

УДК 615.281:615.37:615.32:577.114

Л.А. Иванушко<sup>1</sup>, Т.Ф. Соловьева<sup>2</sup>, Т.С. Запорожец<sup>1</sup>, Л.М. Сомова<sup>1</sup>, В.И. Горбач<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1), <sup>2</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)

## АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ И АНТИТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

*Ключевые слова:* хитозан, антибактериальная активность, эндотоксемия, электронная микроскопия.

Исследованы антибактериальные и антитоксические свойства хитозана и его производных (хитозан низкой молекулярной массы, ацилированный хитозан, хитоолигосахариды, карбоксипропилхитозан), полученные при химической или ферментативной деградации исходного продукта. Показано, что низкомолекулярные ацилированный и дезацетилованный хитозаны, лучше растворяющиеся в нейтральных и щелочных растворах и лучше всасывающиеся из желудочно-кишечного тракта, обладают более выраженной антимикробной и антитоксической активностью по сравнению с исходным высокомолекулярным хитозаном.

На фоне снижения эффективности традиционных методов терапии и роста лекарственной устойчивости заболеваний особо актуальны поиск и разработка новых препаратов для регуляции нарушенных функций иммунной системы. Полианионы и поликатионы, благодаря способности к многоточечному кооперативному взаимодействию с иммунокомпетентными клетками, могут обеспечить модуляцию различных звеньев иммунной системы. В связи с этим поликатионные и полианионные полисахариды, широко представленные в морских водорослях и ракообразных, могут рассматриваться как потенциальные иммуномодуляторы.

Одним из представителей природных поликатионов является хитозан – линейный полисахарид, полимерная цепь которого состоит из β-1,4-связанных остатков D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина.

Хитозан – нетоксичный, биоразрушаемый, биосовместимый полисахарид, обладающий широким спектром биологической активности, включая антимикробную [11, 14]. Известно, что способность подавлять рост патогенных микроорганизмов свойственна веществам, нейтрализующим эндотоксины [2, 10]. Однако механизмы воздействия высокомолекулярного хитозана и его производных на микробные клетки изучены недостаточно.

Целью настоящей работы явился анализ ультраструктурных изменений патогенных штаммов *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* под воздействием хитозана и его производных, а также их способности защищать от гибели мышей при эндотоксиновом шоке, индуцированном липополисахаридом (ЛПС) *Escherichia coli*.

**Материалы и методы.** Для получения хитозана использовали коммерческий хитин. Снятие N-аце-

татных групп с его молекул проводили методом N-дезацетилирования с использованием в качестве реагента смеси водной щелочи (40%) и изопропилового спирта (1/16 v/v). В результате с выходом 75% получали высокомолекулярный хитозан с низкой степенью N-ацетилирования. Депенерализацией хитозана с помощью перекиси водорода были получены хитоолигосахариды (биоаза, триоаза, тетраоаза), а также хитозаны низкой молекулярной массы (4–20 кДа), имеющие значительно лучшую растворимость в водных растворах при физиологических значениях водородного показателя в сравнении с исходным соединением.

Хитоолигосахариды и хитозан с низкой молекулярной массой были N-ацилированы при использовании смеси растворителей вода-N,N-диметилформамида и N-гидроксисукцинимидного эфира 3-гидрокситетра-декановой кислоты. В результате были получены производные, которые по данным химического анализа, <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии и MALDI-TOF- масс-спектрометрии содержали один остаток 3-гидрокситетрадекановой кислоты (3-OH-C<sub>14</sub>) на восстанавливаемом конце молекулы и имели общую формулу (GlcNH)–3–OH–C<sub>14</sub>.

Алкилированием хитозана в щелочной среде омега-галогенпроизводными уксусной, пропионовой и бутановой кислот были синтезированы N- и 6-O-карбоксилалкил (метил, этил, пропил)-хитозаны. Эти цвиттерийные производные отличаются от исходного хитозана зарядом и хорошей растворимостью в воде при нейтральной и щелочной реакции.

