

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ХИТОЗАНУ МИКРОФЛОРЫ БИОПАТОВ ЯЗВЕННЫХ ПОРАЖЕНИЙ ЖЕЛУДКА И ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ

*V.M. Bondarenko**, *V.M. Chervinec***, *A.I. Albulov****

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

**ГОУ ВПО медицинская академия, Тверь, E-mail: chervinets@mail.ru

***Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
биологической промышленности РАСХН, Щелково,
E-mail: bioprogram@shelkovo.comcor.ru

SENSITIVITY TO CHITOSAN THE MICROFLORA FROM BIOPTATES OF ULCER DISEASE OF STOMACH AND DUODENUM

*V.M. Bondarenko**, *V.M. Chervines***, *A.I. Albulov****

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

**State Medical Academy, Tver, E-mail: chervinets@mail.ru

***All-Russia Research and Technological Institute of Biological Industry,
Russian Academy of Agricultural Sciences, Schyolkovo,
E-mail: bioprogram@shelkovo.comcor.ru

ABSTRACT

Probiotic therapy of ulcer disease is based on the concept of characteristics the mucous microflora of stomach and duodenum. Components of the stomach and duodenum microbiota may have harmful or beneficial effect on human health. Inflammation and antibiotic triple-therapy of ulcer disease are frequently accompanied by imbalance in the normal microflora. The broad spectrum capability of antibiotics encourage rapid overgrowth of some opportunistic bacteria that are neither eliminated nor inhibited by therapy. The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial action of different form of chitosan with the spectrum of molecular weigh between 26 to 600 kDa. One hundred forty five strains were tested for antimicrobial action of chitosan by detection of MIC on agar elective media. These microorganisms were isolated from the patients mucous bioptates of stomach and duodenum. Isolates not only have pathogenic potential, they may also be multiply resistant to antibiotics. Chitosan with 320–350 m.wt. inhibit about 75–90% of conditional pathogenic grampositive and gramnegative bacteria strains, including *Helicobacter pylori*, and 100% of *Candida* spp. strains. Probiotic strains of

Bifidobacterium and *Lactobacillus* were resistant to chitosan and the combination of probiotic bacteria with chitosan may be commonly used as a therapeutic tool by health care practitioner in the not too-distant future.

В лечении хронического гастрита, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки широко используется тройная антихеликобактерная антибиотикотерапия, включающая такие антибиотики, как кларитромицин, метронидазол, тетрациклин или ампициллин и амоксициллин. Применение антибиотиков в ряде случаев сопровождается развитием микробного дисбаланса в кишечнике, снижением колонизационной резистентности слизистых и аллергизации организма [3].

Учитывая возможность развития дисбактериоза, необходимо уделить внимание новым антибактериальным препаратам, которые помимо антимикробной активности обладают сорбционными, иммуномодулирующими и другими свойствами. Целесообразно локальное применение антибактериальных средств, содержащих хитозан, при проведении эзофаго-гастро-дуоденоскопическом обследовании больных.

Препаратом нового поколения, разработанным отечественными производителями (ЗАО "Биопрогресс"), является хитозан [1]. Он представляет собой деацетилированное производное хитина панциря краба, состоит из звеньев 2-амино-D-глюкозы и N-ацетилглюкозамина, очень близок по структуре к мукополисахаридам клеточных оболочек и внеклеточного вещества различных органов человека. Хитозан вызывает пролонгирующее действие лекарственных препаратов, усиливает их лечебный эффект. Кроме того, хитозан обладает антимикробной, сорбционной, деадгезивной и иммуномодулирующей активностью [2,4]. Хитозан разрешен для применения на практике как пищевая добавка (структурообразователь). Однако в литературе отсутствуют сведения о чувствительности микроорганизмов к хитозану с разными молекулярными массами.

Целью работы явилось изучение антимикробного спектра действия хитозана с разной молекулярной массой (ММ).

