

УДК 615.324: 615.28

ОЦЕНКА ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ БИОПОЛИМЕРОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА, ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ НЕРАСТВОРИМЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ МЕТАЛЛОВ

Алтайский государственный университет, г. Барнаул

Семенихина Н.М., Васько Е.Е., Абрамова К.Е., Кульбакина И.И., Халимов Р.И.

Лекарственная устойчивость является главным вызовом современной медицинской микробиологии и заставляет врачебное сообщество обращать внимание на нетрадиционные или считавшиеся устаревшими способы борьбы с инфекциями. Цель данного исследования – оценить противомикробное действие гелей на основе коллоидного хитозана и золь гидrophосфатов серебра и меди (II) в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжевых грибов. В статье приведены данные о минимальных ингибирующих концентрациях нескольких комбинаций хитозана с гидrophосфатами серебра и меди, а также экспериментальные данные об эффективности препаратов сравнения (гентамицин и амфотерицин В). В данной работе было продемонстрировано синергетическое действие хитозана высокой молекулярной массы и нерастворимых соединений серебра, а также эффективность комбинированной композиции на основе солей меди и хитозана в отношении резистентного штамма дрожжевых грибов. В результате установлено, что исследуемые композиции на основе хитозана и нерастворимых соединений металлов обладают выраженной биологической активностью, что предполагает их потенциальную применимость в качестве противомикробных средств.

Ключевые слова: антибактериальная активность, гидрогели, хитозан, нерастворимые соединения металлов.

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CHITOSAN-BASED BIOPOLYMERS FUNCTIONALIZED BY INSOLUBLE METAL COMPOUNDS

Altai State University, Barnaul

N.M. Semenikhina, E.E. Vas'ko, K.E. Abramova, I.I. Kul'bakina, R.I. Khalimov

Drug resistance is the main challenge of modern medical microbiology and forces the medical community to pay attention to unconventional or considered obsolete ways of dealing with infections. The purpose of this study was to assess the antimicrobial effect of gels based on colloidal chitosan and silver and copper (II) hydrophosphate sols towards gram-positive and gram-negative bacteria, as well as yeast fungi. The article presents data on minimum inhibitory concentrations of several combinations of chitosan with silver and copper hydrophosphates, as well as experimental data on the effectiveness of comparison drugs (gentamycin and amphotericin B). This paper demonstrated the synergistic effect of chitosan of high molecular weight and insoluble silver compounds, as well as the efficiency of a combination composition based on salts of copper and chitosan towards the resistant strain of yeast fungi. As a result, it has been established that the studied compositions based on chitosan and insoluble metal compounds have a pronounced biological activity, which suggests their potential applicability as antimicrobial agents.

Keywords: antibacterial activity, hydrogels, chitosan, insoluble metal compounds.

Несмотря на успехи медицины, при хирургических вмешательствах существует риск развития бактериальных инфекций. Это особенно актуально при трансплантации органов, поскольку использование иммуносупрессоров не только увеличивает риск инфицирования хирургической раны, но и повышает вероятность развития оппортунистических инфекций. В свою очередь, риск развития инфекции влияет на выбор протокола иммуносупрессии [15].

Использование материалов с антибактериальными свойствами является одним из лучших решений данной проблемы. Одним

из таких материалов является хитозан [3]. Хитозан привлек значительный интерес благодаря уникальному сочетанию свойств, таких как биосовместимость, биodeградируемость, антибактериальная активность и способность образовывать комплексные соединения. Существуют возможности для применения хитозана в различных областях, например, биотехнологии [12], фармации [6], косметике [9], пищевой промышленности [4] и очистке сточных вод [14]. Несмотря на наличие антибактериальной активности, хитозан не обеспечивает должной степени подавления роста бактерий, поэтому

для повышения его антибактериальной активности был получен ряд производных хитозана с различными ионами металлов [5, 7, 16].

Ряд исследований указывает, что производные хитозана с различными модификациями в комплексе с ионами металлов проявляют более высокую антибактериальную активность, чем любой компонент, действующий самостоятельно. Наночастицы хитозана и серебра действуют синергически против двух штаммов *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [5]. Madhumathi с коллегами протестировали комплекс из хитина и наночастиц серебра для заживления ран. Данные композиты оказали бактерицидное действие в отношении *S. aureus* и *Escherichia coli* (*E. coli*) и вызвали повышение свертываемости крови [11]. В работе Revathi был успешно синтезирован биокомпозитный материал на основе хитозана и ионов меди, антибактериальная активность которого была протестирована на штаммах *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), *E. coli* и *Klebsiella aerogenes* (*K. aerogenes*) [14]. Также доказана антибактериальная активность высокомолекулярного хитозана в отношении бактерий рода *Proteus* [1]. Каркасы, состоящие из хитозана, с включенным мезопористым силикатом цинка также проявляли антибактериальное действие в отношении золотистого стафилококка (*S. aureus*). Включение силиката цинка в матрицу хитозановых скаффолдов улучшило пористость, скорость деградации и биоминерализацию [8].

