламентированный международными стандартами (например, ISO 10993-5), позволяет быстро, экономично и этично (в соответствии с концепцией 3R – Replacement, Reduction, Refinement) получить первичные данные о биологической совместимости препарата, сводя к минимуму или откладывая использование лабораторных животных на более поздние стадии исследований [7]. Данное решение широко применяется для оценки безопасности самых различных соединений – от пестицидов до фармацевтических субстанций, что подтверждает его универсальность и надежность [8, 19].

Выбор клеточных линий был обусловлен их репрезентативностью. Первичная культура фибробластов эмбриона кур (ФЭК) характеризуется высокой чувствительностью к токсическим воздействиям. Перевиваемая линия эпителиоподобных клеток коронарных сосудов теленка (КСТ) моделирует клеточный барьер, с которым сталкивается мукозально применяемый адъювант. Концентрация 10 мг/мл была выбрана как заведомо превышающая предполагаемые рабочие концентрации в вакцинах (1–2 мг/мл) для стресс-тестирования и оценки запаса безопасности.

Таким образом, цель данной работы – проведение исследования цитотоксического действия раствора низкомолекулярного хитозана в концентрации 10 мг/мл в клеточных линиях ФЭК и КСТ для обоснования его дальнейшего применения в качестве вакцинного адъюванта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе кафедры вирусологии и микробиологии имени академика В. Н. Сюрина

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина». Все работы выполняли в стерильных условиях ламинарного бокса с соблюдением стандартных правил асептики.

Приготовление раствора хитозана. В работе использовали низкомолекулярный водорастворимый хитозан со степенью деацетилирования 90% (ЗАО «Биопрогресс», Россия; форма выпуска – порошок). Рабочий 2%-й (20 мг/мл) раствор хитозана готовили в 1%-й глутаминовой кислоте (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1:5 (вес/объем), pH доводили до величины $6,9 \pm 0,1$ фосфатно-солевым буферным раствором (ООО «БиолоТ», Россия) [9, 14].

Клеточные культуры и условия культивирования. В исследовании использовали две линии адгезивных клеток различного происхождения для комплексной оценки потенциальной цитотоксичности:

– клетки КСТ (коллекция ООО «БиолоТ», Россия) – перерабатываемая диплоидная линия эпителиоподобных клеток, полученная из коронарных сосудов плода крупного рогатого скота. Данная линия характеризуется стабильным ростом и высокой чувствительностью к внешним воздействиям, что делает ее релевантной моделью для токсикологических исследований;

– первичная культура ФЭК была получена в лабораторных условиях по стандартной методике трипсинизации тканей 11-суточных SPF-эмбрионов [19]. В работе использовали клетки 3-го пассажа, которые сохраняют высокую метаболическую активность и чувствительность к токсическим воздействиям, характерную для непереживаемых культур [17].

Культивирование клеток проводили в стандартных стерильных условиях в инкубаторе (Binder, Германия) при постоянной температуре $37,0 \pm 0,5$ °C в атмосфере 5%-го CO₂ для поддержания стабильного pH питательной среды (7,2–7,4). Ростовая питательная среда на основе смеси сред Игла MEM и 199 в соотношении 1:1 (ООО «БиолоТ», Россия) содержала 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «БиолоТ», Россия), обеспечивающей факторы адгезии и роста. Для предотвращения бактериальной контаминации в среду добавляли антибиотики: 100 МЕ/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина (ООО «БиолоТ», Россия). Среду меняли каждые 48–72 ч в зависимости от скорости роста клеток. При достижении монослоем 80–90% конfluence-ности осуществляли пассирование клеточных культур стандартным методом с использованием 0,25%-го раствора трипсин-версена (ООО «БиолоТ», Россия). Для экспериментов отбирали клетки в логарифмической фазе роста.

Схема эксперимента. Клетки высевали в шестиугольные планшеты (Jet Biofil, Китай) при плотности 1×10^5 кл/мл для ФЭК и 8×10^5 кл/мл для КСТ, что обеспечивало 70–80%-ю плотность монослоя к началу эксперимента. Для каждой клеточной линии использовали отдельные планшеты:

– планшет «положительный контроль»: клетки культивировали в стандартной ростовой среде;

– планшет «опыт»: клетки культивировали в ростовой среде с добавлением раствора хитозана (конечная концентрация – 10 мг/мл).