Эксперименты выполнены на 600 неинбредных мышках-самцах массой 16–18 г, находившихся на стандартной диете в боксированных помещениях с соблюдением всех правил и рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах. Эндотоксический шок индуцировали внутрибрюшинным введением бактериального ЛПС L2880 *E. coli* серотипа 055:B5 (Sigma, USA) в дозах 1 и 10 мкг на особь. С целью повышения чувствительности к ЛПС мышам предварительно вводили внутрибрюшинно D-галактозамин в дозе 800 мг/кг [13]. Хитозаны (высокомолекулярный – 140 кДа и низкомолекулярный – 20 кДа, а также низкомолекулярный ацилхитозан) вводили внутримышечно в дозе 100 мкг на особь в различные сроки относительно введения разрешающей дозы ЛПС. В каждой группе было по 10 мышей, эксперимент повторяли трижды, средние показатели

Иванушко Людмила Александровна – канд. мед. наук, с.н.с. лаборатории иммунологии НИИЭМ СО РАМН; тел.: 8 (4232) 44-24-46; e-mail: liva\_57@mail.ru.

выживаемости определяли суммарно как результат всех серий экспериментов.

Бактериостатическую активность препаратов определяли дискодиффузионным методом [6]. Бактерии выращивали в течение 24 часов при 37°C на питательном агаре на основе панкреатического гидролизата кильки производства НПО «Питательные среды» (г. Махачкала).

Исследуемые вещества в концентрации 100 и 500 мкг/мл наносились на субстрат-квадраты фильтровальной бумаги размером 1x1 см, которые помещались в чашки Петри с предварительно выращенными в течение 1 часа на питательном агаре бактериями *S. typhimurium* (штамм 415) и *S. aureus* (штамм 906). В качестве контроля использовали бактерии, на которые наносили фильтровальную бумагу, пропитанную 0,85% раствором NaCl. Результаты бактериостатической активности веществ оценивали по интенсивности роста культур вокруг субстрат-квадратов. Эксперимент проводили трижды.

Для электронно-микроскопического исследования после инкубации бактерий, выращенных на мясопептонном агаре в присутствии исследуемых веществ, субстрат-квадрат промывали в фиксаторе по Ито [12]. Проводили дофиксацию бактерий 2% раствором четырехоксида осмия, дегидратацию в этаноле возрастающей концентрации и заключали в эпон-аралдит. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, затем просматривали в электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Japan) при ускоряющем напряжении 80 мВ.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 5 и Excel. Использовали непараметрический критерий Вилкоксона [4].

**Результаты исследования.** В предварительных исследованиях было установлено бактериостатическое действие хитозана и его производных, наиболее выраженное при использовании низкомолекулярного хитозана и ацилхитозана. Затем была исследована ультраструктура *S. typhimurium* и *S. aureus*, в отношении которых проявили бактериостатическое действие низкомолекулярный хитозан и ацилхитозан.

При изучении контрольных культур *S. aureus* была обнаружена типичная ультраструктурная организация: микроорганизмы имели кокковидную форму, характерную утолщенную трехслойную клеточную стенку. При увеличении  $\times 10\,000$  в поле зрения регистрировалось до 8 бактерий, находившихся в стадии деления (рис. 1, а). Под воздействием низкомолекулярного хитозана появились кокковидные формы микроорганизмов, большинство из которых имели электронно-плотный агломерат в зоне нуклеоида. Клеточная стенка бактерий плохо контурировалась, по сравнению с исходной культурой. В цитоплазме были видны мелкие очажки просветления раз-

