

ВОЗДЕЙСТВИЕ ХИТОЗАНА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ КЛЕТОК ПАТОГЕННЫХ И УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

*В.М. Бондаренко, О.В. Рыбальченко, Н.Б. Вербицкая, С.Ф. Антонов**

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи РАМН, Москва,
E-mail: bvmc@orc.ru

* НИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт Петербург, E-mail: OVR@inbox.ru

IMPACT OF CHITOSAN ON CELL ULTRASTRUCTURE OF PATHOGENIC AND CONDITION PATHOGENIC MICROORGANISMS

V.M. Bondarenko, O.V.Pybalchenko, N.B. Verbitskaya, S.F. Antonov

Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology RAMS, Moscow,
E-mail: bvmc@orc.ru

State Institute of High Pure Biopreparats, Sankt Petersburg, E-mail: OVR@inbox.ru

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the effect of chitosan with mol.wt 320–350 kDa on pathogenic *Helicobacter pylori*, condition pathogenic *Candida albicans* and *Klebsiella pneumoniae*, saprophytic *Bacillus subtilis*, and probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Escherichia coli* strains.

Different impact of chitosan was shown by electron microscopic examinations the ultrastructure of microbial cells after treatment with soluble form of preparation: *L.acidophilus* was intact, *H.pylori*, *C.albicans*, *K.pneumoniae* and *B.subtilis* were destroyed, *E.coli* was partly altered. Such experiment data are leading us to the time when we will be able to rationally develop new symbiotic for specific antimicrobial properties and effective prophylaxis and therapy of different gastro-intestinal diseases associated with microecology disturbances.

Введение. Наблюдаемое в настоящее время увеличение частоты и тяжести острых инфекционных заболеваний, торпидное течение и хронизация воспалительного процесса в ряде случаев связано с развившимся дисбактериозом, сопровождающим основную болезнь [2]. При дисбиотическом состоянии часто возникают дисфункции желудочно-кишечного тракта, которые сопровождаются доминированием в кишечнике условно патогенных микроорганизмов с признаками иммунодефицитного состояния, степень выраженности которого в разных случаях различна. По данным ряда исследователей многие виды условно патогенных микроорганизмов способны формировать биопленки, экранирующие поверхность слизистой оболочки [4]. Основная масса таких микроорганизмов распределена в пристеночном слое слизи, представленной муцином, по химической природе идентичного полисахаридной капсуле некоторых бактерий. В биопленках микробные клетки располагаются на достаточно близком расстоянии друг от друга, достигая высоких концентраций на поверхности слизистой. При дисбиотических состояниях микробиоценоз кишечника претерпевает существенные изменения с превалированием в его составе условно патогенных групп бактерий и грибов рода *Candida*. Известно, что синтез ряда биологически активных веществ тесно связан с системой чувства кворума (Quorum Sensing) и происходит, как правило, при плотности бактериальной популяции не менее 10^6 [3]. Априори, условно патогенные бактерии, достигнув высокой локальной концентрации, формируют многослойные биопленки и начинают синтезировать токсические продукты, повреждающие эпителий. Полагают, что бактерии, находящиеся в составе биопленки, способны к метастазированию путем транслокации из кишечника в лимфу и системный кровоток. Экранированные биопленкой условно патогенные бактерии характеризуются большей устойчивостью к воздействию гуморальных факторов защиты макроорганизма и антибиотикам [4]. Актуальной остается про-

блема разработки новых лечебно-профилактических препаратов, эффективных для подавления условно патогенных микроорганизмов, не повреждающих нормальный микробиоценоз [1–3, 7].

Одним из перспективных лечебных препаратов, селективно подавляющих патогенные и условно патогенные микроорганизмы, мог бы быть хитозан, не повреждающий, а, по данным единичных работ, даже стимулирующий рост и развитие бифидобактерий и лактобацилл [5,6]. Многочисленные положительные свойства хитозана, подробно описанные в коллективной монографии Риккардо Муццарелли (ред.), вышедшей в 2001 г. в переводе на русском языке [6], указывают на перспективу разработки на его основе препарата пребиотика или синбиотика [2,3].