Для каждого варианта использовали три параллельные лунки планшета ($n = 3$) для обеспечения статистической достоверности. Инкубацию начинали при плотности монослоя клеток 70–80% от площади дна лунки.

Определение жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток оценивали после 2-часовой инкубации с исследуемыми растворами методом витального окрашивания 0,4%-м раствором трипанового синего (ООО «БиолоТ», Россия).

Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Учитывали только клетки с неповрежденными мембранами (н окрашенные) [19]. В качестве положительного контроля

Таблица 1
Показатели жизнеспособности клеток после двухчасовой инкубации с хитозаном ($M \pm SD, n = 3$)

Table 1
Viability of cells after 2-hour incubation with chitosan ($M \pm SD, n = 3$)

Вариант воздействия на клетки	Жизнеспособность клеток, %	
	ФЭК	КСТ
Хитозан, 10 мг/мл в стандартной ростовой среде (опыт)	$97,4 \pm 1,2$	$98,7 \pm 0,9$
Стандартная ростовая среда (положительный контроль)	$97,6 \pm 0,8$	$96,4 \pm 1,1$
70%-й раствор этанола (отрицательный контроль)	0*	0*

* $p < 0,05$ по сравнению со всеми другими группами (as compared to all other groups).

использовали клетки, помещенные в стандартную ростовую среду, в качестве отрицательного контроля – клетки, обработанные 70%-м раствором этанола в течение 10 мин.

Морфологический анализ (метод прижизненного наблюдения). Клетки культивировали с хитозаном в течение 72 ч. Каждые 24 ч проводили визуальную оценку состояния монослоя, морфологии клеток и наличия признаков цитопатического эффекта с помощью инвертированного микроскопа Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного фазово-контрастной оптикой и цифровой камерой AxioCam 305. Микроскопию осуществляли при увеличении 120х. Оценивали следующие параметры: степень адгезии клеток, плотность монослоя, наличие вакуолизации цитоплазмы, изменение клеточной формы (округление), отслоение от субстрата и признаки лизиса.

Определение пролиферативной активности. Клетки высевали в шестиугольные планшеты с известной концентрацией (N_0). Через 72 ч совместного культивирования с хитозаном клетки диспергировали 0,25%-м раствором трипсина (из поджелудочной железы свиньи, активность 1:250; ООО «БиолоТ», Россия), приготовленным на растворе Версена (ООО «БиолоТ», Россия), и подсчитывали их количество (N_{72}) в камере Горяева. Индекс пролиферации (ИП) рассчитывали по формуле: $ИП = N_{72} / N_0$. Для исключения артефактов, связанных с возможной ошибкой при высеве, подсчет начального количества клеток (N_0) проводили в трех дополнительных лунках непосредственно после адгезии клеток (через 4 ч после высева).

Статистический анализ. Статистическую обработку выполняли с применением t-критерия Стьюдента для независимых выборок в программных пакетах Microsoft Excel 2019 и Statistica 10.0 (StatSoft, США). Анализ данных жизнеспособности клеток, полученных методом прямого подсчета в камере Горяева, проводили с предварительной проверкой соответствия данных нормальному распределению с использованием критерия Шапиро – Уилка (при $n = 3$). Однородность дисперсий в сравниваемых группах проверяли с помощью F-теста (критерий Фишера). При проведении анализа учитывали следующие параметры: для оценки жизнеспособности клеток использовали абсолютные значения количества живых и мертвых клеток, на основе которых рассчитывали процент жизнеспособности; анализ пролиферативной активности проводили на основе абсолютных значений количества клеток до и после инкубации.

