На правах рукописи

ХАЙРУЛЛИН РУСЛАН ЗУФАРОВИЧ

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ И АНТИМИКОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДОРАСТВОРИМЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ И ОЛИГОМЕРНЫХ ФОРМ ХИТОЗАНА

03.02.03 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Казань – 2013

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Куликов Сергей Николаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой биохимии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Алимова Фарида Кашифовна

кандидат биологических наук, доцент кафедры технологии пищевых производств факультета пищевых технологий Института пищевых производств и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»
Никитина Елена Владимировна

Ведущая организация: ГБОУ ВПО Казанский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России, г. Казань.

Защита диссертации состоится 30 мая 2013г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Автореферат разослан «____» апреля 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета Д 212.081.08.
д.б.н., профессор З.И.Абрамова

Актуальность проблемы. Поиск новых антибактериальных и антимикотических веществ в настоящее время остаётся актуальной задачей в связи с постоянным появлением резистентных к классическим антибиотикам и антимикотикам штаммов условно-патогенных микроорганизмов. Важным направлением такого поиска является получение и исследование биоцидных свойств поликатионов − положительно заряженных полимеров различного происхождения, обладающих широким спектром биоцидного действия. Особый научно-практический интерес в этом плане представляет хитозан – природный полиаминосахарид, представляющий собой сополимер глюкозамина и ацетилглюкозамина, обладающий рядом ценных свойств (нетоксичность, биосовместимость, гипоаллергененность, биодеградируемость), которые востребованы в медицине и биотехнологии, а также дающий возможность создания на его основе многочисленных производных.

Несмотря на то, что биоцидной активности хитозана посвящено большое количество экспериментальных работ, механизмы биоцидного действия этого биополимера на клеточном и молекулярном уровнях раскрыты не полностью. Остаётся до конца не выясненной взаимосвязь между химической структурой хитозанового полимера и его биологическим эффектом на клетки микроорганизмов. Установление подобной взаимосвязи осложняется тем, что хитозан представляет собой гетерогенную группу веществ, различающихся по молекулярной массе, степени ацетилирования, расположению ацетилированных звеньев вдоль полимерной цепи, вязкости, значению pK_a.

До сих пор остаются противоречивыми сведения о влиянии молекулярной массы хитозана на его антимикробное действие. Практически отсутствуют работы по изучению антибактериальных свойств с использованием низкомолекулярных и олигомерных форм хитозана с различной молекулярной массой в сравнительном аспекте. Только в единичных работах можно встретить использование узкодисперсных образцов. Подобные противоречия обусловлены отсутствием полной молекулярно-массовой характеристики используемых в экспериментах образцов, в том числе по причине отсутствия стандартов молекулярной массы с низким индексом полидисперсности. Поэтому для установления взаимосвязи между химической структурой хитозана и его биоцидной активностью необходимо использовать узкодисперсные образцы полимера с охарактеризованным молекулярно-массовым распределением.

Целью работы являлась оценка антибактериальных и антимикотических свойств водорастворимых низкомолекулярных и олигомерных форм хитозана, обладающих высокой степенью деацетилирования.

Основные задачи исследования:

1. Провести оценку антибактериальных и антимикотических свойств низкомолекулярных и олигомерных форм хитозана в отношении различных видов микроорганизмов;

2. Установить влияние кислотности среды на растворимость олигохитозанов с различной молекулярной массой и их антибактериальную активность;

3. Провести исследование антибактериальных свойств ацилированных производных низкомолекулярного хитозана;

4. Определить антибактериальные свойства и влияние на морфологию клеток олигомерных форм хитозана в отношении бактерий и микроскопических грибов;

5. Провести оценку активации действия лизостафина на деградацию клеток бактерий олигохитозанами.

Научная новизна. Впервые проведено сравнительное исследование антибактериальных и антимикотических свойств низкомолекулярных и олигомерных форм хитозана с различной молекулярной массой, характеризующихся низким уровнем полидисперсности образцов и высокой степенью деацетилирования в отношении различных групп микроорганизмов – условно-патогенных энтеробактерий и стафилококков, дрожжеподобных и мицелиальных грибов. Определено влияние ацильных групп различной длины, искусственно введённых в молекулы низкомолекулярного хитозана, на его антибактериальную активность в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий.

Впервые установлен эффект инверсии зависимости антибактериальной активности хитозанового полимера от его степени полимеризации в условиях меняющейся кислотности среды. Проведенная оценка антибактериальной активности хитозана с различной молекулярной массой при разных уровнях pH среды показала, что в характере изменения биоцидных свойств хитозанового полимера важную роль играет показатель pK_a поликатиона.

Впервые представлены данные по активирующему действию хитозана на лизис клеточных стенок бактерий лизостафином, позволяющие предположить механизм антибактериального действия поликатиона посредством активации бактериальных автолизинов.

Получены данные по влиянию низкомолекулярных и олигомерных форм хитозана на способность клеток дрожжеподобных условно-патогенных грибов формировать мицелиальные структуры.

Практическая значимость. Определение взаимосвязи молекулярно-массовых параметров хитозана и его антибактериальных или антимикотических свойств позволит получать образцы хитозана с максимально высокой биоцидной активностью в отношении конкретного вида микроорганизма. Внедрение в молекулы хитозанового полимера ацильных остатков может служить одним из вариантов усиления антибактериальных свойств хитозана. Установление эффекта инверсии зависимости антибактериальной активности хитозанового полимера от его молекулярной массы может быть использовано для обоснования рационального применению хитозана в качестве антибактериального агента с получением максимально возможного эффекта в конкретных условиях с использованием минимальных количеств образца вещества. Полученные в работе данные позволяют предсказать усиление бактерицидного действия хитозана модуляцией величины pK_a при его химической модификации.

Положения, выносимые на защиту:

1. Антибактериальная и антимикотическая активность хитозана зависит от его молекулярной массы. Олигомерные формы хитозана с низкой степенью полимеризации (менее 2 кДа) проявляют наименьшую биоцидную активность. Максимальным биоцидным эффектом обладают образцы полимера с молекулярной массой более 5 кДа.

2. В кислых условиях более сильным антибактериальным действием обладают образцы с большей молекулярной массой (более 5 кДа), тогда как в слабощелочных условиях большую активность проявляют олигомерные формы хитозана (3-4 кДа).

3. Действие хитозана в субингибирующих концентрациях на клетки дрожжеподобных грибов рода *Candida* приводит к предотвращению образования ими ростовых трубок и мицелиальных структур.

Связь работы с научными программами. Работа выполнялась в соответствии с планом НИР Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии (договор № 76-Д с Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках отраслевой научноисследовательской программы «Научные аспекты обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в Российской Федерации», 2006-2010гг.; Отраслевая научно-исследовательская программа «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации», 2011-2015 гг.). Исследования выполнены при поддержке регионального гранта РФФИ №09-04-99035 р_поволжье_а.

Апробация работы. Основные положения диссертации были представлены на Международной конференции молодых учёных «Пищевые технологии и биотехнологии» (Казань, 2010г.), Международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Нижний Новгород, 2010г.), International Conference of the European Chitin Society (Saint-Petersburg, 2011г.), Межрегиональной научно-практической конференции “Инфекционные болезни взрослых и детей. Актуальные вопросы диагностики, лечения и профилактики» (Казань, 2011г.), IV ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным заболеваниям (Москва, 2012г.), X съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемического благополучия населения российской Федерации» (Москва, 2012г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, из них 6 статей в центральных рецензируемых журналах, 1 заявка на изобретение.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 133 страницах машинописного текста, включает 12 таблиц, 21 рисунок. Библиография содержит 126 наименований, в том числе 118 – зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тестерные штаммы

В работе использованы штаммы бактерий, имеющих медицинское значение: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13884, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris, Enterobacter agglomerans, Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus* ATCC 35591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990. Также использованы виды микроскопических грибов из коллекции лаборатории микологии ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора: *Candida albicans*

ATCC 90028*, Candida krusei* ВКМ 251*, Candida parapsilosis* ВКМ Y-1345*, Candida tropicalis* ВКМ Y-61*, Candida scotti* ВКМ 0736*, Torulopsis candida, Saccharomyces cerevisiae, Rhodotorula rubra.*

Образцы хитозанов

Образцы низкомолекулярных и олигомерных форм хитозана, используемые в работе представлены в табл. 1.