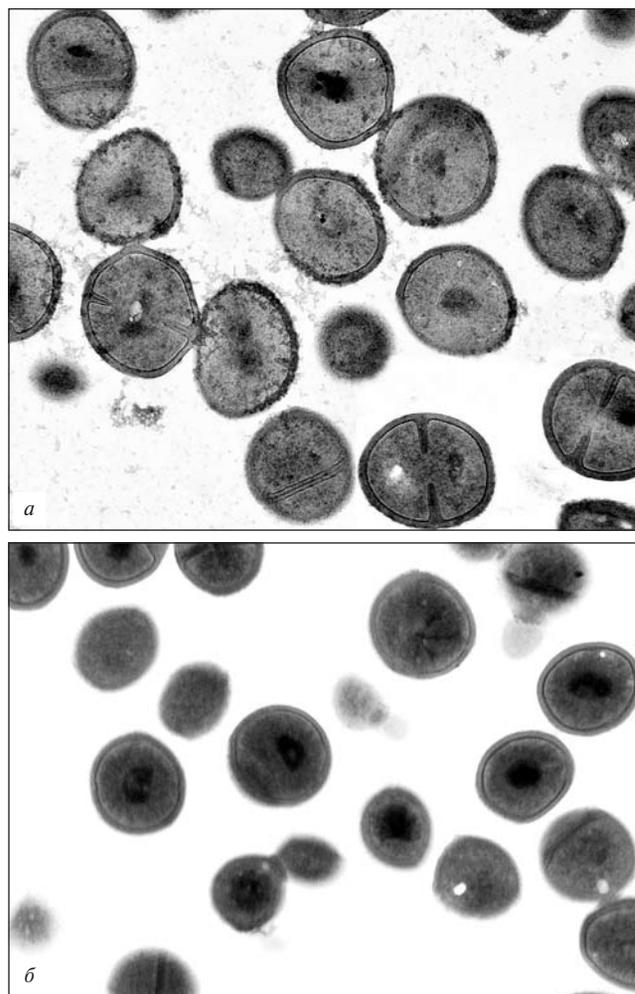


Рис. 1. Культуры *S. aureus*.

а – контрольная культура, 24 часа инкубации; б – после воздействия хитозана низкомолекулярного: мелкоочаговый лизис, повышение электронной плотности и частичная гомогенизация цитоплазмы, клеточная стенка бактерий плохо контурирована. Электронная микроскопия,  $\times 10\,000$ .

мером 0,25 нм овальной формы, похожие на зоны мелкоочагового лизиса, наблюдалось повышение электронной плотности и частичная гомогенизация цитоплазмы, из-за чего рибосомы просматривались лишь в периферической зоне клетки. В поле зрения встречалось не более трех делящихся бактериальных клеток, что указывало на снижение репродуктивной способности стафилококков после контакта с указанным веществом (рис. 1, б). Это подтверждалось уменьшением количества делящихся форм, повышением электронной плотности цитоплазмы, появлением в зоне нуклеоида электронно-плотного материала (агломерата), смазанность клеточной стенки. Подобные изменения характерны для покоящихся бактерий [1, 3, 5].

Таким образом, данные микробиологического тестирования и электронно-микроскопическая картина образцов *S. aureus* свидетельствовали о выраженном бактериостатическом действии низкомолекулярного хитозана.