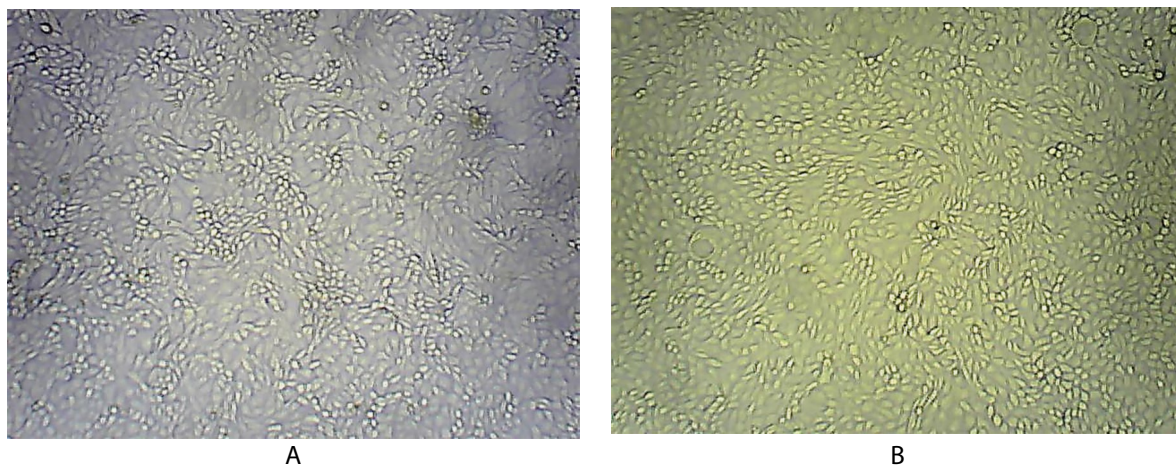


Рис. 1. Морфология клеток ФЭК после 72 ч культивирования (увеличение 120х): А – контроль, В – опыт (хитозан 10 мг/мл)
 Fig. 1. Morphology of CEF cells after 72 hours of cultivation (magnification 120x): A – control, B – test group (chitosan 10 mg/mL)

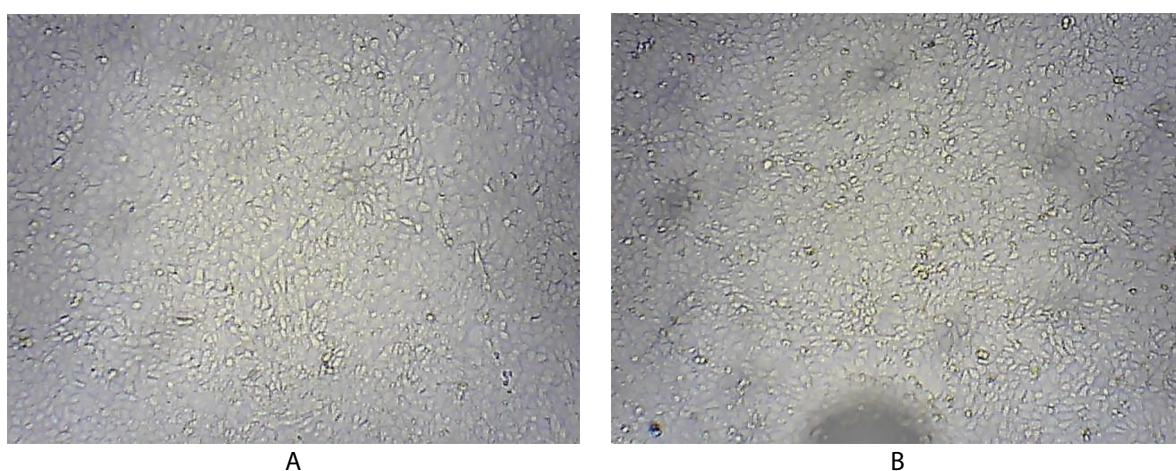


Рис. 2. Морфология клеток КСТ после 72 ч культивирования (увеличение 120х): А – контроль, В – опыт (хитозан 10 мг/мл)
 Fig. 2. Morphology of CCEC after 72 hours of cultivation (magnification 120x): A – control, B – test group (chitosan 10 mg/mL)

Для каждого экспериментального варианта использовали данные трех независимых биологических повторностей ($n = 3$), в каждой из которых подсчет клеток выполняли в двух аналитических повторностях. Статистический анализ данных морфологических исследований проводили путем качественной оценки серий микрофотографий, сделанных в идентичных условиях для всех групп наблюдения. Результаты количественных исследований представлены в формате: среднее значение \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистически значимыми считались различия при уровне $p < 0,05$. Все расчетные значения t -критерия и соответствующие им p -уровни значимости заносили в сводные таблицы для последующего анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании цитотоксическое действие раствора низкомолекулярного хитозана оценивали многосторонне, используя три взаимодополняющих метода. На первом этапе анализировали жизнеспособность клеток после кратковременной инкубации с препаратом. Затем в динамике проводили микроскопическое наблюдение для оценки морфологии клеток и состояния монослоя. Завершающим этапом было определение влияния хитозана на пролиферативную активность клеток.