Таблица 1. Образцы хитозана

№ образца	Средневесовая молекулярная масса M_w, Да	Коэффициент полидисперсности	Степень полимеризации	Степень деацетилирования СД±1, моль %
1	728	1,41	4	95
2	1 524	1,39	8	93
3	2 090	1,40	12	97
4	2 283	1,34	13	97
5	3 581	1,71	20	95
6	4 224	1,38	24	97
7	5 527	2,28	32	78
8	8 300	1,50	49	99
9	9 686	1,44	56	97
10	12 761	1,39	74	95
11	15 057	1,61	87	94
12	19 991	1,66	116	98
13	600 000	-	3400	85

Ацилированные производные хитозана любезно предоставлены проф. Варламовым В.П. и Ильиной А.В. (Центр «Биоинженерия» РАН). Ацилированные производные низкомолекулярного хитозана получены в результате реакции с ангидридами соответствующих жирных кислот, содержащих 2, 4 и 6 атомов углерода. В работе использованы следующие производные: С-2 10% (С – количество атомов углерода в ацильном остатке; % - степень замещения свободных аминогрупп полимера соответствующими ацильными остатками), С-4 8%, С-4 12%, С-4 27%, С-6 8%, С-6 17%, С-6 27% и С-14 8%.

Анализ и подготовка хитозанов

Степень деацетилирования определена методом ЯМР [Hirai *et al.,* 1991].

Средневесовая (M_w), среднечисловая (M_n) молекулярная масса и индекс полидисперсности образцов хитозана определены методом ВЭГПХ на хроматографе S 2100 на колонке Ultahydrogel-250 (7,8×300 мм) в системе 0,05 М уксусная кислота – 0,15 М ацетат аммония, pH 5,1 [Лопатин с соавт., 2009].

Определение значений pK_a образцов хитозана. Значение константы диссоциации сопряженной кислоты pK_a определено методом титрования [Rawlinson *et al.,* 2010]. Расчёт значения pK_a проведён по значению pH, соответствующему середине плато на кривой титрования.

Исследование растворимости хитозанов проведено в комплексной буферной системе на основе органических кислот – MES, ACES и TES с различными значениями pH от 5,50 до 8,00 с шагом равным 0,25. Растворимость хитозана (образование осадка) оценивалась по изменению оптической плотности, регистрируемой с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом измерения светопоглощения при длине волны 600 нм.

Приготовление рабочих растворов низкомолекулярных хитозанов. Низкомолекулярные хитозаны в виде их гидрохлоридов растворяли в дистиллированной воде до концентрации 8 мг/мл (массу хитозана рассчитывали без противоиона) и стерилизовали полученные растворы посредством фильтрации через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм с последующим прогреванием на водяной бане в течение 5 минут. Растворы хранили перед использованием при температуре 4°С.

Определение биологической активности хитозанов

Определение минимальной ингибирующей (МИК) и бактерицидной (МБК) концентрации в отношении бактерий. Для определения антибактериальной активности хитозанов использован модифицированный метод, описанный в работе [Raafat *et al.*, 2008]. В стерильных 96-луночных круглодонных планшетах готовили двойные разведения вещества в МПБ, содержащем 0,15 М TES-ACES-MES-Na буфер с заданным значением pH от 5,50 до 8,00 с шагом равным 0,25. Затем в лунки планшета вносили суспензию бактерий в той же среде до конечного концентрации $2{,}5\times10^{5}$ КОЕ/мл. После 24 ч. инкубации при температуре 37°С на качалке (220 об/мин) определяли МИК хитозанов по отсутствию роста культуры в лунках с минимальной концентрацией вещества. За МБК принимали минимальную концентрацию вещества, в присутствии которой через 24 ч. инкубации количество живых клеток уменьшалось на 99,9% и более по сравнению с исходным количеством. Подсчёт живых клеток осуществляли путём посева аликвоты раствора на твёрдую питательную среду.

Определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) хитозанов в отношении грибов проводили по методике [Куликов *с соавт*., 2010]. Для оценки антимикотической активности хитозанов в отношении дрожжеподобных грибов готовили двойные разведения вещества в среде Сабуро (pH 5,5-5,7) в 96-луночных планшетах, затем добавляли суточную суспензию грибных клеток до конечного количества клеток 2×10^5 КОЕ/мл. После 48 ч. инкубации при температуре 30°С определяли МИК хитозанов по полному отсутствию роста культуры в лунках с минимальной концентрацией вещества.

Оценку ингибирования гифообразования у дрожжеподобного гриба *Candida albicans* проводили, подсчитывая в 10 разных полях зрения количество дрожжеподобных клеток. В тех же полях зрения подсчитывали количество мицелиальных структур. Рассчитывали долю мицелиальных структур по отношению к количеству дрожжеподобных клеток в опыте. Долю мицелиальных структур в контрольном варианте без добавления хитозана принимали за 100%.

Оценку влияния хитозана на проницаемость цитоплазматической мембраны проводили по выходу цитоплазматической β-галактозидазы, регистрируя её активность по расщеплению специфического субстрата – ONPG. Выход цитоплазматической галактозидазы оценивали по образованию о-нитрофенола при 450 нм.

Оценку активации олигохитозанами лизостафина проводили с использованием модифицированного метода [Bierbaum et al., 1987] где в качестве субстрата использовали клетки *S. aureus*, а в качестве фермента – лизостафин.

Микроскопирование

Изучение образцов методом с*ветовой и флуоресцентной микроскопии* проводили на микроскопе ЛОМО. Для флуоресцентной микроскопии клетки микроорганизмов окрашивали красителем Calcofluor white. Увеличение ×100.

При трансмиссионной электронной микроскопии аликвоты суспензий клеток микроорганизмов из контрольных вариантов и из вариантов с добавлением хитозанов подвергали центрифугированию при 1000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4°С [Raafat *et al.,* 2008]. Собранные центрифугированием клетки однократно отмывали в 0,05 М фосфатном буфере с pH 7,2. Затем клетки ресуспендировали в том же буфере, содержащем 3% глутаровый альдегид. После этого образцы помещали в 1% раствор четырехокиси осмия и проводили дофиксацию в течение суток. Обезвоживание осуществляли в батарее спиртов восходящей концентрации до абсолютного этанола и абсолютного ацетона. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца в соответствии с методикой [Reynolds,1963] и просматривали в электронном микроскопе JEOL1200EX при 80 кВ.

Статистическую обработку данных проводили в компьютерной программе Microsoft Office Excel 2003. Данные представлены в виде среднего значения ± среднеквадратическое отклонение. Для оценки достоверности различий между результатами в вариантах опыта использовали t-критерий Стьюдента для множественных сравнений. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез был принят за $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Оценка растворимости хитозана в зависимости от его молекулярной массы и pH среды

Было установлено, что наилучшей растворимостью обладают олигомерные формы хитозана со степенью полимеризации от 4 до 13 (рис. 1), которые характеризовались наиболее высокими показателями уровня pK_a – от 6,6 до 7,1. Данные образцы обладали хорошей растворимостью во всём диапазоне pH среды, использованной в эксперименте.