Методом диффузии в агар определяли чувствительность 145 штаммов бактерий, относящихся к 14 родам, включая *Helicobacter pylori*, которые были выделены из биоптатов слизистой оболочки больных язвенной болезнью желудка и 12-перстной кишки. Использовали хитозан, начиная с олигомеров до хитозана с ММ 600 kDa и хитина, в виде 1%-ного раствора на 0,2%-ном растворе соляной кислоты.

В результате проведенных исследований установлено (таблица), что все микроорганизмы в той или иной степени чувствительны к хитозану с различной ММ, включая *Helicobacter pylori*. Исключение составляли *Acinetobacter lwoffii*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas vesiculans*, *Enterococcus faecalis* и один штамм *Streptococcus salivarius*. Причем, грамотрицательные бактерии обладали чувствительностью к самой соляной кислоте, в которой был растворен хитозан, но даже на этом фоне *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas putrefaciens* и другие бактерии были более чувствительны к хитозану.

Грамположительные микроорганизмы были менее чувствительны к 0,2%-ной соляной кислоте и проявляли практически 100%-ную чувствительность к хитозану. Грибы рода *Candida* оказались высокочувствительными к действию хитозана.

При определении чувствительности пристеночной микрофлоры, выделенной от больных с воспалительно-эрозивно-язвенными заболеваниями, к хитозану с разной молекулярной массой установлено, что пищевой хитозан с ММ 310-350 kDa (степень деацетилирования 75-85%) показал более выраженное антимикробное действие. К нему были чувствительны 81-85% исследуемых штаммов микроорганизмов. Нечувствительными были только лактобациллы, представляющие нормальную микрофлору. 72% штаммов было чувствительно к хитозану с ММ 128 и 600 kDa, 68% микроорганизмов – к хитозану с ММ 130 kDa, 67% штаммов – к хитозану с ММ 26 kDa, 62% – к хитозану с ММ 260 kDa, 58% – к хитозану с ММ 80 kDa. К соляной кислоте были чувствительны 45% исследуемых микроорганизмов, а к хитину – 22%. К олигомерам хитозана вся исследуемая микрофлора оказалась устойчивой.

Чувствительность микроорганизмов к хитозану с ММ 80–120 kDa, 320–350 kDa и к 0,2% HCl

Виды микроорганизмов	1%-ный раствор хитозана в 0,2%-ной водной HCl	0,2%-ная водная HCl (pH 1,5–2,0)
<i>Грамотрицательные микроорганизмы</i>		
<i>Escherichia coli</i>	+ 100 %	+ 75 %
<i>Serratia marcescens</i>	+ 50 % + 100 % к хитозану*	+ 33 %
<i>Citrobacter freundii</i>	+ 66 % + 100 % к хитозану*	+ 90 %
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	+ 100 %	+ 80 %
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+ 100 % к хитозану*	+ 25 %
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	+ 100 %	+ 100 %
<i>Hafnia alvei</i>	–	+ 30 %
<i>Burkholderia cepacia</i>	+ 100 %	+ 100 %
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	+ 100 %	+ 70 %
<i>Pseudomonas putida</i>	+ 50 %	+ 100 %
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	+ 50 %	+ 30 %
<i>Pseudomonas vesiculans</i>	–	+ 60 %
<i>Helicobacter pylori</i>	+ 60 %	+ 30 %
<i>Грамположительные</i>		
<i>Streptococcus intermedius</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+ 100 %	–
<i>Анаэробы</i>		
<i>Peptococcus niger</i>	+ 100 %	–
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	+ 100 %	+ 20 %
<i>Peptococcus spp.</i>	+ 100 %	+ 60 %
<i>Gemella morbillorum</i>	+ 100 %	–
<i>Enterococcus faecalis</i>	+ к хитозану*	–
<i>Streptococcus salivarius</i>	+ 100 %	–
<i>Streptococcus salivarius</i>	–	–
<i>Bifidobacterium spp.</i>	+ 100 %	+ 100 %
<i>Lactobacillus spp.</i>	+ 100 %	+ 50 %
<i>Bacteroides spp.</i>	+ 100 %	+ 50 %
<i>Criptococcus species</i>	+ 100 %	–
<i>Грибы рода Candida</i>		
<i>C. albicans</i>	+ 100 %	–
<i>C. tropicalis</i>	+ 100 %	–
<i>C. parapsilosis</i>	+ 100 %	–

*Хитозан с молекулярной массой не менее 320 kDa.