Жизнеспособность клеток. Результаты оценки жизнеспособности клеток после двухчасовой инкубации представлены в таблице 1.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии цитотоксического действия низкомолекулярного хитозана (степень деацетилирования – 90%) в концентрации 10 мг/мл на две различные клеточные модели. Для культуры ФЭК показатель жизнеспособности составил $97,4 \pm 1,2\%$ против $97,6 \pm 0,8\%$ в контроле ($p > 0,05$). Для клеток КСТ значения также были сопоставимыми: $98,7 \pm 0,9\%$ – в опыте и $96,4 \pm 1,1\%$ – в контроле ($p > 0,05$). Следовательно, статистически значимых различий между опытными и контрольными группами для обеих тестируемых клеточных линий не выявлено.

Высокие показатели жизнеспособности, сохранение морфологии и неизменная пролиферативная активность убедительно доказывают биосовместимость данного соединения с клетками животного происхождения.

Анализируя полученные данные (табл. 1), можно сделать заключение, что исследуемый образец хитозана не оказывает цитотоксического действия в условиях кратковременной инкубации. Важно отметить, что минимальный разброс значений (SD в пределах 0,8–1,2%) свидетельствует о высокой воспроизводимости результатов и однородности клеточных популяций. В отрицательном контроле (обработка 70%-м этанолом) была зафиксирована полная гибель клеток, что подтверждает адекватность использованной методики и чувствительность тестовой системы. Сравнительный анализ данных по двум клеточным линиям показывает отсутствие видовой и тканевой специфичности в реакции на воздействие хитозана. Сопоставимо высокие показатели

жизнеспособности как в первичной культуре ФЭК, так и в перевиваемой линии КСТ указывают на универсальный характер биосовместимости исследуемого соединения.

Морфология клеток. Результаты прижизненного микроскопического наблюдения за клеточными культурами в динамике (через 24, 48, 72 ч инкубации) однозначно свидетельствуют об отсутствии негативного влияния хитозана на морфофункциональное состояние клеток. При визуальной оценке через 72 ч инкубации было установлено, что клетки в опытных группах сохраняли типичную морфологию и демонстрировали активную способность к формированию монослоя, полностью аналогичную контролю (рис. 1, 2).

В культуре ФЭК группы «опыт» наблюдали типичные веретенообразные (фибробластоподобные) и звездчатые (эпителиоподобные) клетки с длинными цитоплазматическими отростками, плотно прикрепленные к субстрату. Клетки имели гладкие, четко очерченные контуры и гомогенную, невакуолизованную цитоплазму. Ядра были хорошо видны, имели правильную овальную или округлую форму без признаков пикноза или кариорексиса. Сформированный монослой был плотным и гомогенным, с характерным для фибробластов упорядоченным расположением клеток.

Клетки КСТ в опытной группе, как и в контроле, имели уплощенную полигональную форму, образующую типичный монослой в виде «булыжной мостовой». Межклеточные контакты были хорошо выражены, без признаков сокращения цитоплазмы или отслоения от поверхности пластика. Важным наблюдением стало отсутствие во всех опытных группах каких-либо признаков цитопатического эффекта: не отмечалось вакуолизации цитоплазмы, появления округлых или сморщенных клеток, лизиса или образования зон дегенерации в монослое. Динамическое наблюдение показало, что процесс формирования монослоя в опытных группах протекал с той же скоростью, что и в контроле, достигая 90–95%-й плотности к 72 ч культивирования. Полученные морфологические данные находятся в полном соответствии с результатами оценки жизнеспособности и пролиферативной активности, что комплексно подтверждает вывод об отсутствии цитотоксического действия хитозана в использованной концентрации.