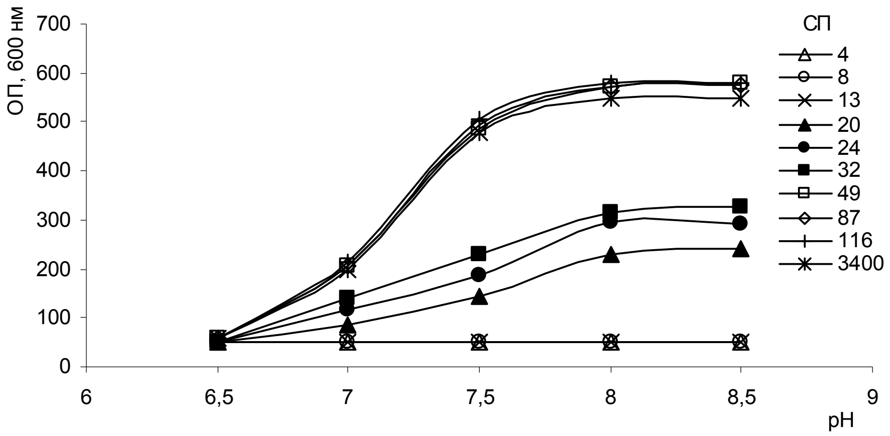

Рис. 1. Зависимость оптической плотности растворов хитозана с различной степенью полимеризации от значения pH среды после 3 ч. инкубации. СП – степень полимеризации образцов хитозана.

Другую группу хорошо растворимых образцов составляли олигохитозаны со степенью полимеризации от 20 до 32. Для них показатель pK_a составлял 6,5. Данные образцы, в отличие от вышеуказанных, образовывали в слабощелочных условиях заметное количество осадка, но не сразу, а через нескольких часов. К следующей группе можно отнести все образцы со степенью полимеризации около 50 и выше, имеющие самый низкий уровень значений pK_a, равный 6,4.

1.1. Подбор буферной системы

Подбор органических кислот с частично перекрывающимися буферными диапазонами – для MES от 5,50 до 6,70; для ACES от 6,10 до 7,50; для TES от 6,80 до 8,20, позволил получить буферную систему на основе их смеси, позволяющую готовить растворы одинакового химического состава, способные поддерживать стабильный уровень pH в широком диапазоне значений - от 5,50 до 8,20.

Таким образом, использование комплексного буферного раствора MES-ACES-TES-Na позволяет оценивать антибактериальную активность хитозана в том диапазоне кислотности среды, который недоступен для образования другими известными буферными системами на основе иных компонентов и подходящих для создания растворов хитозанового полимера без выпадения его в осадок.

2. Антибактериальные свойства олигохитозанов

Установлено, что различные виды бактерий обладают различной чувствительностью к хитозану. Наиболее чувствительным оказался *S.epidermidis*, для которого минимальная ингибирующая и бактерицидная концентрации некоторых хитозанов была менее 1 мкг/мл (рис. 2). Повышенную чувствительность к хитозану проявляла *K. pneumoniae*. Для остальных бактерий минимальные ингибирующие концентрации составляли более 100 мкг/мл.

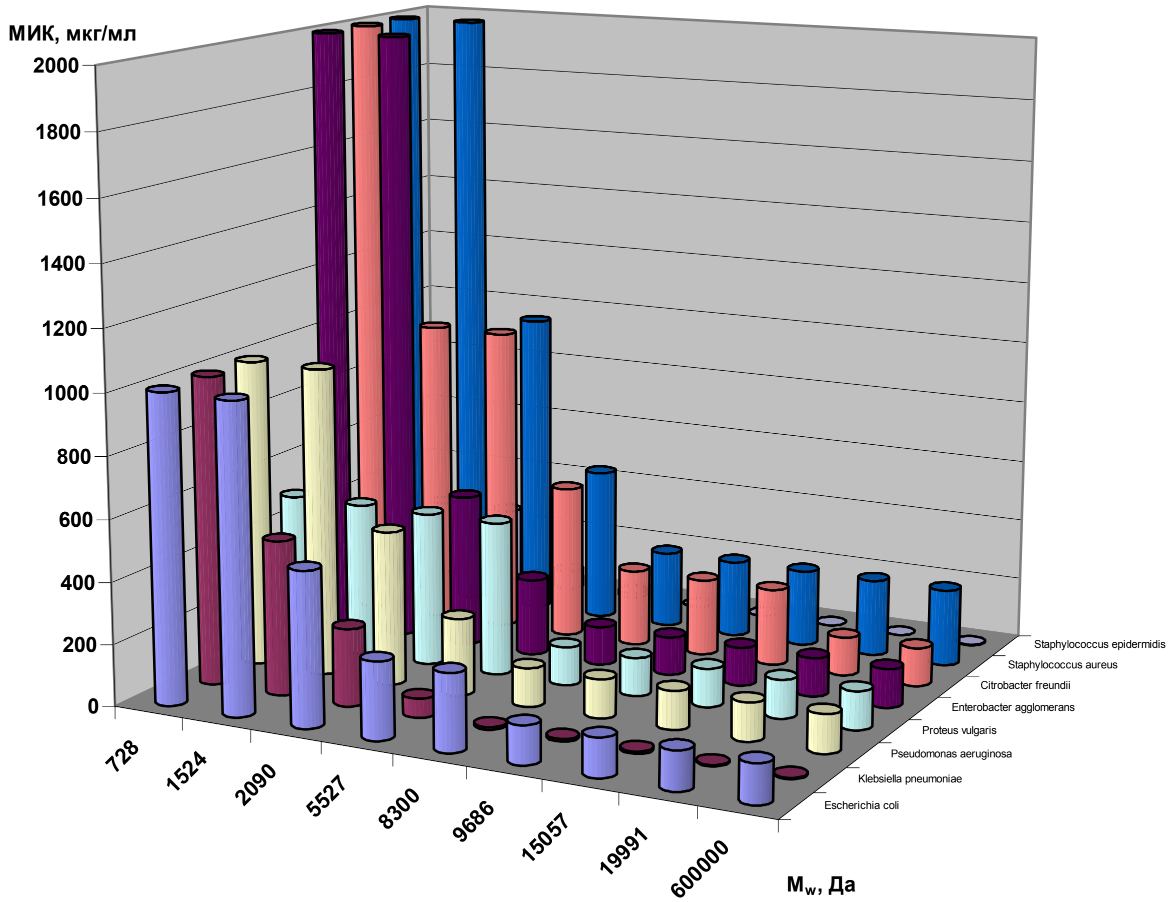

Рис. 2. Влияние молекулярной массы на МИК хитозанов в отношении бактерий (pH 6,5)

Наиболее сильный рост антибактериальных свойств отмечен для хитозанов при переходе молекулярной массы от 2 до 6-9 кДа. Для пяти из восьми видов бактерий максимальное антибактериальное действие отмечено уже для образца с молекулярной массой 8,3 кДа. Установлено, что антибактериальная активность олигомерных форм хитозана до 2 кДа незначительна.

2.1. Влияние pH на антибактериальные свойства олигохитозанов с различной молекулярной массой

В ходе определения антибактериальной активности хитозана в отношении *S. epidermidis* установлено, что ингибирующее действие полимера на рост этой бактерии зависит как от его молекулярной массы, так и от кислотности среды (рис. 3А). Для каждого исследуемого образца ингибирующая активность увеличивалась при понижении pH среды, что выражалось в уменьшении минимальной концентрации вещества, необходимого для подавления роста микроорганизма. Отдельные образцы имеют наибольший ингибирующий эффект не при максимальной кислотности среды, а в области pH 6.

