



Библиографический список

1. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихорева, В.П. Варламова. М.: Наука, 2002. 368 с.
2. Шаповалов С.Г. Современные раневые покрытия в комбустиологии // ФАРМиндекс-Практик. 2005. Вып.8. С.38–46.
3. Кириленко Ю.К., Постнов С.Е., Решетов И.В. и др. Повязка для лечения ран: Пат. 2219954 Российская Федерация. МПК7 A61L15/28. 2003. 6 с.
4. Шиповская А.Б., Фомина В.И., Солонина Н.А., Тимофеева Г.Н. Влияние парообразной водно-кислотной среды на

свойства хитозана // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Материалы VIII Междунар. конф. М.: Изд-во ВНИРО, 2006. С.157–160.

5. Шиповская А.Б., Фомина В.И., Солонина Н.А., Тимофеева Г.Н. Способ получения водорастворимых производных хитозана: Пат. 22636681 Российская Федерация. МПК⁷ C08B37/08. 2005. 5 с.

6. Бузинова Д.А., Фомина В.И., Шиповская А.Б. Исследование набухания хитозановых пленок в парах воды // Перспективные полимерные композиционные материалы. Альтернативные технологии. Переработка. Применение. Экология: Докл. IV Междунар. конф. «Композит-2007». Саратов: Изд-во Саратов. гос. техн. ун-та, 2007. С.58–61.

УДК 547.458.5:579.61

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ОЛИГОМЕРОВ ХИТОЗАНА

А.Б. Шиповская, В.И. Фомина,
М.Н. Киреев*, Е.С. Казакова*, И.А. Касьян*

Саратовский государственный университет,
кафедра полимеров

* ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб»

E-mail: ShipovskayaAB@chem.sgu.ru

Изучена биологическая активность олигомеров хитозана различной молекулярной массы на модели тест-штаммов *E.coli* (ATCC 25922), *S.aureus* (ATCC 25923) и грибов *Candida albicans* (ATCC 10231). Показано, что все изученные образцы ингибируют рост этих микроорганизмов, в большей степени *S.aureus*. Установлена зависимость бактерицидной активности олигомеров хитозана от их концентрации, времени воздействия и молекулярной массы.

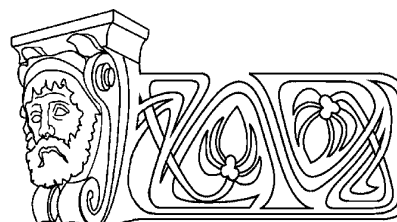
Ключевые слова: олигомеры хитозана, молекулярная масса, удельное оптическое вращение, биологическая активность, тест штаммы микроорганизмов.

Biological Activity of Chitosan Oligomers

A.B. Shipovskaya, V.I. Fomina,
M.N. Kireev, E.S. Kazakova, I.A. Kasi'yan

The biological activity of chitosan oligomers of various molecular masses was examined on *E.coli* (ATCC 25922), *S.aureus* (ATCC 25923), and fungus *Candida albicans* (ATCC 10231). All the samples under study inhibited the growth of these microorganisms, especially *S.aureus*. The dependence of the biological activity of chitosan oligomers on their concentration, exposure time, and molecular mass has been established.

Key words: chitosan oligomers, molecular mass, specific optical rotation, biological activity, test subspecies of microorganisms.



Биологически активный полимер хитозан входит в состав многих современных лекарственных препаратов. Хитозан является перспективным и для получения новых биологически активных форм либо в качестве единого компонента, либо в комплексе с другими биополимерами или низкомолекулярными веществами.

Замечено, что практически все функциональные свойства хитозана зависят от его молекулярных параметров, в большей степени от молекулярной массы (степени полимеризации) [1–3]. В литературе отмечается интерес к изучению влияния этой характеристики хитозана на его биологическую активность [4–7]. В частности, установлено значительное влияние молекулярной массы на иммуномодулирующую и противовирусную активность хитозана [5, 6]. Особый интерес специалистов наблюдается к проявлению биоцидных свойств хитозана различной степени полимеризации [4].



Цель настоящей работы – исследование бактерицидных свойств олигомеров хитозана разной молекулярной массы.

Материалы и методы

Объектами исследования служили промышленный водорастворимый образец хитозана (ХТЗ) со средневязкостной молекулярной массой $\overline{M}_\eta = 16.5$ кДа производства ЗАО «Биопрогресс», олигомеры хитозана ОХТЗ-1, ОХТЗ-2, ОХТЗ-3 средневесовой молекулярной массы $\overline{M}_w = 1.5, 1.2$ и 0.68 кДа соответственно и аналог мономерного звена хитозана в солевой форме – *D*-глюкозамин хлоргидрат («Реахим», РФ). В качестве растворителя использовали дистиллированную воду.

Образцы ОХТЗ-1, ОХТЗ-2 и ОХТЗ-3 получены окислительной деструкцией промышленного высокомолекулярного образца с $\overline{M}_\eta = 640$ кДа (ЗАО «Биопрогресс»). Так как этот образец в воде не растворим, деструкцию проводили в водной гетерогенной системе перекисью водорода при температуре 70°C до достижения гомогенного раствора. Концентрацию H_2O_2 в системе варьировали от 0.8% до 2.5%.