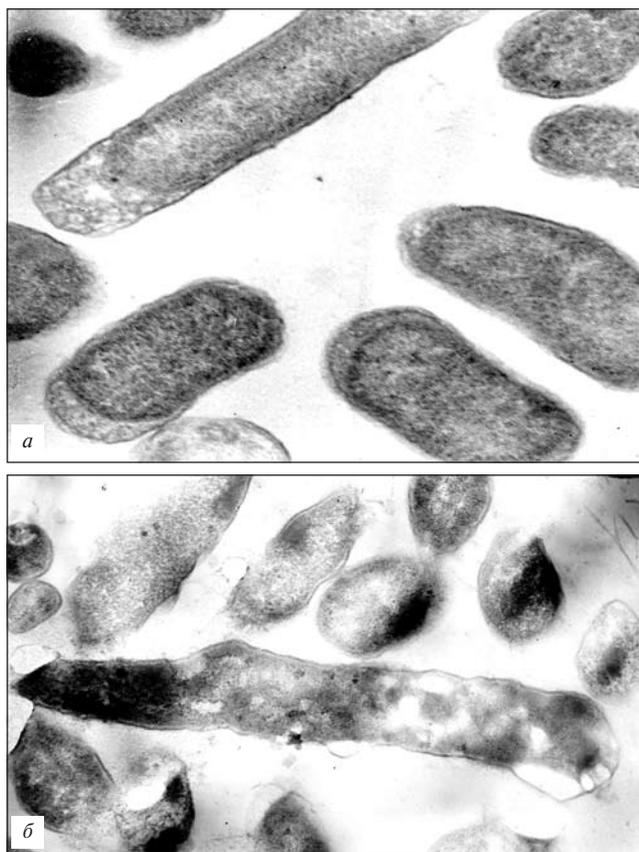


Рис. 2. Культуры *S. typhimurium*.

а – контрольная культура, 24 часа инкубации; б) после воздействия ацилхитозана: очаговый и крупноочаговый лизис цитоплазмы. Электронная микроскопия,  $\times 10\,000$ .

Бактерии контрольных культур *S. typhimurium* имели типичную ультраструктуру, у части клеток обнаруживалось расширение периплазматического пространства на полюсах с наличием в нем аморфного вещества – экскреция вторичных метаболитов (рис. 2, а). Через 24 часа инкубации с ацилхитозаном происходили отчетливые изменения ультраструктуры бактерий, однако лизированные формы не обнаруживались. Наблюдался полиморфизм размеров бактерий, среди которых встречались как овоидные, так и удлиненные палочковидные формы. В последних можно было различить начальные признаки формирования перегородок, но типичного бинарного деления не отмечено, что указывало на резкое торможение процесса размножения сальмонелл. Клеточная стенка на значительных участках имела нечеткое строение и была отслоена от цитоплазматической мембраны.

В большинстве микроорганизмов зона нуклеоида слабо визуализировалась, цитоплазма имела пестрый рисунок за счет неравномерного распределения рибосом. Во многих клетках наблюдался очаговый лизис с образованием овальных зон просветления цитоплазмы, а в отдельных клетках – крупноочаговый лизис.

В части бактериальных клеток имелись электронно-плотные агломераты, встречались также клетки без морфологически выраженного нуклеоида, в которых наблюдалось образование подобных агломератов, расположенных по периферии цитоплазмы (рис. 2, б).

Таким образом, результаты электронно-микроскопических исследований свидетельствуют о глубоких повреждениях структурно-функциональных комплексов *S. typhimurium*, вызванных выраженным бактериостатическим действием ацилхитозана. Как было отмечено ранее [2, 10], способность подавлять рост патогенных микроорганизмов свойственна веществам, способным нейтрализовать эндотоксины. В связи с этим в следующей серии экспериментов нами была изучена влияние хитозана и его наиболее активных производных на выживаемость мышей при эндотоксиновом шоке.

Установлено, что высокомолекулярный хитозан при однократном парентеральном введении не оказывал протективного действия независимо от времени введения относительно липополисахарида. В то же время низкомолекулярный дезацетилированный хитозан статистически значимо повышал устойчивость организма животных к воздействию липополисахарида как при одновременном введении, так и при введении через 2 часа после воздействия эндотоксина. Низкомолекулярный ацилхитозан значимо увеличивал выживаемость мышей при профилактическом и при лечебном применении (табл.).