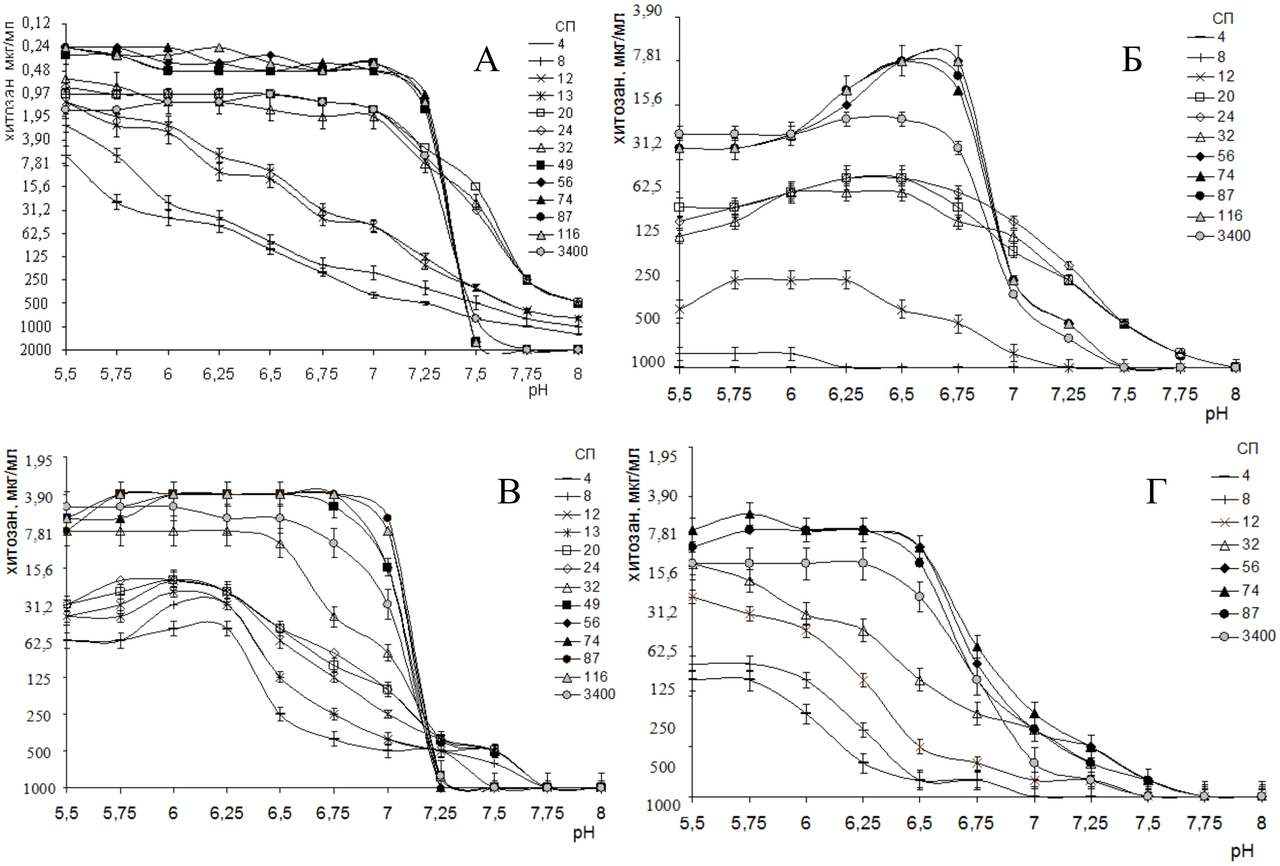

Рис. 3. Влияние pH и степени полимеризации на МИК хитозана в отношении (А) - *S. epidermidis*, (Б) – *S. aureus*, (В) - *K. pneumoniae* (Г) - *E. coli*

Значительные отличия в проявлении антибактериальных свойств характерны для олигомерных и самых низкомолекулярных форм хитозана, тогда как антибактериальная активность для образцов со степенью полимеризации близкой к 50 и выше практически одинакова. Зависимость антибактериального действия хитозана от молекулярной массы чётко разделена по двум областям значений pH: а) кислой - с pH до 7,25 и б) щелочной - с pH выше 7,25. В кислых средах при увеличении молекулярной массы хитозана его антибактериальная активность также усиливается. При этом для образцов с высокой степенью полимеризации для подавления роста бактерий требуется более чем на порядок меньшая концентрация вещества по сравнению с олигомерными образцами.

В области щелочных значений pH антибактериальная активность хитозана также усиливается при увеличении молекулярной массы. Однако данный эффект наблюдается только для олигомеров со степенью полимеризации до 32 (5,5 кДа), тогда как более высокомолекулярные образцы в данных условиях антибактериальные свойства теряют полностью. Аналогичная картина отмечена при исследовании антибактериальных свойств олигохитозанов в отношении другого представителя грамположительных прокариот – *S. aureus* (рис. 3Б) и в отношении грамотрицательных бактерий - *K. pneumoniae* и *E. coli* (рис. 3В и Г).

Таким образом, проведенная оценка антибактериальной активности ряда образцов хитозана в зависимости от его молекулярной массы с учётом pH среды показала, что в характере изменения антибактериальных свойств хитозанового полимера важную роль может играть показатель pK_a.

2.2. Влияние хитозана на морфологию бактериальных клеток

Для подтверждения и визуализации антимикробного действия хитозана с использованием трансмиссионной электронной микроскопии была проведена оценка влияния хитозанового полимера на морфологию бактериальных клеток.

Как видно из рис. 4 воздействие олигохитозанов с молекулярными массами 2,2 и 9,6 кДа на клетки *S. epidermidis* в слабокислой среде (pH 6,25) за короткое время (30 мин) приводит к существенным изменениям в их морфологии: клеточные стенки становятся более рыхлыми, на их поверхности наблюдается появление образований, вероятно представляющих собой агглютинированные полимером поверхностно-клеточные вещества. Под действием хитозанов у клеток также отмечалось изменение в цитоплазматическом содержимом – появлялись резко выраженные контрастные по электронной плотности структуры. У многих клеток регистрировалось образование вакуолеобразных структур между ними и цитоплазматической мембраной. Воздействие хитозанового полимера приводило к видимым нарушениям клеточного деления эпидермального стафилококка – наблюдалась выраженная асимметрия образования межклеточной перегородки и неравномерное распределение цитоплазматического содержимого между дочерними клетками.

В отличие от опыта в кислых условиях, когда образцы хитозана с различной молекулярной массой вызывали схожие морфологические изменения, у эпидермального стафилококка при инкубации в присутствии этих же образцов хитозана, но в щелочных условиях (рН 7,75) отмечено аналогичное изменение морфологии клеток только в опыте с использование олигохитозана с молекулярной массой 2,2 кДа (рис. 5). При использовании образца с молекулярной массой 9,6 кДа нарушений в делении клеток обнаружено не было.