Помимо антибактериальной активности изучается также противогрибковая активность хитозана и его способность подавлять образование биопленок патогенными и условно-патогенными грибами, в частности, *Candida parapsilosis* и *Candida krusei*. Было обнаружено, что использование хитозана быстро уменьшало колонизированные грибками области [10]. Результаты других исследований показывают, что эффект выше для нанокompозита медь-серебро-хитозан, который оказал значительное влияние на рост *Candida albicans* в лабораторных условиях по сравнению с другими наночастицами [2].

Комплексы хитозана с ионами металлов демонстрируют ярко выраженное антибактериальное и некоторое противогрибковое действие. Поэтому ученые стремятся разработать и охарактеризовать все новые композитные комплексы.

Цель работы: изучить потенциальную антибактериальную и противогрибковую активность разработанных гидрогелей на основе хитозана и его производных на основе фосфатов серебра и меди (II) в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов.

Материалы и методы

Объектом исследования послужили гидрогели на основе хитозана. В работе использовали хитозан высокого молекулярного веса со степенью деацетилирования 75% (Aldrich, США), сульфат меди (II) пятиводный чда (Sigma, США), нитрат серебра хч (Россия), гидрофосфат натрия хч (Россия) и раствор коллагена 1 типа из хвостов крыс («БиолоТ», Россия). Получение гелей проводили путем смешивания раствора хитозана в 1% уксусной кислоте со свежеприготовленным золем осадка гидрофосфата серебра или меди (II) с концентрацией 0,01 М. После гомогенизации полученные вязкие смеси подвергали деацетилированию 10% раствором гидроксида натрия, что приводило к образованию плотных гелей с постоянной формой. Эмпирическим путем был определен оптимальный диапазон концентраций хитозана для формирования гелей с желаемыми свойствами.

В дальнейших исследованиях биологической активности использовались гели, включавшие 2,5% хитозана, 0,005 М гидрофосфата серебра или меди (II), а также 2,5 мг/мл гидролизата коллагена.

Гидролизат коллагена получали путем ферментативного разрушения коллагена 1 типа из хвостов крыс. Раствор коллагена смешивали с раствором трипсина в соотношении 2:1 и нагревали на водяной бане в течение 30 минут при температуре 50°C. Затем температуру повышали до 100°C и кипятили раствор в течение 15 минут для инактивации трипсина. Итоговая расчетная концентрация аминокислот и олигопептидов в полученном гидролизате составляла 5 мг/мл.

Оценку антибактериальных свойств гидрогелей проводили на первичных культурах микроорганизмов – пекарских дрожжах (*S. cerevisiae*), кишечной палочке (*E. coli*) и сапрофитном стафилококке (*S. aureus*). Данный выбор модельных микроорганизмов обусловлен необходимостью изучения противомикробной активности разработанной композиции в отношении грибов, а также грамположительных и грамотрицательных бактерий. Культуру дрожжей получали путем посева образца кулинарных пекарских дрожжей на бульон Сабуро для селективного выделения грибов. Культуры кишечной палочки и стафилококков получали путем посева на селективные среды – среду Эндо и стафилококковый агар – с последующим пересевом на жидкую среду Мюллера-Хинтона.

В исследовании активности против каждого вида возбудителя использовали шесть образцов гелей: Гр I – хитозан; Гр II – хитозан + коллаген; Гр III – хитозан + Ag_2HPO_4 ; Гр IV – хитозан + Ag_2HPO_4 + коллаген; Гр V – хитозан + CuHPO_4 ; Гр VI – хитозан + CuHPO_4 + коллаген. В качестве

препаратов сравнения использовали раствор амфотерицина В для грибов и раствор гентамицина для бактерий. Приготавливали последовательные двукратные (десятикратные в случае гентамицина) разведения гелей и препарата сравнения в питательной среде и засеивали 100 мкл инокулята (105 КОЕ/мл).

Результаты и обсуждение

Все исследованные композиции обладали определенным противогрибковым и антибактериальным действием, что было обусловлено присутствием в составе хитозана. Во всех случаях добавление гидролизата коллагена либо не влияло на активность композиции, либо вызывало незначительные и разнонаправленные эффекты (таблица 1).

