

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА: ПРАКТИКА И ТЕОРИЯ

С.Н. Куликов*, Ю.А. Тюрин*, А.И.Албулов**,
С.А. Лопатин***, В.П. Варламов***

*Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, Казань, E-mail: kuliks@yandex.ru

**Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
биологической промышленности, г. Щёлково

***Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, varlamov@biengi.ac.ru

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CHITOSAN: PRACTICE AND THEORY

S.N. Kulikov*, Yu.A. Turin*, A.I. Albulov**,
S.A. Lopatin***, V.P. Varlamov ***

*Kazan scientific research institute of epidemiology and microbiology, Kazan

**Russian federal research and technological institute of biological industry, Shchelkovo

***Centre «Bioengineering» of Russian Academy of Sciences, Moscow

ABSTRACT

It was investigated and discussed the influence of chemical parameters of chitosan on its antibacterial activity.

Особенностью современных проблем терапии бактериальных инфекций стали широкое распространение устойчивости микробов к антибиотикам, развитие дисбактериозов, смена в ходе лечения инфекционного объекта представителями грибной микрофлоры. В этой связи являются актуальными поиск и применение веществ, обладающих антибактериальными и антигрибными свойствами, к которым у патогенов не вырабатывается устойчивости, которые могут быть использованы в лечебно-профилактических целях для коррекции дисбактериоза кишечника, не вызывая развития микробиологических нарушений, связанных с применением антибактериальных препаратов [2].

Целью работы являлось исследование антибактериальных свойств препарата «ХитАН» на основе хитозана — природного поликатиона, состоящего из остатков глюкозамина и N-ацетилглюкозамина [5].

В работе использовали лечебно-профилактический препарат «ХитАН» (ЗАО «Био-прогресс», г. Щёлково), полученный из крабового хитина с помощью щелочного деацетилирования. Степень деацетилирования хитозана 85%. Антибактериальную активность хитозана исследовали *in vitro* на клинических изолятах бактерий, выделенных от пациентов с дисбактериозом кишечника, ассоциированного с массивным ростом условно-патогенных энтеробактерий ($>10^7$ КОЕ/г кала) — *Escherichia coli* (гемолитические и негемолитические), *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*. Для этого хитозан растворяли в натрий-ацетатном буфере с pH 6,0 до конечной концентрации 0,1%. Добавляли к раствору хитозана бактериальную суспензию, содержащую 10^7 КОЕ/мл. После часовой инкубации производили высев на МПА для подсчёта количества выживших клеток.

Проведенное нами исследование показало, что хитозан обладает антибактериальным действием в отношении энтеробактерий — *E.coli*, *E.agglomerans*, *K.pneumoniae* — возбудителей дисбактериозов кишечника (рис.). Хитозан эффективно подавлял штаммы *E.coli*, обладающие гемолитической активностью.

Таким образом, препарат «ХитАН» на основе хитозана может применяться при лечении дисбактериозов кишечника с целью элиминации избыточного роста условно-патогенных энтеробактерий.

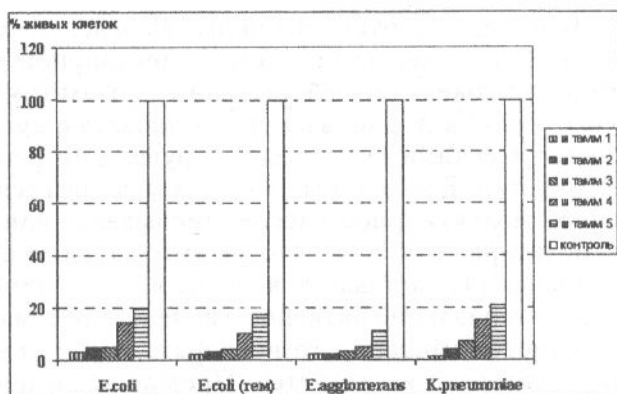
Следует отметить, что механизм антибактериального действия хитозана до сих пор остается малоизученным [1]. Показано, что в растворе положительно заряженный хитозан связывается с бактериями, которые заряжены отрицательно, в результате чего наблюдается агглютинация клеток. Происходит изменение морфологии внешних клеточных структур, появление в среде внутриклеточных компонентов — белков и нуклеиновых кислот. Обычно антибактериальное действие хитозана объясняют его связыванием с поверхностью клеточной стенки, в результате чего нарушается обмен веществ между клеткой и внешней средой: затрудняется поступление в клетку питательных веществ и кислорода, а также выделение клеткой вторичных метаболитов, которые могут быть токсичными для бактерий, и ферментов.