Наиболее восприимчивыми к хитозану всего диапазона ММ оказались грамположительные стафилококки и коринебактерии. Стрептококки были малочувствительны к хитозану с ММ 80 и 600 kDa, а к остальным – восприимчивы. Микрококки чувствительны ко всем разновидностям хитозана, устойчивы к хитину и соляной кислоте. Грибы рода *Candida* показали высокую чувствительность к хитозану в диапазоне молекулярных масс от 80 до 350 kDa. *H. pylori* были более чувствительны к хитозану ММ 26, 80 и 320 kDa, но малочувствительны или нечувствительны к хитозану с другой ММ.

У бактерий родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Acinetobacter* и *Serratia* наивысшая чувствительность обнаружена к хитозану молекулярной массы 320–350 kDa. *Enterobacter* подавлялись хитозаном ММ 260 kDa и в меньшей степени хитозаном с другими параметрами, *Citrobacter* – хитозаном ММ 128 и 600 kDa, *Acinetobacter* – всеми другими препаратами хитозана, кроме 80 kDa.

Практически все штаммы условно патогенной микрофлоры были в той или иной мере чувствительны к хитозану, в то время как нормальная микрофлора была более устойчива. Так, к хитозану в концентрации 600 мкг/мл были чувствительны представители родов *Staphylococcus*, *Peptococcus*, *Enterococcus*, *Candida*, *Bacillus* и *Actinomyces*. Для ингибирования роста представителей нормальной микрофлоры требовалась в 2 раза большая концентрация хитозана.

Так, концентрация хитозана 1200 мкг/мл ингибировала рост стафилококков, псевдомонад, коринебактерий, и серраций, в то время как для подавления роста *Streptococcus salivarius* требовалась концентрация 1700 мкг/мл.

Таким образом, проведенные исследования показывают антибактериальную активность хитозана в широком диапазоне ММ от 26 до 600 kDa. Наибольшим антимикробным действием обладал хитозан с ММ 320–350 kDa. К нему были чувствительны *Helicobacter pylori*, стафилококки, стрептококки, эшерихии, энтеробактер, цитробактер серрации и ацинетобактер. В то же время лактобациллы оказались устойчивыми к хитозану ММ 320–350 kDa, что позволяет рекомендовать применение хитозана данной ММ в качестве антимикробного воздействия на патогенную и условно патогенную микрофлору слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, не повреждая при этом основных представителей нормальной микрофлоры (лакто- и бифидобактерий).

Назначение препаратов-пробиотиков на основе лактобацилл, корригирующих нарушенную нормальную микрофлору этого биотопа, можно сочетать с назначением хитозана ММ 320–350 kDa.

Отсутствие строгой закономерности в зависимости чувствительности различных микроорганизмов от ММ хитозана может быть обусловлено как самой природой данного явления, так и различной степенью дезацетилирования используемых образцов хитозана, изменяющейся в диапазоне 75–95%.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Комаров Б.А., Трескунов К.А., Албулов А.И. и др.* Применение хитодеза и фитохитодеза в клинической практике // Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана. Москва-Щелково. 1999. С. 148–151.
2. *Муцафелли Р.А.* (ред.). Хитозан per os: от пищевой добавки – к лекарственному средству. Н.Новгород: Изд-во Вектор-ТиС, 2001. 372 с.
3. *Buhling A., Radun D., Muller W.A. et al.* Influence of anti-*Helicobacter* triple-therapy withn metronidazole,omeprazole and clarithromycin on intestinal microflora. *Aliment Pharmacol. Ther* 2001, 15(9). P. 1445–1452.
4. *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.