Прролиферативная активность. Для оценки потенциального влияния хитозана на клеточное деление был проведен количественный анализ пролиферативной активности в динамике в течение 72 ч. Как следует из результатов, представленных в таблице 2, низкомолекулярный хитозан в концентрации 10 мг/мл не оказывал ингибирующего действия на пролиферацию тестируемых клеточных культур. Количественный анализ показал, что значения индексов пролиферации в опытных группах сохранялись на высоком уровне: для ФЭК – $3,9 \pm 0,4$, для КСТ – $3,7 \pm 0,3$. Эти показатели статистически не отличались ($p > 0,05$) от контрольных значений, составивших $3,6 \pm 0,4$ и $3,8 \pm 0,3$ соответственно. Расчет абсолютного количества клеток подтвердил активное размножение культур в присутствии хитозана: количество клеток ФЭК увеличилось с $1,4 \times 10^6$ до $5,4 \times 10^6$ кл/мл, КСТ – с $1,2 \times 10^6$ до $4,4 \times 10^6$ кл/мл.

Сравнительный анализ пролиферативной активности двух различных клеточных линий выявил интересную особенность: у культуры ФЭК наблюдалась даже некоторая тенденция к стимуляции пролиферации ($3,9$ в опыте против $3,6$ в контроле), хотя эти различия не были статистически значимыми. Показатели пролиферации клеток КСТ в опыте и контроле были практически идентичными.

Таким образом, на основе результатов комплексного анализа пролиферативной активности установлено, что в использованной концентрации 10 мг/мл хитозан не только не проявляет цитостатических свойств, но и полностью сохраняет способность клеток к активному делению и росту.

Таблица 2

Влияние хитозана на пролиферативную активность клеток ($M \pm SD, n = 3$)

Table 2

Effect of chitosan on cell proliferative activity ($M \pm SD, n = 3$)

Культура клеток	Параметры	Опыт (хитозан, 10 мг/мл)	Контроль положительный
ФЭК	Внесено клеток, кл/мл	$1,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
	Количество клеток через 72 ч, кл/мл	$(5,4 \pm 0,6) \times 10^6$	$(5,1 \pm 0,5) \times 10^6$
	Индекс пролиферации	$3,9 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,4$
КСТ	Внесено клеток, кл/мл	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
	Количество клеток через 72 ч, кл/мл	$(4,4 \pm 0,4) \times 10^6$	$(4,6 \pm 0,3) \times 10^6$
	Индекс пролиферации	$3,7 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,3$

Важно подчеркнуть, что все три использованных метода оценки цитотоксичности (витальное окрашивание, морфологический анализ и оценка пролиферации) дали согласованные результаты, что усиливает надежность выводов. Выявленное отсутствие токсического действия согласуется с данными других авторов, которые также отмечают низкую цитотоксичность хитозана и его олигомеров [9, 10, 11]. Следует особо отметить, что в нашем исследовании использовалась относительно высокая концентрация хитозана (10 мг/мл). Эта концентрация на порядок превышает типичные рабочие концентрации адъювантов в вакцинных композициях, которые, как правило, находятся в диапазоне 0,1–2 мг/мл [14, 15, 18]. Несмотря на это, клетки сохраняли нормальную жизнеспособность и функциональную активность. Низкомолекулярные фракции хитозана, аналогичные по физико-химическим характеристикам тестируемому образцу, как правило, проявляют наименьшую токсичность, что объясняется их более мягким взаимодействием с клеточными мембранами [11, 17]. Этот факт имеет особое значение для разработки вакцинных препаратов, где исключение даже минимального повреждающего действия на клетки является критически важным. Способность хитозана в используемой концентрации не нарушать целостность клеточных мембран и не подавлять пролиферацию является ключевым фактором для его применения в качестве адъюванта [12]. Более того, отсутствие влияния препарата на пролиферативные характеристики клеток указывает на то, что хитозан не вмешивается в фундаментальные механизмы клеточного деления и не представляет риска индукции патологических изменений в пролиферирующих тканях.

Важно отметить, что культуры клеток ФЭК и КСТ репрезентативны для моделирования условий *in vivo*. ФЭК как первичная культура более чувствительна к токсическим воздействиям [8, 19]. Использование именно первичной культуры фибробластов позволяет исключить артефакты, связанные с длительной адаптацией клеток к условиям *in vitro*, что характерно для перевиваемых линий. Эпителиоподобные клетки КСТ представляют собой первую мишень для мукозальных адъювантов [13]. Эпителиальные клетки слизистых оболочек являются первоначальным барьером на пути мукозально применяемых вакцин, поэтому сохранение их целостности и функциональной активности имеет критическое значение для эффективности вакцинации. Отсутствие негативного воздействия на обе линии позволяет прогнозировать хорошую переносимость хитозана на уровне организма.