Связываясь с внешней мембраной грамотрицательных микробов, хитозан изменяет ее структуру, в результате чего увеличивается ее проницаемость для полиэлектролитов, что также ведет к нарушению её нормального функционирования. Есть предположение, что хитозан проникает внутрь бактериальной клетки и связывается с нуклеиновыми кислотами. Образует комплекс с хромосомной ДНК, хитозан, возможно, препятствует ее репликации и транскрипции, а комплексируясь с мРНК, ингибирует трансляцию.

В клеточных стенках грамположительных микробов содержатся тейхоевые и липо-тейхоевые кислоты, которые придают отрицательный заряд бактериальным клеткам и рассматриваются как важнейший резервуар двухвалентных катионов и регулятор ионного обмена. Таким образом, хитозан способен не только хелатировать и делать менее доступными для микробов некоторые металлы, но и вступать во взаимодействие с тейхоевыми кислотами, замещая ионы металлов. Более того, тейхоевые кислоты являются регуляторами работы автолитических ферментов. Возможно, имеет место электростатическое взаимодействие между тейхоевыми кислотами, отрицательный заряд которых обусловлен фосфатными группами и положительно заряженными белками-автолизинами.

Так, из клеточной стенки *Streptococcus pneumoniae* выделены автолитические ферменты: N-ацетилмурамил-L-аланин-амидаза и эндо-b-N-ацетилглюкозаминидаза. Созревание и активность этих ферментов зависит от их взаимодействия с тейхоевыми кислотами, поэтому можно предположить, что конкуренция хитозана за отрицательно заряженные фосфатные группы способствует высвобождению из комплекса автолизина, которые запускают процесс деградации клеточной стенки.

Немаловажную роль в активности хитозана играют его химическая структура и условия внешней среды. Считается общепринятым, что антибактериальная активность хитозана связана с его аминогруппами [3]. Поэтому увеличение степени деацетилирования, позволяющее хитозану иметь максимальное количество свободных аминогрупп в полимерной цепочке, а также увеличение кислотности среды, способствующее протонированию максимального числа аминогрупп, прямо влияет на антибактериальную активность хитозана, поскольку эти свойства отвечают за эффективность связывания хитозанового полимера с микробными клетками. Однако противоречивыми остаются сведения о влиянии молекулярной массы хитозана на его антибактериальное действие. Есть данные о том, что антибактериальный эффект увеличивается с возрастанием степени полимеризации хитозана. Подобный эффект объясняется тем, что увеличение количества аминогрупп способствует более прочному связыванию полимера с поверхностными структурами клетки, большей степени агглютинации клеток в растворе, а также большей вязкости раствора, что может уменьшать скорость диффузии питательных веществ и кислорода в которых нуждается микробная клетка.



Влияние хитозана на клинические изоляты энтеробактерий

Имеются и противоположные данные: что антибактериальная активность хитозана возрастает с уменьшением его молекулярной массы. Такой эффект объясняется тем, что низкомолекулярный хитозан и его олигомеры способны проникать через клеточную стенку бактерий, взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами и другими цитоплазматическими веществами, нарушать их функционирование, что влечет за собой гибель клетки. В некоторых работах указывается на эффективность хитозана с определенной молекулярной массой, уменьшение или увеличение которой ведет к снижению антибактериальной активности хитозанового полимера.

Однако представляется важным, что взаимосвязь молекулярной массы хитозана с антибактериальной активностью нельзя рассматривать в отрыве от других параметров как самого хитозанового препарата, так и условий, в которых биологическая активность хитозана исследуется. Прежде всего немаловажное значение может иметь рН среды, в которой хитозан взаимодействует с микробными клетками. Поскольку известно, что рК хитозана, т. е. рН, при котором половина аминогрупп заряжена положительно, или любая иная степень протонирования, как известно, зависит как от самого значения рН среды, так и от степени полимеризации хитозановой молекулы. Мономер хитозана — глюкозамин имеет рК примерно 8,1 (такой же рК имеет Трис — тоже небольшая органическая молекула, содержащая первичную аминогруппу). С увеличением степени полимеризации рК хитозана снижается, поскольку увеличение количества аминогрупп в полимерной цепи будет способствовать нарастанию плотности положительного заряда на единицу длины полимера, что будет способствовать их взаимному отталкиванию. Очевидно, что наиболее сильное изменение этого параметра будет характерно для олигомеров и самых низкомолекулярных образцов хитозана, поскольку, достигнув определенной степени полимеризации, конкуренция протонов за аминогруппы и их отталкивающий эффект друг от друга будут распространяться лишь на определенное количество сахарных остатков в обе стороны полимерной цепи. Вышесказанное подтверждается тем, что значение рК для хитозанов с различной молекулярной массой не опускается ниже определенного значения и в то же время не является четким (значение рК хитозана составляет 6,2–6,5).