Таблица 1

Образцы гелей и препараты сравнения в исследовании активности против возбудителей

Исследуемое соединение	Минимальная ингибирующая концентрация, в отношении		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>
Гр I – хитозан (без добавок)	63 мг/мл	63 мг/мл	16 мг/мл
Гр II – хитозан + коллаген	125 мг/мл	32 мг/мл	16 мг/мл
Гр III – хитозан + Ag ₂ HPO ₄	32 мг/мл	4 мг/мл	1 мг/мл
Гр IV – хитозан + Ag ₂ HPO ₄ + коллаген	32 мг/мл	4 мг/мл	2 мг/мл
Гр V – хитозан + CuHPO ₄	4 мг/мл	32 мг/мл	32 мг/мл
Гр VI – хитозан + CuHPO ₄ + коллаген	8 мг/мл	63 мг/мл	32 мг/мл
Амфотерицин В (препарат сравнения)	250 мг/мл	-	-
Амфотерицин В (данные литературы)*	2 мкг/мл	-	-
Гентамицин (препарат сравнения)	-	100 мкг/мл	100 мкг/мл

Особенная эффективность в отношении грибов наблюдалась у композиций, функционализированных частицами гидрофосфата меди (II). В пересчете на гидрофосфат меди их эффективность приближалась к таковой у известного противогрибкового средства, амфотерицина В, по данным литературы, при этом активность сохранялась даже в отношении штамма, используемого в эксперименте, который продемонстрировал высокую устойчивость к амфотерицину.

Наибольшую эффективность в отношении как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий проявили композиции, функционализированные золев гидрофосфата серебра, причем их активность была выше в отношении грамотрицательных стафилококков, что позволяет сделать вывод об их потенциальной эффективности в отношении одного из самых распространенных возбудителей раневых инфекций – золотистого стафилококка.

Заключение

Результаты исследования демонстрируют

выраженное взаимное потенцирование противомикробного действия гелей на основе хитозана, функционализированных золями металлов. Данные литературы позволяют предположить, что данное потенцирование связано с повышением проницаемости мембран возбудителей под действием хитозана, что, в свою очередь, приводит к усилению цитотоксичности соединений металлов, входящих в состав изученных композиций.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы:

1. Любимова Л.В. Исследование активности антибактериальных композиций в отношении бактерий рода *Proteus*. *Новые технологии*. 2020;3: 47-54.
2. Ashrafi M., Bayat M., Mortazavi P., Hashemi S.J., Meimandipour A. Antimicrobial effect of chitosan-silver-copper nanocomposite on *Candida albicans*. *Journal of Nanostructure in Chemistry*. 2020.10(1): 87-95.
3. Chandrasekaran M., Kim K.D., Chun S.C.

Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles: A Review. *Processes*. 2020;8(9): 1173.

4. Chien P., Sheu F., Yang F. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*. 2007;78(1): 225-229.

5. Du W.L., Niu S.S., Xu YL, Xu Z.R., Fan C.L. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions *Carbohydrate polymers*. 2009;75(3): 385-389.

6. Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res*. 1998;15(9): 1326-31.

7. Jia Z., Shen D., Xu W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydr Res*. 2001;22(1): 1-6.

8. Jindal A., Mondal T., Bhattacharya J. An in vitro evaluation of zinc silicate fortified chitosan scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;164: 4252-4262.

9. Kumar M.N., Muzzarelli R.A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb A.J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev*. 2004;104(12): 6017-84.

10. Kvasnickova E., Matatkova O., Cejkova A., Masak J. Evaluation of baicalein, chitosan and usnic acid effect on *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* biofilm using a Cellavista device. *J Microbiological Methods*. 2015;118: 106-112.

11. Madhumathi K., Sudheesh K.P.T., Abhilash S., Sreeja V., Tamura H., Manzoor K., et al. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *J Materials Science: Materials in Medicine*. 2010; 1(2): 807-813.

12. Mao H.Q., Roy K., Troung-Le V.L., Janes K.A., Lin K.Y., Wang Y. et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release*. 2001;70(3): 399-421.

13. Potara M., Jakab E., Damert A., Popescu O., Canpean V., Astilean S. Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*. *Nanotechnology*. 2011;22(13): 135101.

14. Ramnani S.P., Sabharwal S. Adsorption behavior of Cr(VI) onto radiation crosslinked chitosan and its possible application for the treatment of wastewater containing Cr(VI). *Reactive and Functional Polymers*. 2006;66(9): 902-909.

15. Shepshelovich D., Tau N., Green H., Rozen-Zvi B., Issaschar A., Falcone M. Immunosuppression reduction in liver and kidney transplant recipients with suspected bacterial infection: A multinational survey. *Transpl Infect Dis*. 2019;21(5): e13134.

16. Yang T.C., Chou C.C., Li C.F. Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. *Int J Food Microbiol*. 2005;97(3): 237-45.