Адьювантный эффект хитозана, по данным литературы, может быть связан не с прямой цитотоксичностью, а с мягкой активацией клеток, индукцией хемокинов и цитокинов [14, 15]. Полученные нами данные о сохранении морфологии и пролиферативной активности клеток полностью соответствуют этой концепции, поскольку исключают их неспецифическое повреждение как механизм иммуностимуляции.

Предполагается, что иммуностимулирующий эффект хитозана опосредован активацией сигнальных путей врожденного иммунитета [17, 18], что не сопровождается повреждением клеток в месте введения препарата. Подобный механизм, при котором «полезный» иммунологический эффект достигается без повреждения клеток, предпочтителен при разработке современных безопасных адьювантов [6]. Наши результаты косвенно подтверждают эту гипотезу. Перспективным направлением дальнейших исследований представляется изучение влияния хитозана на функциональную активность иммунокомпетентных клеток, в частности на их способность к презентации антигена и продукции цитокинов. Также представляет интерес оценка синергического действия хитозана с другими известными адьювантами в комбинированных адьювантных системах.

Ограничением нашего исследования является тестирование одной концентрации хитозана. В дальнейших работах целесообразно построение полной концентрационной кривой для точного определения порога возможной токсичности, что соответствует современным подходам к доклинической оценке безопасности биоматериалов [7, 8]. Несмотря на это ограничение, можно уверенно утверждать, что в диапазоне рабочих концентраций, используемых в вакцинологии (как правило, не превышающих 1–2 мг/мл), хитозан демонстрирует исключительно высокий профиль безопасности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное комплексное исследование позволило установить, что низкомолекулярный хитозан со степенью деацетилирования 90% в концентрации 10 мг/мл не проявляет цитотоксических или цитостатических свойств *in vitro* в отношении клеток ФЭК и КСТ. Это подтверждено комплексом взаимодополняющих методов: показатели жизнеспособности клеток в опытных группах сохранялись на уровне 97,4–98,7% и статистически не отличались от контрольных значений; морфологический анализ выявил сохранение нормальной клеточной архитектоники и способности к формированию плотного гомогенного монослоя; оценка пролиферативной активности продемонстрировала высокие значения индексов пролиферации (3,7–3,9), сопоставимые с контролем. Полученные данные о высокой биосовместимости хитозана согласуются с результатами других исследований [9, 11, 14, 15] и являются обоснованием для проведения последующих экспериментов *in vivo* по изучению его адьювантной активности. Особую значимость придает результатам тот факт, что концентрация протестированного препарата хитозана значительно превышает предполагаемые рабочие концентрации адьюванта в вакцинных препаратах, что свидетельствует о широком терапевтическом диапазоне и высоком профиле безопасности изучаемого соединения.

Перспективным направлением является включение низкомолекулярного хитозана в состав вакцин против ньюкаслской болезни и других инфекций птиц с последующей оценкой специфического иммунного ответа [4]. Целесообразным представляется исследование адьювантных свойств хитозана при различных путях введения (интраназально, перорально, внутримышечно), а также изучение его синергического действия с другими иммуностимуляторами. Дальнейшие исследования могут быть направлены

на определение оптимальных рабочих концентраций хитозана в составе вакцин, исследование его влияния на клеточные и гуморальные звенья иммунитета, а также изучение продолжительности формирующегося поствакцинального иммунного ответа.