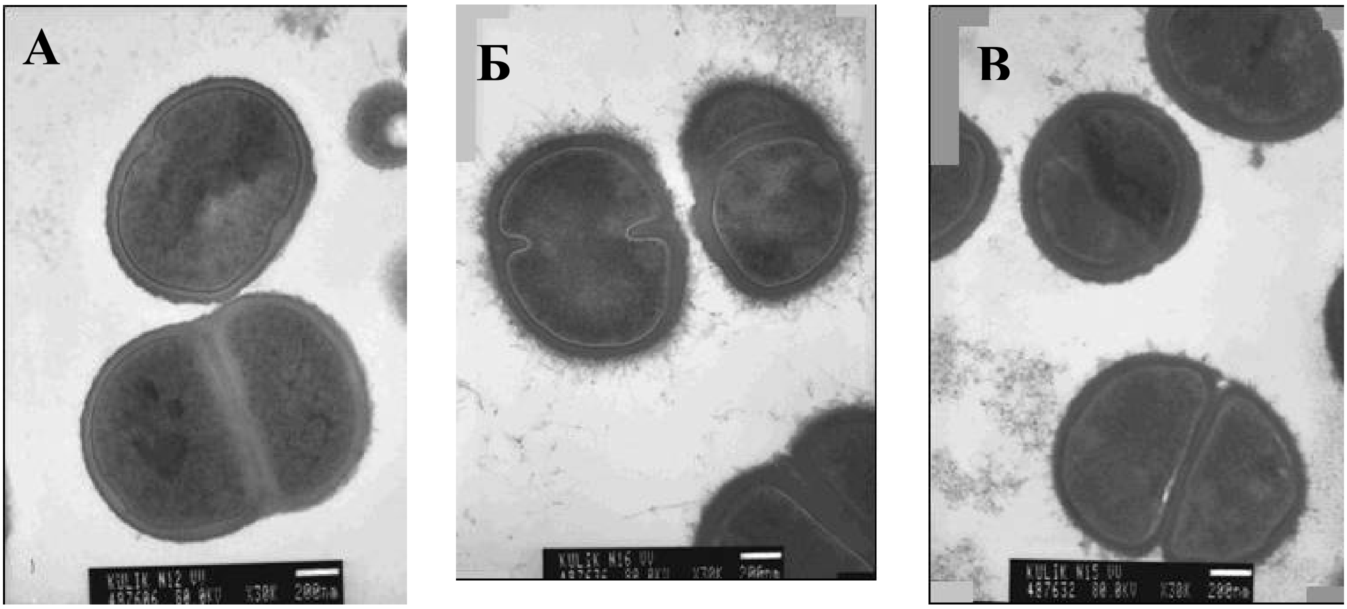

Рис. 4. Влияние хитозана на морфологию *S. epidermidis* при рН 6,25.
(А) – контроль; (Б) – хитозан 2,2 кДа;(В) – хитозан 9,6 кДа.

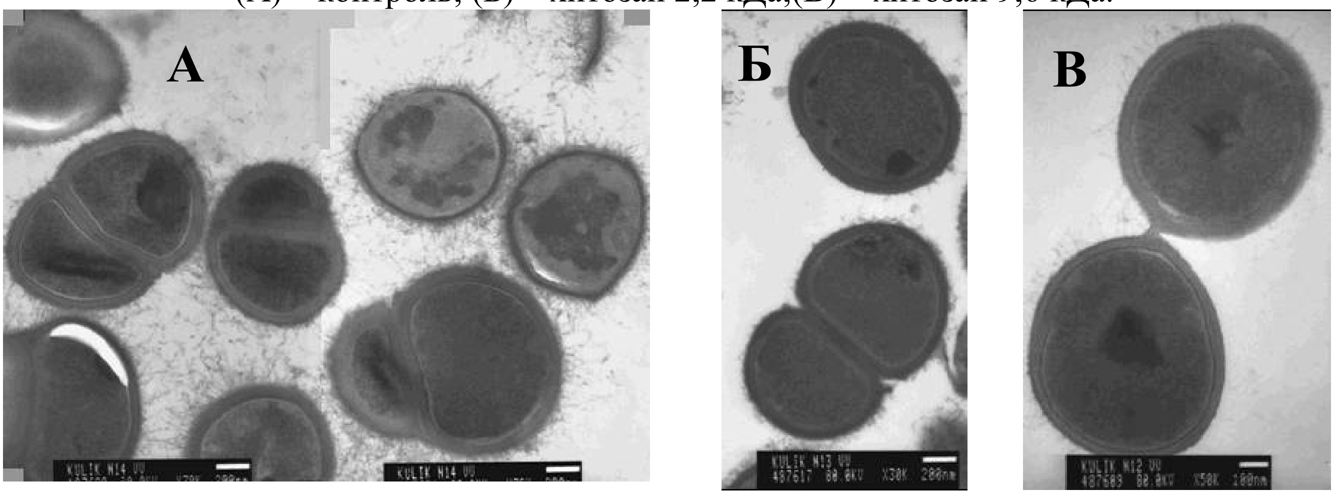

Рис. 5. Влияние хитозана на морфологию *S. epidermidis* при рН 7,75.
(А) – контроль; (Б) – хитозан 2,2 кДа; (В) – хитозан 9,6 кДа.

Существенное изменение в морфологии при действии хитозанового полимера отмечено и у грамотрицательных прокариот. Ультраструктурное исследование клеток *E.coli*, подверженных воздействию хитозанов, показало, что образцы с молекулярной массой 2,2 и 9,6 кДа вызывают уменьшение длины клеток кишечной палочки (рис. 6). Внешняя мембрана частично теряет свою целостность и приобретает прерывистый вид, а количество цитоплазматического содержимого уменьшается, в результате чего образуются обширные вакуолеобразные области.

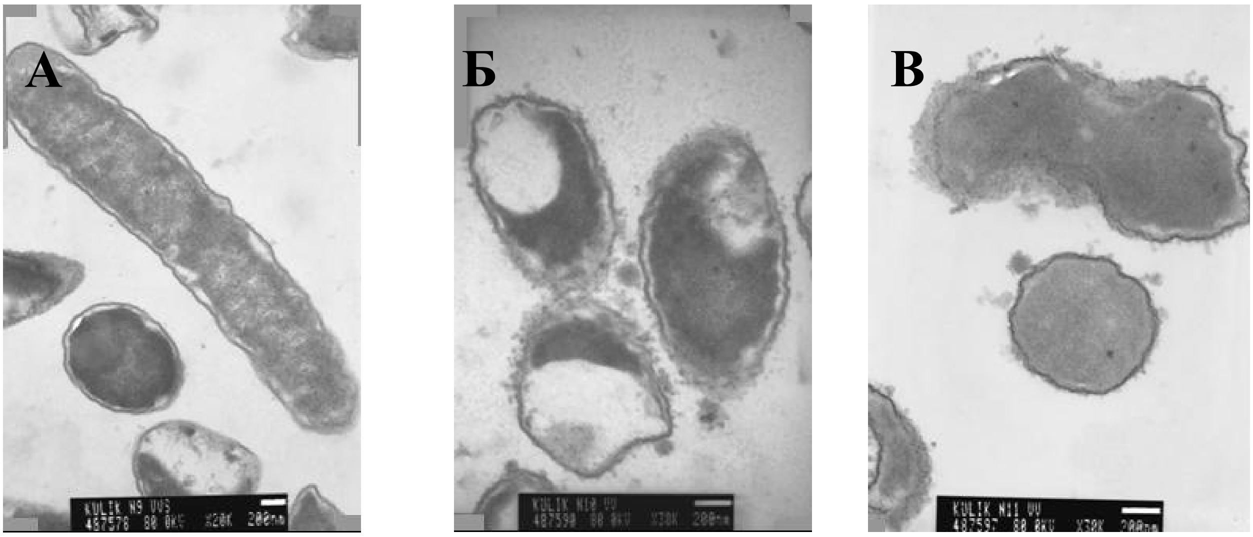

Рис. 6. Влияние хитозана на морфологию *E. coli* при pH 6,25.
(А) – контроль,(Б) – хитозан 2,2 кДа, (В) – хитозан 9,6 кДа

2.3. Оценка влияния хитозана на проницаемость цитоплазматической мембраны

Олигомерные и низкомолекулярные хитозаны вызывают выход β-галактозидазы из клеток *E. coli* (Рис. 7). Выход фермента зависит как от молекулярной массы полимера, так и от его концентрации.

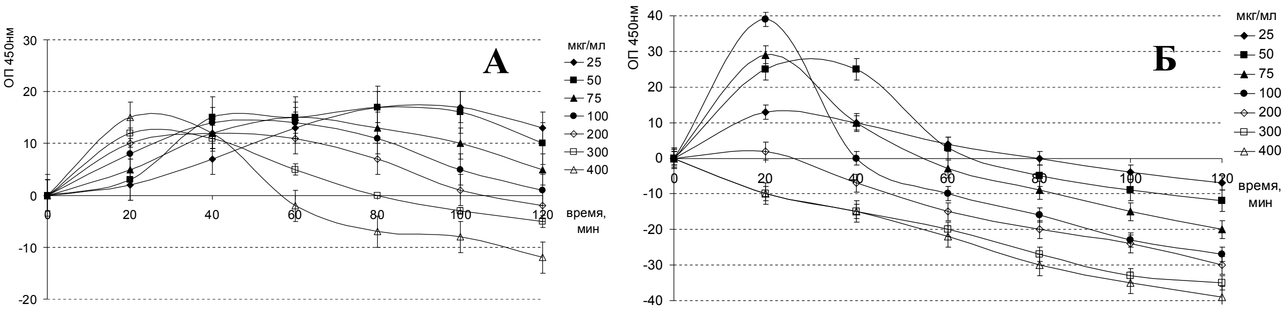

Рис. 7. Выход β-галактозидазы из клеток *E. coli* в присутствии хитозана с молекулярной массой 0,7 (А) и 15,0 (Б) кДа.