Средневязкостную молекулярную массу \overline{M}_η определяли традиционным методом, используя вискозиметр Уббелюде с диаметром капилляра 0.54 мм. Константы уравнения Марка–Куна–Хаувинка были взяты из работы [8]. Средневесовую молекулярную массу \overline{M}_w образца ОХТЗ-3 измеряли методом эксклюзионной хроматографии на жидкостном хроматографе фирмы Waters, снабженным рефрактометрическим и УФ-детекторами. \overline{M}_w образцов ОХТЗ-1 и ОХТЗ-2 находили по зависимости удельного оптического вращения $[\alpha]$ от \overline{M}_w , согласно [2].

Величину $[\alpha]$ растворов снимали на автоматическом спектрополяриметре марки СПУ-Е с ртутной лампой высокого давления ДРШ-250 при длине волны $\lambda = 578$ нм и температуре 20°C . Использовали стеклянные кюветы длиной 1 дм с кварцевыми окошками. Концентрация растворов составила 0.4–0.5 г/дл. Удельное оптическое вращение $[\alpha]_{578\text{нм}}^{20^\circ\text{C}}$ рассчитывали согласно [9]. Погрешность измерений углов вращения не превышала 0.002° .

Бактерицидные свойства водорастворимых форм хитозана изучали на примере грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов: культур кишечной палочки *Escherichia coli* (ATCC 25922) и золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), а также грибов *Candida albicans* (ATCC 10231). Эксперимент проводили двумя способами. По первому в испытуемый водный раствор исследуемого образца вносили бактерии до конечной концентрации 10^6 КОЕ/мл (*E. coli*, *Candida albicans*) и 10^7 КОЕ/мл (*S. aureus*). После экспозиции в течение 1 и 24 ч делали высев 0.1 мл системы (раствор ХТЗ + микроорганизмы) на плотную питательную среду АГВ. Учет роста и размножения микроорганизмов проводили через 24 ч инкубации при 37°C . По второму способу 100 мкл испытуемого раствора препарата наносили на засеянные газоном бактериальные культуры тест-штаммов. Исходная концентрация дисперсий микроорганизмов, используемых для получения колоний бактерий («газона»), составила 10^6 КОЕ/мл. Время экспозиции – 12 и 24 часа. Концентрацию (*C*) водного раствора исследуемых образцов варьировали от 0.02 до 2.0%. В опытах использовали стерильные растворы полимера, которые получали после фильтрации исходных растворов через нитроцеллюлозные фильтры с порами диаметром 0.22 мкм.

Результаты и их обсуждение

На начальном этапе работы исследовали влияние времени воздействия и концентрации препарата (на примере раствора ХТЗ) на размножение микроорганизмов. Результаты испытаний по первому способу приведены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что экспозиция в течение 1 ч бактерий *E. coli* и *S. aureus*, а также грибов *Candida albicans* в растворе ХТЗ исследуемой концентрации из интервала $C = 0.02$ –2.0% не подавляет их рост на плотной питательной среде. Увеличение до 24 ч экспозиции микроорганизмов в 2%-ном растворе полностью подавляет рост бактериальной культуры в принятых условиях эксперимента. Отметим, что ингибирование роста клеток *E. coli* и *Candida albicans* наблюдается и для



Таблица 1

Влияние концентрации раствора ХТЗ и времени экспозиции на размножение микроорганизмов

| Образец | Микроорганизмы | Концентрация микроорганизмов, КОЕ/мл | Экспозиция, ч | Концентрация раствора препарата, % | | | | |
|----------------------|-------------------------|--------------------------------------|---------------|------------------------------------|------|-----|------|------|
| | | | | 2.0 | 1.8 | 1.0 | 0.2 | 0.02 |
| ХТЗ | <i>E. coli</i> | 10^6 | 1 | + | + | + | + | + |
| | | | 24 | – | – | +/- | + | + |
| | <i>S. aureus</i> | 10^7 | 1 | + | н.о. | + | н.о. | н.о. |
| | | | 24 | – | н.о. | + | н.о. | н.о. |
| | <i>Candida albicans</i> | 10^6 | 1 | + | + | + | + | + |
| | | | 24 | – | – | – | – | + |
| D-глюкозамина хлорид | <i>S. aureus</i> | 10^7 | 1 | + | н.о. | + | н.о. | н.о. |
| | | | 24 | + | н.о. | + | н.о. | н.о. |

Примечание. Плюс (+) – наличие роста микроорганизмов в зоне нанесения исследуемых препаратов; минус (–) – отсутствие роста микроорганизмов в зоне нанесения исследуемых препаратов; н.о. – не оценивали.

растворов ХТЗ концентрации $\leq 1\%$. Водный раствор D-глюкозамина хлоридата бактерицидную активность по отношению к культуре золотистого стафилококка не проявил. Учитывая влияние концентрации препарата на подавление роста микроорганизмов, дальнейшие исследования проводили с использованием (в основном) растворов образцов с $C = 2.0\%$.