Таким образом, образцы хитозана с различной молекулярной массой (высокой и низкой), а следовательно, и различающиеся по значениям рК при одинаковом значении рН будут обладать различной степенью протонирования, что может повлиять на силу взаимодействия с отрицательно заряженными бактериальными клетками. Более того, при низком значении рН, когда степень протонирования и высокомолекулярного и низкомолекулярного образцов хитозана будет одинаково высокой, главное значение в антибактериальной активности будет принадлежать степени полимеризации: чем она выше, тем прочнее будет связывание поликатиона с микробными клетками.

При повышении рН имеющий низкое значение рК высокомолекулярный хитозан будет терять положительный заряд существенно быстрее, чем хитозан низкомолекулярный. При высоком рН, когда низкомолекулярный хитозан, имеющий более высокое значение рК, еще будет сохранять достаточное количество протонированных аминогрупп для проявления им антибактериального действия, высокомолекулярный хитозан уже будет неактивен. Поэтому использование хитозанов с различной молекулярной массой при различных значениях рН может дать противоположные результаты взаимосвязи степени полимеризации хитозана и антибактериальной активности, которые имеют место в литературе.

Нами был проведен эксперимент, в котором исследовалось влияние высокомолекулярного и низкомолекулярного образцов хитозана на рост культуры *Staphylococcus epidermidis* при различных значениях рН (табл.). Рост культуры оценивали по возрастанию плотности раствора после 5 ч инкубации, измеряемой при длине волны 492 нм.

Как видно из таблицы, ингибирование роста бактериальной культуры хитозановыми образцами зависит от рН: при рН 8,0 антибактериальная активность отсутствовала, по всей вероятности, по причине существенной депротенизации аминогрупп обоих хитозанов. При более кислых значениях рН характер антибактериальной активности высокомолекулярного и низкомолекулярного хитозанов был различным. Для низкомолекулярного хитозана важнейшим параметром оказалась концентрация, снижение ко-

Влияние рН на ингибирование роста *S. epidermidis* хитозанами с различными молекулярными массами

| Рост культуры <i>S. epidermidis</i> , ОП ₄₉₂ ·10 ⁻³ | | | | | | | | | | рН |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| в* | в/2 | в/4 | в/8 | 0 | н** | н/2 | н/4 | н/8 | 0 | |
| 57 | 57 | 97 | 90 | 159 | 58 | 58 | 174 | 153 | 162 | 6,0 |
| 54 | 59 | 88 | 200 | 176 | 56 | 111 | 212 | 205 | 210 | 6,5 |
| 51 | 57 | 101 | 216 | 266 | 52 | 107 | 227 | 247 | 269 | 7,0 |
| 84 | 85 | 225 | 255 | 300 | 89 | 125 | 213 | 211 | 304 | 7,5 |
| 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 260 | 260 | 260 | 260 | 260 | 8,0 |

* — концентрация высокомолекулярного хитозана,

** — концентрация низкомолекулярного хитозана.

торой ниже определенного уровня существенно снижало его антибактериальную активность, при этом вне зависимости от рН, что говорит о его достаточном положительном заряде в диапазоне рН от 6,0 до 7,5. В то же время антибактериальная активность высокомолекулярного хитозана снижалась не только при уменьшении его концентрации, но и при увеличении рН раствора.

Таким образом, антибактериальная активность хитозана зависит от его степени деацетилирования, степени полимеризации и степени протонирования. Взаимосвязь физико-химических параметров хитозана и его биологической активности может иметь сложный характер и непрямую зависимость. Для установления более четких зависимостей химической структуры хитозанового полимера и антибактериальной активности необходимо использовать образцы хитозана с низкими значениями полидисперсности [4], поскольку только в таких образцах можно ожидать однообразие и прогнозируемость изменений физико-химических параметров при изменении свойств среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герасименко Д.В., Абдиевко И.Д., Банникова Г.Е. и др. Антибактериальная активность водорастворимых низкомолекулярных хитозанов в отношении различных микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. №3. С. 301–306.
2. Куликов С.Н., Долбин Д.А., Тюрин Ю.А. Использование антибактериальных свойств хитозана при atopическом дерматите // Практическая медицина. 2007. №4 (23), с. 46.
3. Куликов С.Н., Тюрин Ю.А., Долбин Д.А. и др. Роль структуры в биологической активности хитозана // Вестник Казанского технологического университета. 2007. №6. С. 10–15.
4. Лопатин С.А., Дербенева М.С., Куликов С.Н. и др. Фракционирование хитозана методом ультрафильтрации // Журнал аналитической химии. В печати.
5. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова.— М.: Наука, 2002. 368 с.