Полученные данные подтверждают сведения других авторов о том, что хитозановый полимер усиливает проницаемость мембранных структур для внутриклеточных компонентов. Вместе с тем, увеличение концентрации хитозана, особенно обладающих большей молекулярной массой, приводит к уменьшению образования о-нитрофенола. Такой эффект может являться следствием образования непроницаемой хитозановой плёнки на поверхности клеток, препятствующей выходу внутриклеточных компонентов наружу.

2.4. Оценка активации олигохитозанами лизостафина

Было установлено, что лизостафин эффективно лизирует клетки золотистого стафилококка, что можно установить по падению оптической плотности суспензии. Благодаря предварительной термической инактивации бактериальных клеток также обеспечивалась и инактивация собственных автолитических ферментов бактерий, содержащихся в клеточной стенке, что позволяет сделать вывод о том, что в лизисе клеточных стенок участвуют только вносимые вновь ферменты.

Как видно из табл. 2, добавление в реакционную смесь хитозана усиливало литическую активность лизостафина.

Таблица 2. Влияние хитозана на литическую активность лизостафина

M_w хитозана, кДа	Хитозан, мкг/мл			МИК, мкг/мл
	Активация	Максимальная активация	Ингибирование	
0,72	3,10	12,5 (26)*	50,0	≥2000
1,5	1,50	6,2 (43)	25,0	≥2000
2,0	0,39	3,1 (59)	12,5	1000
2,2	0,39	3,1 (75)	12,5	1000
3,5	0,19	0,78 (76)	12,5	500
4,2	0,19	0,78 (71)	12,5	500
5,5	0,19	1,5 (80)	12,5	500
8,3	0,19	3,1 (80)	12,5	250
9,6	0,39	3,1 (70)	12,5	250
12,7	0,39	3,1 (61)	6,2	250
15,0	0,39	3,1 (54)	6,2	250
19,9	0,78	3,1 (53)	6,2	250

* в скобках указана величина условных единиц активности лизостафина индуцированных хитозаном

Это может быть связано с тем, что в отсутствии хитозана литическому действию лизостафина препятствует находящиеся в клеточных стенках тейхоевые кислоты, которые за счёт электростатического взаимодействия и притяжения противоположно заряженных молекул связывают часть находящейся в реакционной смеси лизостафина. Добавление в эту смесь дополнительного поликатиона может способствовать образованию между тейхоевыми кислотами и хитозаном полиэлектролитного комплекса, который будет не способен связывать фермент и тем самым способствовать его вовлечению в деградацию гликопептида. Представляется возможным, что подобным образом хитозан может высвобождать автолизины из их комплекса с тейхоевыми кислотами и у живых клеток, тем самым способствуя лизису клеточной стенки у бактерий, а также рассмотреть данное явление как один из возможных механизмов антибактериального действия данного полимера.

Усиление литического действия зависит от молекулярной массы полимера (табл. 2). По мере увеличения молекулярной массы хитозана его вклад в усиление литического действия лизостафина возрастал (примерно до 5,5 кДа) и сохранялся на высоком уровне для образцов в пределах 10 кДа. Установлено, что образцы с более высокой молекулярной массой являются менее активными в усилении действия лизостафина.

Образцы с молекулярной массой от 3,5 до 8,3 кДа требуют наименьшей концентрации полимера для проявления активирующего эффекта в данных условиях – 0,19 мкг/мл, что соответствует от $5{,}4\times10^{-8}$ до $2{,}2\times10^{-8}$ М, соответственно. С ростом концентрации активирующий эффект хитозанов усиливался. Разница между различными образцами хитозана в способности усиливать литическое действие лизостафина достигала пятнадцатикратной величины, кроме того, отмечалась существенная (двух-трёхкратная) разница и в достигаемых максимальных значениях условных единиц активности.

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что возможный механизм антибактериального действия хитозана, основанный на высвобождении автолизинов (усилении литического действия лизостафина), в наиболее полной мере характерен для небольших молекул хитозанового полимера, которые сравнительно хорошо проникают во внутренние структуры клеточных стенок. Кроме того, для трёх образцов (от 12,7 до 19,9 кДа) характерен наиболее узкий диапазон концентраций, при которых они обеспечивают усиление литического эффекта лизостафина – от 7,9 до 15 кратной разницы. Для сравнения, у образца 0,7 кДа эта разница составляет более 16, а для самых эффективных – до 65 раз (для 3,5-8,3 кДа). Вероятно, образцы с достаточно высокой степенью полимеризации остаются в основном на поверхности клеточных стенок бактерий и довольно быстро при увеличении концентрации насыщают все доступные внешние эпитопы связывания.

Таким образом, показана способность хитозана усиливать литическую эффективность лизостафина, которая зависит от молекулярной массы поликатиона. Обнаружение данного эффекта позволяет сделать обоснованное предположение об одном из механизмов антибактериального действия хитозана, которое заключается в усилении деградации клеточной стенки бактерии собственными автолизинами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что возможностью активировать автолизины будут в большей степени обладать хитозаны с невысокой степенью полимеризации, обладающие повышенной проникающей способностью.

2.5. Антибактериальные свойства ацильных производных хитозана

В ходе проведенных исследований установлено, что антибактериальные свойства хитозана меняются в зависимости от структуры и количества вводимых ацильных остатков (табл. 3).

Введение ацильного остатка (С-2) практически не оказывает влияния на ингибирующую активность хитозана, поэтому можно сделать вывод о том, что 10 % ацетилирования практически не снижают активность хитозана за счёт уменьшения свободных аминогрупп, но повышает её вследствие малого размера (малой гидрофобности, способности внедриться в какие-либо гидрофобные структуры на поверхности клетки) ацетильного остатка.

Аналогичным образом сказывается на свойствах хитозана и введение ацильного остатка с большей длиной углеводородного конца – С-4. Однако установлено, что при увеличении степени замещения аминогрупп полимера данным видом ацильного производного до 12 % и, в особенности, до 27 % антибактериальная активность производных резко снижается. Вероятно, это связано с ухудшением растворимости подобных форм хитозана и отсутствием в составе их молекул достаточного количества свободных аминогрупп для проявления значительного биологического эффекта.

Таблица 3. Влияние ацильных остатков на МИК хитозана

Виды бактерий	Образцы хитозанов								
	С-2 1%	С-2 10%	С-4 8%	С-4 12%	С-4 27%	С-6 8%	С-6 17%	С-6 27%	С-14 8%
Escherichia coli	250	250	250	1000	>2000	250	500	>2000	62
Klebsiella pneumoniae	62	62	62	250	500	125	250	1000	31
Pseudomonas aeruginosa	125	125	125	250	1000	125	250	1000	62
Proteus vulgaris	125	125	125	250	1000	125	250	1000	31
Enterobacter agglomerans	125	125	125	500	1000	125	1000	2000	62
Citrobacter freundii	250	250	250	1000	>2000	250	500	2000	62
Staphylococcus aureus	250	250	250	1000	>2000	250	500	1000	125
Staphylococcus epidermidis	0,9	0,9	0,9	7,8	62	0,9	3,9	62	0,4

Подобная картина была получена и при использовании производных с шестью атомами углерода в присоединённой ацильной группе (табл. 3). Единственным производным хитозана, который обладал более низким значением МИК по сравнению с исходным, оказался образец с миристильным остатком (С-14). Введение данного заместителя снижало МИК по отношению к исходному образцу в два раза. При этом необходимо отметить, что подобный эффект наблюдался не только для грамотрицательных микроорганизмов, которые имеют мишень действия для гидрофобных молекул – внешнюю мембрану, но также и для грамположительных стафилококков.