References

1. Lyubimova L.V. Investigation of the activity of antibacterial compositions against *Proteus* bacteria. *New Technologies*. 2020;3: 47-54. (In Russ.)

2. Ashrafi M., Bayat M., Mortazavi P., Hashemi S.J., Meimandipour A. Antimicrobial effect of chitosan-silver-copper nanocomposite on *Candida albicans*. *Journal of Nanostructure in Chemistry*. 2020.10(1): 87-95.

3. Chandrasekaran M., Kim K.D., Chun S.C. Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles: A Review. *Processes*. 2020;8(9): 1173.

4. Chien P., Sheu F., Yang F. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*. 2007;78(1): 225-229.

5. Du W.L., Niu S.S., Xu YL, Xu Z.R., Fan C.L. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions *Carbohydrate polymers*. 2009;75(3): 385-389.

6. Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res*. 1998;15(9): 1326-31.

7. Jia Z., Shen D., Xu W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydr Res*. 2001;22(1): 1-6.

8. Jindal A., Mondal T., Bhattacharya J. An in vitro evaluation of zinc silicate fortified chitosan scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;164: 4252-4262.

9. Kumar M.N., Muzzarelli R.A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb A.J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev*. 2004;104(12): 6017-84.

10. Kvasnickova E., Matatkova O., Cejkova A., Masak J. Evaluation of baicalein, chitosan and usnic acid effect on *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* biofilm using a Cellavista device. *J Microbiological Methods*. 2015;118: 106-112.

11. Madhumathi K., Sudheesh K.P.T., Abhilash S., Sreeja V., Tamura H., Manzoor K., et al. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *J Materials Science: Materials in Medicine*. 2010; 1(2): 807-813.

12. Mao H.Q., Roy K., Troung-Le V.L., Janes K.A., Lin K.Y., Wang Y. et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release*. 2001;70(3): 399-421.

13. Potara M., Jakab E., Damert A., Popescu O., Canpean V., Astilean S. Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*. *Nanotechnology*. 2011;22(13): 135101.

14. Ramnani S.P., Sabharwal S. Adsorption behavior of Cr(VI) onto radiation crosslinked chitosan and its possible application for the treatment

of wastewater containing Cr(VI). *Reactive and Functional Polymers*. 2006;66(9): 902-909.

15. Shepshelovich D., Tau N., Green H., Rozen-Zvi B., Issaschar A., Falcone M. Immunosuppression reduction in liver and kidney transplant recipients with suspected bacterial infection: A multinational survey. *Transpl Infect Dis*. 2019;21(5): e13134.

16. Yang T.C., Chou C.C., Li C.F. Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. *Int J Food Microbiol*. 2005;97(3): 237-45.

Контактные данные

Автор, ответственный за переписку: Халимов Руслан Ильхомович, научный сотрудник Научно-исследовательского института биологической медицины Алтайского государственного университета, г. Барнаул.

656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61.

Тел.: +79133668302.

E-mail: asu.nii@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6348-6234>

Информация об авторах

Семенихина Наталья Михайловна, к.вет.н., старший научный сотрудник Научно-исследовательского института биологической медицины Алтайского государственного университета, г. Барнаул.

656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61.

Тел.: (3852) 298185.

E-mail: asu.nii@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4954-1716>

Васько Евгения Евгеньевна, лаборант Научно-исследовательского института биологической медицины Алтайского государственного университета, г. Барнаул.

656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61.

Тел.: (3852) 298185.

E-mail: asu.nii@mail.ru

Абрамова Кристина Евгеньевна, лаборант Научно-исследовательского института биологической медицины Алтайского государственного университета, г. Барнаул.

656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61.

Тел.: (3852) 298185.

E-mail: asu.nii@mail.ru

Кульбакина Ирина Игоревна, студентка института химии и химико-фармацевтических технологий Алтайского государственного университета, г. Барнаул.

656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61.

Тел.: (3852) 298185.

E-mail: asu.nii@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2021

Принята к публикации 03.03.2021

Для цитирования: Семенихина Н.М., Васько Е.Е., Абрамова К.Е., Кульбакина И.И., Халимов Р.И. Оценка противомикробной активности биополимеров на основе хитозана, функционализированных нерастворимыми соединениями металлов. *Бюллетень медицинской науки*. 2021;1(21): 99–103.

Citation: Semenikhina N.M., Vas'ko E.E., Abramova K.E., Kul'bakina I.I., Khalimov R.I. Evaluation of antimicrobial activity of chitosan-based biopolymers functionalized by insoluble metal compounds. *Bulletin of Medical Science*. 2021;1(21): 99–103. (In Russ.)