Целью настоящей работы является сравнительное электронно-микроскопическое исследование влияния хитозана на сапрофитные, условно патогенные и пробиотические микроорганизмы, в том числе *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus* D75 и *Escherichia coli* M-17.

Материалы и методы

Используемые штаммы. Объектами исследования являлись музейные культуры *Helicobacter pylori* 505, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, дрожжевых грибов *Candida albicans* 624 и пробиотические штаммы *Lactobacillus acidophilus* D75 и *Escherichia coli* M-17, входящие в состав лечебно-профилактических препаратов “Витафлор” и “Колибактерин” соответственно. Влияние хитозана мол.массы 320–350 kDa изучали на модели развивающихся культур в жидких питательных средах в условиях опыта *in vitro*. Микроорганизмы получены из музеев культур НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи РАМН (Москва) и НИИ ОЧБ (СПб).

Электронно-микроскопические исследования. Пробы бактериальных культур как в случае отсутствия подавляющего действия хитозана, так и при визуально выраженном воздействии хитозана, отбирали из осадков, полученных после щадящего центрифугирования, а также с участков бактериального роста на плотной питательной среде вместе с верхним слоем агаровых пластинок. Особенности подготовки исследуемых образцов заключались в сохранении исходной структуры и пространственного расположения исследуемых объектов. С этой целью пробы предварительно фиксировали в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида на буфере Хенкса (рН 7,2) при температуре 4°C таким образом, чтобы не повредить поверхностные структуры микробных сообществ и не нарушить их целостность. Через 24 ч на поверхность фиксированных образцов наносили несколько капель 0,5%-ного раствора агарозы, расплавленной на водяной бане и охлажденной до 30°C. Заключенные в агарозный гель пробы промывали дистиллированной водой и подвергали вторичной фиксации в 1%-ном водном растворе OsO_4 в течение суток при температуре 4°C, полностью помещая их в раствор фиксатора. Далее проводили трехкратную отмывку от фиксатора, помещая образцы в буфер на 2 ч. Для обезвоживания образцы целиком погружали в растворы спиртов возрастающей концентрации по стандартной методике и заключали в смолу. Из заливочных блоков делали заготовки на пирамитоме (Pyramitome, 11800 LKB, Швеция) для дальнейшего изготовления ультратонких срезов. Окраску ультратонких срезов проводили по общепринятому методу.

Результаты

Исследование методом ультратонких срезов клеток различных видов микроорганизмов, контактирующих с хитозаном, выявило ряд деструктивных изменений. Ультраструктурные изменения в клетках *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (рис. 1) при воздействии хитозана проявлялись, в первую очередь, в нарушении целостности клеточной стенки. Деструкция клеточной стенки сопровождалась частичным отслоением наружной и цитоплазматической мембран, при этом возникали

локальные расширения периплазматического пространства по всей поверхности клетки. Образование зон просветления в цитоплазме свидетельствовало о начальных этапах деструктивных изменений в белково-рибосомальном комплексе.

Деструктивных изменений в клетках пробиотического штамма *Lactobacillus acidophilus* D75 (рис. 2) при контакте с хитозаном выявить не удалось. Клетки лактобацилл сохраняли структурную целостность, при этом лишь в отдельных случаях на поверхности их клеточной стенки отмечено образование дополнительных аморфных слоев.

На ультратонких срезах клеток всей микробной популяции *Helicobacter pylori* 505 (рис. 3) наблюдали значительные деструктивные изменения в виде расслоения клеточной стенки с расширением периплазматического пространства, а также перераспределении электронной плотности цитоплазмы.