3. Антимикотические свойства олигохитозанов

Как и в случае с бактериями, антимикотическая активность хитозана в отношении дрожжеподобных грибов в значительной степени зависит от молекулярной массы полимера. Заметным уровнем антимикотической активности обладали образцы только с молекулярной массой более 2 кДа, достигая максимума при значении молекулярной массы более 5 кДа (рис. 8). Таким образом, для эффективного действия хитозановых препаратов целесообразно получать образцы, содержащие в своём составе молекулы полимера с молекулярной массой не менее 5 кДа.

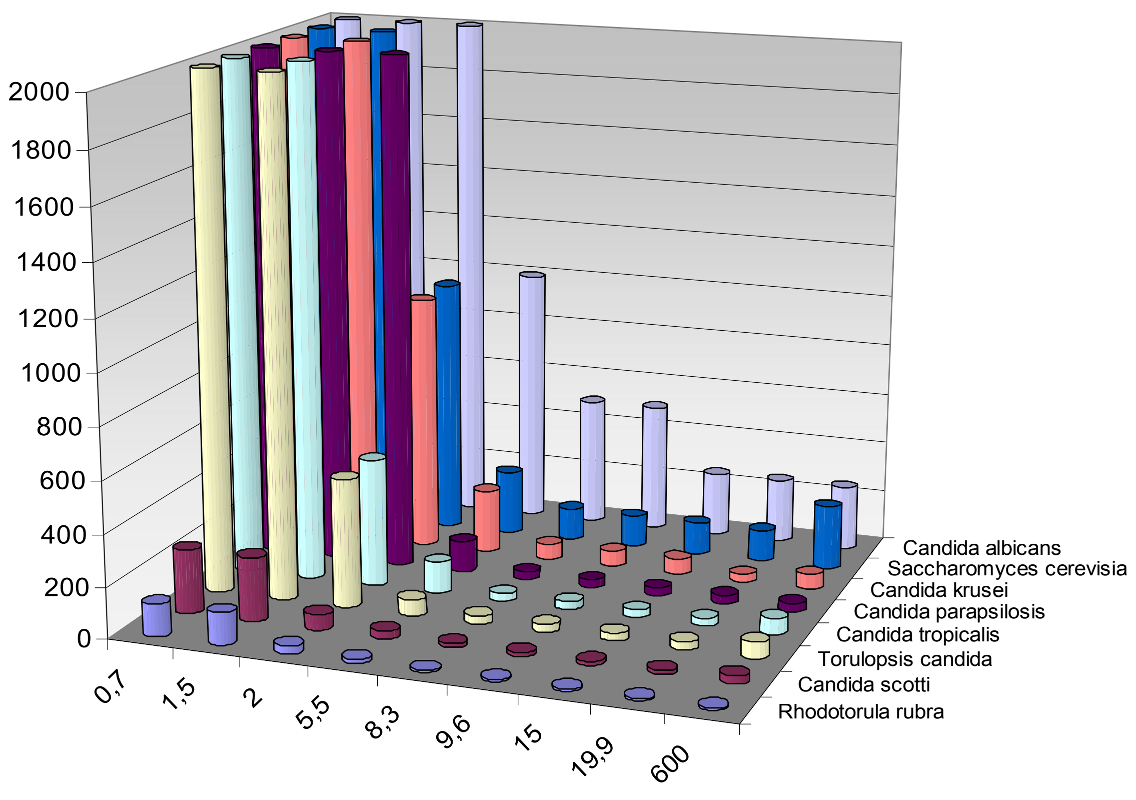

Рис. 8. Влияние молекулярной массы на МИК хитозанов в отношении грибов (pH 5,5)

Установлено, что различные виды дрожжеподобных грибов, обладают различной чувствительностью к действию хитозанов (табл. 3). Наиболее чувствительными оказались *C. scotti* и *R. rubra*, тогда как наибольшую устойчивость проявляют *C. albicans* и *S. cerevisiae*.

Показано, что антимикотическая активность хитозана зависит от его молекулярной массы. При увеличении молекулярной массы антигрибная активность образцов увеличивается. Олигомеры с молекулярной массой 0,7 и 1,5 кДа одинаково малоэффективны и не отличаются друг от друга по значениям МИК. Усиление фунгицидной активности хитозана было отмечено для образца с молекулярной массой равной 2 кДа. При дальнейшем увеличении молекулярной массы возрастает и антимикотическая активность образцов. При достижении значения 8,3 кДа активность хитозана достигает своего максимума, поскольку дальнейшее увеличение молекулярной массы не приводит к уменьшению значения МИК.

3.1. Влияние хитозана на гифообразование *C. albicans*

В ходе проведенных исследований установлено, что хитозан в субингибирующих концентрациях предотвращает образование гиф у *C. albicans*. Для оценки образования мицелиальных структур грибом *C. albicans* использован ряд олигохитозанов с различной молекулярной массой. Как видно из табл. 4 в вариантах опыта с субингибирующими концентрациями образцов хитозана отмечено уменьшение образования псевдогиф. Образование мицелиальных структур клетками дрожжеподобного гриба имеет чёткую зависимость как от концентрации, так и от молекулярной массы поликатиона.

Таблица 4. Влияние концентрации хитозана на образование псевдогиф (%)

Концентрация хитозана	M_w хитозанов, кДа								
	0,7	1,5	2,0	5,5	8,3	9,6	15,0	19,9	600
1/2 МИК	55	50	35	0	0	0	0	0	0
1/4 МИК	100	100	70	10	0	0	0	0	0
1/8 МИК	100	100	100	23	9	0	0	0	32
1/16 МИК	100	100	100	49	25	13	5	6	80
1/32 МИК	100	100	100	77	45	41	35	35	100
1/64 МИК	100	100	100	95	79	80	80	82	100
1/128 МИК	100	100	100	100	100	100	100	100	100
контроль	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Установлено, что хитозан практически любой молекулярной массы в той или иной степени способен ингибировать рост псевдогиф у *C. albicans*. Степень такого ингибирования находится в чёткой зависимости от значений его молекулярной массы и концентрации. Образцы хитозанового полимера с молекулярной массой 5 кДа и более способны полностью предотвращать образование мицелиальных структур грибом. Наиболее выраженный эффект обнаружен у олигохитозанов с молекулярной массой более 10 кДа.

ВЫВОДЫ

1. Определены минимальные ингибирующие и бактерицидные концентрации олигохитозанов в отношении бактерий и микроскопических грибов. Наиболее чувствительными к хитозану являются *Staphylococcus epidermidis* и *Klebsiella pneumoniae* для которых минимальная ингибирующая концентрация составляет соответственно 0,4 и 3,9 мкг/мл. Для большинства исследованных в работе видов энтеробактерий минимальная ингибирующая концентрация составляет 125 мкг/мл. Самым устойчивым к действию хитозана оказался *Staphylococcus aureus* с минимальной ингибирующей концентрацией 250 мкг/мл.

2. Показано, что в характере изменения антибактериальных свойств хитозанового полимера важную роль играет показатель pK_a. Впервые был обнаружен эффект инверсии зависимости ингибирующей активности хитозана от его молекулярной массы при изменении pH среды. Установлено, что образцы хитозана с молекулярной массой более 5,5 кДа, растворимые только в кислой среде, обладают антибактериальным действием только в кислых условиях. Образцы хитозана с молекулярной массой от 2,5 до 5,5 кДа, растворимые в нейтральных условиях, обладают меньшей антибактериальной активностью по сравнению с более высокомолекулярными образцами в кислых условиях, однако, характеризуются наличием антибактериального действия в нейтральных и слабощелочных условиях.