Полученные данные служат основой для разработки новых безопасных и эффективных адьювантов, создаваемых на базе низкомолекулярного хитозана. Предлагаемый препарат отвечает современным требованиям к биосовместимости иммуностимулирующих препаратов для применения в ветеринарной медицине.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dimitrov K. M., Afonso C. L., Yu Q., Miller P. J. Newcastle disease vaccines – a solved problem or a continuous challenge? *Veterinary Microbiology*. 2017; 206: 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.019>
- Animal Influenza. Ed. by D. E. Swayne. 2nd ed. Wiley-Blackwell; 2016. 656 p.
- Bordoloi S., Nayak A., Singh A. P., Singh R. V., Dubey A., Jadav K., et al. Evaluation of Newcastle disease antibody titre in broiler poultry. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2021; 10 (1): 1839–1844. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1001.214>
- Минькова О. А., Ярыгина Е. И., Ракова В. М. Исследование влияния хитозана в составе вакцины на иммунный ответ против болезни Ньюкасла у цыплят-бройлеров. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2025; 2 (4): 33–42. <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202504203>
- Petrovsky N., Aguilar J. C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and Cell Biology*. 2004; 82 (5): 488–496. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x>
- Schijns V. E. J. C. Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants. *Vaccine*. 2003; 21 (9–10): 829–831. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00527-3](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00527-3)
- ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. <https://www.iso.org/standard/36406.html>
- Прилепский А. Ю., Дроздов А. С., Богатырев В. А., Староверов С. А. Методы работы с клеточными культурами и определение токсичности наноматериалов. СПб.: Университет ИТМО; 2019. 43 с. <https://books.ifmo.ru/file/pdf/2501.pdf>
- Liaqat F., Eltem R. Chitoooligosaccharides and their biological activities: a comprehensive review. *Carbohydrate Polymers*. 2018; 184: 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.067>
- Садовая Е. А., Пименов Н. В., Литвинов О. Б. Хитинолитические ферменты микроорганизмов и пути их применения в биотехнологии. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2025; 2 (4): 137–148. <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202504215>
- Kean T., Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010; 62 (1): 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006; 31 (7): 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Горшенин Д. С., Жернов Ю. В., Кривцов Г. Г., Хаитов М. П. Применение хитозана и его производных в иммунотерапии злокачественных новообразований. *Иммунология*. 2020; 41 (5): 470–478. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-5-470-478>
- Illum L., Jabbal-Gill I., Hinchcliffe M., Fisher A. N., Davis S. S. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001; 51 (1–3): 81–96. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00171-5](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00171-5)
- Vasiliev Yu. M. Chitosan-based vaccine adjuvants: incomplete characterization complicates preclinical and clinical evaluation. *Expert Review of Vaccines*. 2015; 14 (1): 37–53. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.956729>
- Carroll E. C., Jin L., Mori A., Muñoz-Wolf N., Oleszycka E., Moran H. B. T., et al. The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons. *Immunity*. 2016; 44 (3): 597–608. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.004>
- Bi Y., Xu Q., Su L., Xu J., Liu Z., Yang Y., et al. The combinations chitosan-Pam₃CSK₄ and chitosan-monophosphoryl lipid A: promising immune-enhancing adjuvants for anticancer vaccine PAC. *Infection and Immunity*. 2019; 87 (12): e00651-19. <https://doi.org/10.1128/iai.00651-19>
- Zaharoff D. A., Rogers C. J., Hance K. W., Schlom J., Greiner J. W. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine*. 2007; 25 (11): 2085–2094. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.034>
- Фрешни Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство. 5-е изд. М.: Лаборатория знаний; 2022. 791 с.