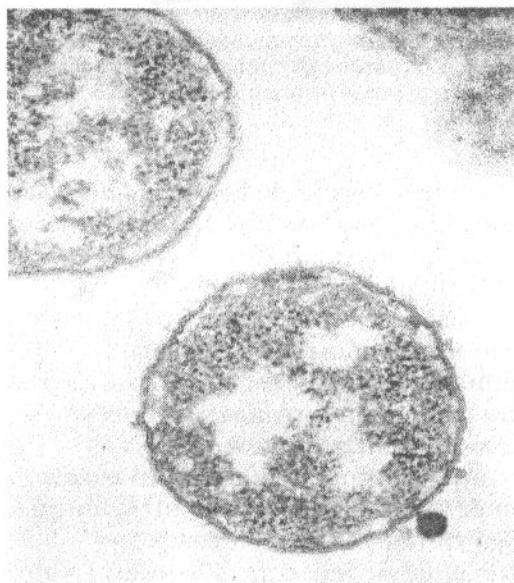


Рис. 1. Ультратонкий срез клеток *K. pneumoniae*. Начальная фаза деструкции в области цитоплазмы и клеточной стенки. Ув. $\times 55000$

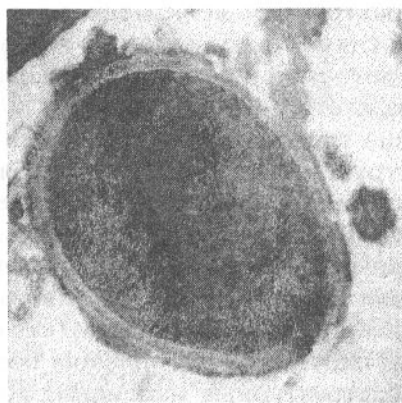


Рис. 2. Ультратонкий срез клетки *L. acidophilus*. Стимуляция синтеза S слоя; отсутствие деструктивных изменений. Ув. $\times 49000$



Рис. 3. Ультратонкий срез клеток *H. pylori*. Деструкция клеточной стенки и цитоплазмы большинства клеток возбудителя. Ув. $\times 13000$

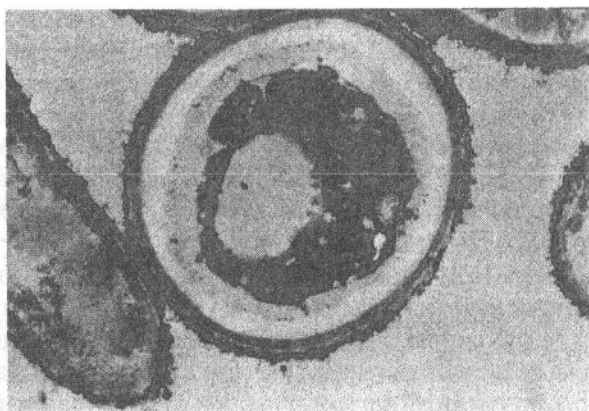


Рис. 4. Ультратонкий срез деструктурированных клеток *C. albicans*. Выраженная деструкция в области цитоплазмы клетки. Ув. $\times 22000$

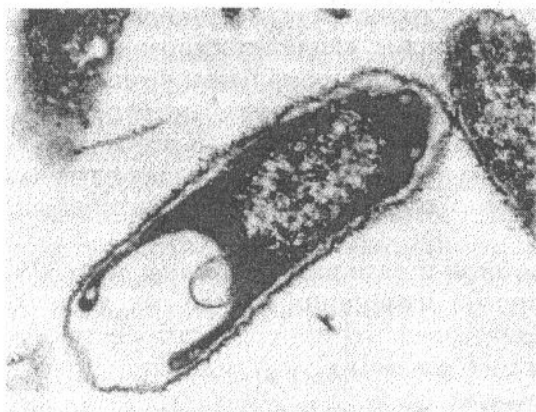


Рис. 5. Ультратонкий срез клетки *E. coli*. Деструкция клеточной стенки и цитоплазмы единичных клеток. Ув. $\times 51000$

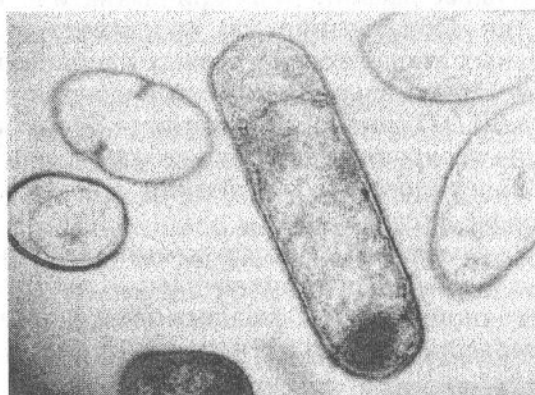


Рис. 6. Ультратонкий срез деструктурированной клетки *B. subtilis*. Ув. $\times 40000$

Ультраструктурные изменения в клетках дрожжевых грибов *Candida albicans* 624 (частичная вакуолизация или уплотнение цитоплазмы, а также отдельных слоев клеточной оболочки) свидетельствовали о появлении в популяции большинства клеток, находящихся на различных стадиях разрушения (рис. 4).