**Обсуждение полученных данных.** Таким образом, производные хитозана (хитозан низкомолекулярный и ацилхитозан) продемонстрировали высокую антимикробную активность в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. Антимикробные свойства хитозанов зависели от молекулярной массы и степени ацилирования и могли быть обусловлены уникальной способностью

Таблица

Влияние производных хитозана на выживаемость мышей при эндотоксиновом шоке, индуцированном бактериальным ЛПС,  $M \pm m$

Время введения		Выживаемость при введении <sup>1</sup> , %		
		ХВ	ХН	АХ
ЛПС – 1 мкг на особь	за 2 часа	0 <sup>2</sup>	0 <sup>2</sup>	56,7±0,1 <sup>2</sup>
	одновременно	20,0±5,8	56,7±0,1 <sup>2</sup>	60,0±11,6 <sup>2</sup>
	через 2 часа	0 <sup>2</sup>	76,7±6,7 <sup>2</sup>	76,7±3,3 <sup>2</sup>
	контроль	16,7±3,3		
ЛПС – 10 мкг на особь	за 2 часа	0 <sup>2</sup>	0 <sup>2</sup>	60,0±5,8 <sup>2</sup>
	одновременно	0 <sup>2</sup>	40,0±5,8 <sup>2</sup>	36,7±8,8
	через 2 часа	6,7±3,3	40,0±5,8 <sup>2</sup>	36,7±6,7 <sup>2</sup>
	контроль	0		

<sup>1</sup> ХВ – хитозан высокомолекулярный, ХН – хитозан низкомолекулярный, АХ – ацилхитозан.

<sup>2</sup> Разница с соответствующим контролем статистически значима.

этих соединений неспецифически (за счет электростатических и ионных связей) взаимодействовать с клеточной стенкой микроорганизмов.

Влияние производных хитозана на ультраструктурную организацию *S. typhimurium* и *S. aureus*, относящихся к разным систематическим группам, принципиально одинаково и связано с воздействием на их поверхностные структуры. Повреждение стенки может приводить к нарушению ригидности клеток и процессов деления, вызывая гибель отдельных микроорганизмов и популяции в целом. Нарушения поверхностных структур бактерий вызывают изменение их метаболизма, в частности в отношении сахаров, которые являются основным энергетическим источником для большинства бактерий. В литературе высказывалась гипотеза о конкурентном замещении хитозаном рецепторов к сахарам [9].

Обнаруженные нами нарушения в субмикроскопической организации клеточной стенки и цитоплазматической мембране могут свидетельствовать о деструкции рецепторов или морфологическом проявлении конкурентного замещения хитозаном рецепторов к сахарам. Данные о влиянии хитозана на субмикроскопическую организацию грамположительных и грамотрицательных бактерий свидетельствуют в пользу его бактериостатического действия.

Ранее была показана способность высокомолекулярного и низкомолекулярного хитозанов к образованию водорастворимых комплексов с липополисахаридами, прочность связей в которых зависит от соотношения компонентов и от молекулярной массы хитозана [8]. Так, высокомолекулярный хитозан связывает липополисахариды в точке насыщения меньше и с меньшей аффинностью, чем низкомолекулярный, а введение ацильного заместителя в низкомолекулярное производное хитозана существенно увеличивает его связывающую активность. Это, в свою очередь, приводит к снижению токсических свойств липополисахаридов [7]. Результаты изучения протективных свойств хитозанов при эндотоксиновом шоке соотносятся с ранее полученными данными о связи структуры хитозана с его антитоксическими свойствами.

Таким образом, хитозан и его производные обладают выраженными антимикробными и антитоксическими свойствами. Результаты проведенных исследований позволяют считать, что хитозан и его производные являются перспективными в отношении связывания и детоксикации липополисахаридов и создания на их основе специфических препаратов для терапии сепсиса и эндотоксинового шока.

#### Литература

1. Гинцбург. А.Л., Романова Ю.М. Некультивируемые формы бактерий и их роль в сохранении возбудителей сапрофитов во внешней среде // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1997. № 3. С. 116–121.