REFERENCES

- Dimitrov K. M., Afonso C. L., Yu Q., Miller P. J. Newcastle disease vaccines – a solved problem or a continuous challenge? *Veterinary Microbiology*. 2017; 206: 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.019>
- Animal Influenza. Ed. by D. E. Swayne. 2nd ed. Wiley-Blackwell; 2016. 656 p.
- Bordoloi S., Nayak A., Singh A. P., Singh R. V., Dubey A., Jadav K., et al. Evaluation of Newcastle disease antibody titre in broiler poultry. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2021; 10 (1): 1839–1844. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1001.214>
- Minkova O. A., Yarigina E. I., Rakova V. M. A study of the effect of chitosan in the immune response against Newcastle disease in broiler chickens. *Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya*. 2025; 2 (4): 33–42. <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202504203> (in Russ.)
- Petrovsky N., Aguilar J. C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and Cell Biology*. 2004; 82 (5): 488–496. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x>
- Schijns V. E. Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants. *Vaccine*. 2003; 21 (9–10): 829–831. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00527-3](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00527-3)
- ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. <https://www.iso.org/standard/36406.html>
- Prilepskiy A. Yu., Drozdov A. S., Bogatyrev V. A., Staroverov S. A. Methods of working with cell cultures and determining the toxicity of nanomaterials. Saint Petersburg: ITMO University; 2019. 43 p. <https://books.ifmo.ru/file/pdf/2501.pdf> (in Russ.)
- Liaqat F., Eltem R. Chitoooligosaccharides and their biological activities: a comprehensive review. *Carbohydrate Polymers*. 2018; 184: 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.067>
- Sadovaya E. A., Pimenov N. V., Litvinov O. B. Chitinolytic enzymes of microbial origin and ways of their application in biotechnology. *Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya*. 2025; 2 (4): 137–148. <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202504215> (in Russ.)
- Kean T., Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010; 62 (1): 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006; 31 (7): 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Gorshenin D. S., Zhernov Yu. V., Krivtsov G. G., Khaitov M. R. Application of chitosan and its derivatives in immunotherapy of malignant neoplasms. *Immunologiya*. 2020; 41 (5): 470–478. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-5-470-478> (in Russ.)
- Illum L., Jabbal-Gill I., Hinchcliffe M., Fisher A. N., Davis S. S. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001; 51 (1–3): 81–96. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00171-5](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00171-5)
- Vasiliev Yu. M. Chitosan-based vaccine adjuvants: incomplete characterization complicates preclinical and clinical evaluation. *Expert Review of Vaccines*. 2015; 14 (1): 37–53. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.956729>
- Carroll E. C., Jin L., Mori A., Muñoz-Wolf N., Oleszycka E., Moran H. B. T., et al. The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons. *Immunity*. 2016; 44 (3): 597–608. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.004>
- Bi Y., Xu Q., Su L., Xu J., Liu Z., Yang Y., et al. The combinations chitosan-Pam₃CSK₄ and chitosan-monophosphoryl lipid A: promising immune-enhancing adjuvants for anticancer vaccine PAC. *Infection and Immunity*. 2019; 87 (12): e00651-19. <https://doi.org/10.1128/iai.00651-19>
- Zaharoff D. A., Rogers C. J., Hance K. W., Schlom J., Greiner J. W. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine*. 2007; 25 (11): 2085–2094. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.034>
- Freshney R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. 6th ed. Wiley-Backwell; 2010. 796 p. <https://doi.org/10.1002/9780470649367>

Поступила в редакцию / Received 24.11.2025

Поступила после рецензирования / Revised 19.01.2026

Принята к публикации / Accepted 25.02.2026

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ярыгина Елена Игоревна, д-р биол. наук, профессор кафедры вирусологии и микробиологии имени академика В. Н. Сюрин, ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина, г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-4214-039X>, jarigina@mail.ru

Минькова Ольга Александровна, ассистент кафедры вирусологии и микробиологии имени академика В. Н. Сюрин, ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина, г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-5910-1744>, minkowa.olga2012@ya.ru

Лага Вита Юрьевна, канд. биол. наук, доцент кафедры вирусологии и микробиологии имени академика В. Н. Сюрин, ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина, г. Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-7518-9408>, vita.laga@mail.ru

Elena I. Yarygina, Dr. Sci. (Biology), Professor, Department of Virology and Microbiology named after Academician V. N. Syurin, Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K. I. Skryabin, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4214-039X>, jarigina@mail.ru

Olga A. Minkova, Assistant, Department of Virology and Microbiology named after Academician V. N. Syurin, Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K. I. Skryabin, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5910-1744>, minkowa.olga2012@ya.ru

Vita Yu. Laga, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, Department of Virology and Microbiology named after Academician V. N. Syurin, Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K. I. Skryabin, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-7518-9408>, vita.laga@mail.ru

Вклад авторов: Ярыгина Е. И. – разработка концепции и планирование эксперимента, утверждение финальной версии статьи для публикации; Минькова О. А. – проведение эксперимента, анализ данных, написание рукописи; Лага В. Ю. – научное консультирование, анализ результатов, редактирование рукописи. Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации и одобрили финальную версию статьи.

Contribution of the authors: Yarygina E. I. – study conceptualization and design, final approval of the paper for publication; Minkova O. A. – tests, data analysis, paper writing; Laga V. Yu. – scientific consulting, analysis of results, paper editing. All authors made an equivalent contribution to the preparation of the publication and approved the final version of the paper.