Анализ ультратонких срезов клеток *Escherichia coli* M-17 (рис. 5) показал, что ультраструктурные изменения, наблюдаемые в отдельных (единичных) клетках, сопровождались перераспределением материала цитоплазмы и деструктивными процессами в клеточной стенке, при этом инвагинация цитоплазматической мембраны внутрь клетки вызывала вакуолизацию цитоплазмы.

Воздействие хитозана на ультраструктурную организацию грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (рис. 6) проявлялось в снижении электронной плотности цитоплазмы большей части популяции клеток.

Ультраструктурные изменения сопровождались перераспределением материала белково-рибосомального комплекса, при этом исчезали контуры рибосом. Разрыхление наружного белкового слоя (S-слоя), отделение пептидогликанового слоя от цитоплазматической мембраны практически на протяжении всей клеточной стенки свидетельствовали о деструктивных процессах в клеточной стенке.

Таким образом, выявленные на электронно-микроскопическом уровне морфологические изменения свидетельствуют о повреждающем действии хитозана на клетки *H. pylori*, *S. albicans*, *K. pneumoniae* и *B. subtilis*. Хитозан частично нарушает структуру поверхностного слоя *E. coli* и практически не воздействует на клетки *L. acidophilus*. Дифференцированное воздействие хитозана на ультратонкую организацию патогенных и условно патогенных бактерий проявляется как на клеточном, так и на популяционном уровне. Наблюдаемое разнообразие ультраструктурных изменений отражает специфичность протекания деструктивных процессов в клетках каждого конкретного вида микроорганизмов.

Полученные данные позволяют предположить, что при сочетании в одном препарате-синбиотике хитозана и лактобактерий может дать более выраженный эффект при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Это предположение основывается на данных об ингибирующем действии лактобактерий на *H. pylori* [10]. Более того, подавляющее действие хитозана на условно патогенные микроорганизмы, включая грибы рода *Candida*, может быть использовано при различной патологии, ассоциированной с дисбактериозами кишечника и иммунодефицитным состоянием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В.М. Метаболитные пробиотики: механизмы терапевтического эффекта при микробиологических нарушениях // Consilium Medicum, 2005. 7. С. 437-443.
2. Бондаренко В.М., Грачева Н.М. Дисбиотические состояния и лечебные мероприятия при них // Вестн. РАМН, 2005. 12. С. 24-29.

3. *Вахитов Т.Я., Петров Л.Н., Бондаренко В.М.* Концепция создания новых пробиотических препаратов // Журн. микробиол. 2005. 5. С. 103–109.

4. *Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л.* Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. 2004, 40(11). С. 1–12.

5. *Комаров Б.А., Трескунов К.А., Албулов А.И. и др.* Применение хитозеда и фитохитозеда в клинической практике // Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана. Москва-Щелково. 1999. С. 148–151.

6. *Муццарелли Р.А.* (ред.). Хитозан *per os*: от пищевой добавки – к лекарственному средству. Н.Новгород. Изд-во Вектор-ТиС, 2001. 372 с.

7. *Петров Л.Н.* Витафлор: бактериальный препарат нового поколения для лечения и профилактики дисбактериозов. СПб, 2003. 68 с.

8. *Rhoades J., Roller S.* Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66 (1). P. 80–86.

9. *Sakamoto I., Igarashi M., Kimura K. et al.* Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* LG21 on *Helicobacter pylori* infection in human. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001, 47(5). P. 709–710.

10. *Tetz V.V., Rybalchenko O.V., Savkova G.A.* Ultrastructure of the surface film of bacterial colonies. *J. Gen. Microbiol.* 1993, 139. P. 855–858.