2. Давыдова В.Н., Ермак И.М., Горбач В.И. и др. Взаимодействие бактериальных эндотоксинов с хитозаном. Влияние структуры эндотоксина, молекулярной массы хитозана и ионной силы раствора на процессы комплексообразования // Биохимия. 2000. Т. 65, № 9. С. 1278–1287.
3. Демкина Е.В., Соина В.С., Эль-Регистан Г.И. и др. Репродуктивные покоящиеся формы *Arctobacter globiformis* // Микробиология. 2000. Т. 57, № 1. С. 366–372.
4. Лисенков А.Н. Математические методы планирования многофакторных медико-биологических экспериментов. М.: Медицина, 1979. 314 с.
5. Мулюкин А.Л., Луста К.А., Грязнова М.Н. и др. Образование покоящихся форм и автолизующихся суспензий микроорганизмов // Микробиология. 1997. Т. 66, № 1. С. 42–49.
6. Плехова Н.Г., Сомова Л.М. Способ определения биологической активности вещества (варианты). Патент на изобретение РФ № 2270251 от 20.02.2006.
7. Полякова А.М., Кравченко А.В., Ермак И.М. и др. Влияние хитозана на биологические свойства эндотоксинов грамотрицательных бактерий // Бюл. эксп. биол. мед. 1995. № 8. С. 169–172.
8. Соловьева Т.Ф. Хитозаны и каррагинаны – модуляторы эндотоксического действия липополисахаридов и потенциальные препараты для терапии эндотоксемии и эндотоксического шока. Фундаментальные науки – медицине: материалы научной сессии общего собрания ДВО РАН. Владивосток, 2006. С. 52–72.
9. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение / под ред. Х.Г. Скрыбина и др. М., 2002. 368 с.
10. Amiji M.M. Purene fluorescence study of chitosan selfassociation in aqueous solution // Carbohydrate Polymers. 1995. Vol. 26. P. 211–213.
11. Deacon M.P., McGurk S., Roberts C.J. et al. Atomic force microscopy of gastrin mucin and chitosan mucoadhesive systems // Biochem. J. 2000. Vol. 348. P. 557–563.
12. Ito S., Karnovsky M.J. Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitrocompounds. // J. Cell Biol. 1968. Vol. 39. P. 168A.
13. Kelly A. Millera, E.V.K. Suresh Kumarb, Stewart J. Wooda et al. Lipopolysaccharide Sequestrants: Structural Correlates of Activity and Toxicity in Novel Acylhomospermines // J. Med. Chem. 2005. Vol. 48, No. 7. P. 2589–2599.
14. Nishimura K., Nishimura S., Nishi N. et al. Immunological chitosan and its derivatives // Vaccine. 1984. Vol. 2. P. 93–99.

Поступила в редакцию 10.04.2009.

#### ANTIBACTERIAL AND ANTITOXIC PROPERTIES OF CHITOSAN AND ITS DERIVATIVES

L.A. Ivanushko<sup>1</sup>, T.F. Soloviova<sup>2</sup>, T.S. Zaporozhets<sup>1</sup>, L.M. Somova<sup>1</sup>, V.I. Gorbach<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Centre of Epidemiology and Microbiology of the RAMS, Siberian Branch (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), <sup>2</sup> Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159, 100-Anniversary Av. Vladivostok 690022 Russia)

**Summary** – The paper discusses antibacterial and antitoxic properties of chitosan and its derivatives (low molecular weight chitosan, acidified chitosan, chitooligosaccharides, and carboxypropyl chitosan) derived as a result of chemical or enzymatic degradation of the parent substance. As seen, the low molecular weight acidified and deacetylated chitosans that are capable of better dissolving in neutral and alkaline solutions and being better absorbed from the gastro-intestinal tract proved to exhibit more noticeable antibacterial and antitoxic effects, compared to the parent high-molecular chitosan.

**Key words:** chitosan, antibacterial activity, endotoxemia, electron microscopy.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 76–79.