3. Проведено исследование антибактериальных и антимикотических свойств ацилированных производных олигохитозанов. Установлено, что внесение в молекулу поликатиона ацильного остатка со степенью замещения 6-12%, усиливает антибактериальные свойства полимера, а наибольшим биоцидным действием обладает миристил-производное хитозана.

4. Выявлены, в том числе и на ультраструктурном уровне, существенные морфологические изменения клеток микроорганизмов при действии олигохитозанов. Так у грамотрицательных бактерий внешняя мембрана частично теряет свою целостность и приобретает прерывистый вид, а количество цитоплазматического содержимого уменьшается, в результате чего образуются обширные вакуолеобразные области. У грамотрицательных бактерий происходит утончение клеточной стенки с нарушением симметрии при формировании межклеточной перегородки во время деления. Также показано, что присутствие олигохитозанов приводит к ингибированию образования мицелиальных структур у *Candida albicans*.

5. Впервые показано активирующее действие хитозана на лизис клеточных стенок бактерий ферментом – лизостафином. Это, а также отмеченное при ультраструктурном исследовании утончение клеточных стенок у стафилококков, позволяет предположить механизм антибактериального действия поликатиона, заключающийся в вытеснении поликатионом бактериальных автолизинов из их комплекса с тейхоевыми кислотами и вовлечением их в деградацию пептидогликана клеточной стенки.

Публикации по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Куликов, С.Н. Антибактериальная активность хитозана в отношении энтеробактерий и стафилококков, выделенных у пациентов с дисбактериозом кишечника / С.Н. Куликов, **Р.З.Хайруллин**, Ю.А. Тюрин // Казанский Медицинский Журнал. –2010. –№5. –С.656-660. (перечень ВАК), автора –0,10 п.л.

2. Куликов, С.Н. Получение низкомолекулярных хитозанов и их ацильных производных и исследование их антибактериальных свойств / С.Н.Куликов, **Р.З.Хайруллин**, Е.А.Степнова, В.Е.Тихонов, А.В.Ильина, С.А.Лопатин, В.П. Варламов // Бутлеровские сообщения. –2010. –т.20, –№6. –С.59-64. (перечень ВАК), автора – 0,05 п.л.

3. Хайруллин, Р.З. Зависимость растворимости хитозана от молекулярной массы и значения pH среды / Р.З. Хайруллин, С.Н.Куликов, В.Е.Тихонов, Е.А.Степанов, С.А.Лопатин, В.П.Варламов // Вестник Казанского технологического университета. −2010. −№7. −С.148-152. (перечень ВАК), автора − 0,10 п.л.

4. Куликов, С.Н. Фунгицидная активность хитозана в отношении мицелиальных грибов / С.Н. Куликов, **Р.З.Хайруллин**, Ю.А.Тюрин, С.А.Лисовская, Н.И.Глушко, А.Н.Левов, В.П.Варламов // Практическая Медицина. –2010. –№1(40). –С.119-120. (перечень ВАК), автора – 0,03 п.л.

5. Куликов, С.Н. Антимикотическая активность хитозана с различной молекулярной массой и его влияние на морфологию клеток дрожжеподобных грибов/ С.Н.Куликов, **Р.З.Хайруллин**, С.А.Лисовская, Н.И.Глушко, В.Е.Тихонов, Е.А.Степнова, С.А.Лопатин, В.П.Варламов // Проблемы Медицинской Микологии. –2010. –т.12, №2, –С.32-35. (перечень ВАК), автора – 0,05 п.л.

6. Куликов, С.Н. Роль структуры в биологической активности хитозана / С.Н.Куликов, Ю.А.Тюрин, Д.А.Долбин, **Р.З.Хайруллин** // Вестник Казанского технологического университета. –2007. –№ 6. –С.10-14. (перечень ВАК), автора – 0,10 п.л.

Другие публикации по теме диссертации:

7. Kulikov, S. Molecular weight and pH aspects of efficacy of oligochitosan against methicillin-resistant S*taphylococcus aureus* (MRSA) / S.Kulikov, V.Tikhonov, I.Blagodatskikh, E.Bezrodnykh, S.Lopatin, **R.Khairullin**, Y.Philippova, S.Abramchuk // Carbohydrate Polymers. –2012. -№87. –P.545-550. автора – 0,10 п.л.

8. Куликов С.Н. Способ экспресс-определения антибактериального потенциала хитозана в отношении стафилококков / С.Н.Куликов, **Р.З.Хайруллин**, Ю.А.Филиппова, Д.Р.Шакирова, Р.С.Фассахов // Заявка на изобретение № 2012105889 от 17.02.2012. Решение о выдаче патента от 23.11.2012.

9. Хайруллин, Р.З. Олигохитозан – новое антибактериальное средство / Р.З.Хайруллин, Ю.А.Филиппова, Д.Р.Шакирова, С.Н Куликов. // Материалы X съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемического благополучия населения российской Федерации». –Москва, 2012. (Инфекция и иммунитет. –2012. –Т.2. –№1-2. –С.335-336).

10. Хайруллин, Р.З. Оценка антибактериального действия олигомерных форм хитозана в отношении *Klebsiella pneumoniae* / Р.З.Хайруллин, С.Н.Куликов, Р.С.Фассахов, Е.А.Безродных, В.Е. Тихонов // Материалы IV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. –Москва, 2012. (Инфекционные болезни. –2012. –т.10. Приложение №1). –С.406.

11. Хайруллин, Р.З. Бактерицидная активность олигомерных форм хитозана в отношении *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* / **Р.З.Хайруллин**,

С.Н. Куликов // Материалы Межрегиональной научно-практической конференции “Инфекционные болезни взрослых и детей. Актуальные вопросы диагностики, лечения и профилактики». –Казань, 2011. –С.99-100.

12. Kulikov, S. Antibacterial activity of oligochitosan against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): molecular weight and pH effects / S. Kulikov, E.Bezrodnykh, **R**.**Khairullin**, Yu.Philippova, S.Lopatin, I.Yamskov, V.Tikhonov // The 10-th International Conference of the European Chitin Society (Advances in Chitin Science, Vol. XI, Ed. V.Varlamov, S.Bratskaya, I.Yakovleva, S.Senel). –2011. –P.276-281.

13. Куликов, С.Н. Антибактериальная активность узкодисперсных хитозанов с различной молекулярной массой / С.Н. Куликов, **Р.З**.**Хайруллин**, Ю.А.Филиппова, Е.А.Степнова, В.Е.Тихонов, С.А.Лопатин, В.П.Варламов // Материалы 10-ой международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». –Нижний Новгород, 2010. –С.208-212.

14. Куликов, С.Н. Антимикотическая активность низкомолекулярного хитозана и его влияние на морфологию клеток *Candida albicans* / С.Н.Куликов, **Р.З**.**Хайруллин**, Д.Р.Шакирова, Е.А.Степнова, В.Е.Тихонов, С.А.Лопатин, В.П. Варламов // Материалы 10-ой международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». –Нижний Новгород, 2010. –С.213-217.

15. Хайруллин, Р.З. Роль кислотности среды в растворимости хитозанов с различной молекулярной массой / Р.З. Хайруллин, С.Н. Куликов, В.Е. Тихонов, Е.А.Степнова, С.А.Лопатин, В.П.Варламов // Материалы 10-ой международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». –Нижний Новгород, 2010. –С.144-147.

16. Хайруллин Р.З. Биоцидные свойства хитозана в пищевой биотехнологии. / Р.З.Хайруллин, С.Н.Куликов // Материалы XI Международной конференции молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии». –Казань, 2010. –ч.1. –С.221.

E-mail автора: *khairullinrz@gmail.com*

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание К(П)ФУ, к 104В, отдел аттестации научно-педагогических кадров, ученому секретарю диссертационного совета Д 212.081.08 д.б.н., проф. Абрамовой З.И., факс: (843)238-76-01. E-mail: *ziabramova@mail.ru*