На следующем этапе исследовали бактерицидные свойства ХТЗ и олигомеров хитозана (ОХТЗ-1, -2, -3) разной молекулярной массы по отношению к бактериям *E. coli*,

S. aureus и грибам *Candida albicans*. Используемые образцы различались также и величиной удельного оптического вращения $[\alpha]$. Результаты экспериментов, полученные по второму способу, приведены в табл. 2. Нанесение определенной порции (100 мкл) растворов исследуемых образцов ХТЗ и ОХТЗ на засеянные газон культур микроорганизмов как при 12-часовой, так и при 24-часовой экспозиции вызывало подавление их роста (табл. 2). Наибольшим бактерицидным действием обладал образец ОХТЗ-3, характеризующийся наименьшей молекулярной массой (степень полимеризации ~ 4) и наименьшим значением $[\alpha]$ по абсолютной величине. Значительное подавление роста микроорганизмов вызывали растворы этого образца вплоть до концентрации 0.5% (растворы меньшей концентрации в данных опытах не исследовались).

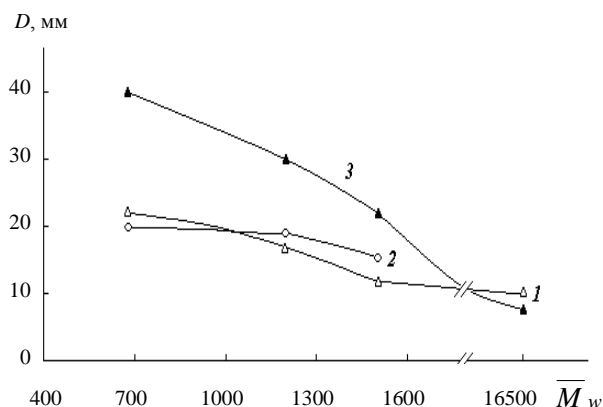
Зависимость биологической активности (т.е. проявление бактерицидных свойств) растворов ХТЗ и ОХТЗ от молекулярной массы образцов наглядно демонстрирует рисунок. По мере уменьшения \bar{M}_w взятых для исследования водорастворимых форм хитозана диаметр зоны просветления (D) засеянных газон культур микроорганизмов в месте внесения растворов образцов возрастает. В большей степени эта взаимосвязь проявляется на примере микроорганизмов *S. aureus*: изменение молекулярной массы образца с 16.5 кДа до 0.68 кДа увеличивает D более чем в 4 раза.

Таблица 2

Физико-химические характеристики и бактерицидная активность хитозана и олигомеров хитозана

| Образец | Молекулярная масса, Да | Удельное оптическое вращение $[\alpha]_{578\text{нм}}^{20^\circ\text{C}}$ | Микроорганизмы | Экспозиция, ч | Концентрация раствора препарата, % | Диаметр зоны просветления, мм |
|---------|------------------------|---|-------------------------|---------------|------------------------------------|-------------------------------|
| ХТЗ | 16500 | –13.5 | <i>E. coli</i> | 12 | 2.0 | + |
| | | | <i>S. aureus</i> | 12 | 2.0 | 7 – 9 |
| | | | <i>Candida albicans</i> | 12 | 2.0 | 10 |
| ОХТЗ-1 | 1500 | –6.55 | <i>E. coli</i> | 24 | 2.0 | 15(-1)* |
| | | | <i>S. aureus</i> | 24 | 2.0 | 22(-3)* |
| | | | <i>Candida albicans</i> | 24 | 2.0 | 12 |
| ОХТЗ-2 | 1200 | –5.20 | <i>E. coli</i> | 24 | 2.0 | 19 |
| | | | <i>S. aureus</i> | 24 | 2.0 | 30(-19)* |
| | | | <i>Candida albicans</i> | 24 | 2.0 | 17 |
| ОХТЗ-3 | 680 | –1.08 | <i>E. coli</i> | 24 | 0.9 | 20 |
| | | | <i>S. aureus</i> | 24 | 0.9 | 40(-18)* |
| | | | <i>Candida albicans</i> | 24 | 0.9 | 22 |

* В скобках показан вторичный рост культуры микроорганизмов через 48 часов.



Зависимость диаметра зоны просветления засеянных газон культур *Candida albicans* (1), *E.coli* (2) и *S.aureus* (3) в месте внесения растворов ХТЗ и ОХТЗ от молекулярной массы образцов

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно заключить, что олигомеры хитозана ОХТЗ-1, -2, -3 и низкомолекулярный образец ХТЗ биологически активны. Бактерицидные свойства олигомеров хитозана контролируются временем воздействия и концентрацией вещества, а также молекулярной массой образцов и, возможно, величиной удельного оптического вращения их растворов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №06-08-00892а).

Библиографический список

1. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука, 2002. 368 с.
2. Шиповская А.Б., Фомина В.И., Казмичева О.Ф. и др. Влияние молекулярной массы на оптическую активность хитозана // Высокомолек. соед. 2007. Т.49Б, №12. С.2195–2199.
3. Holme H.K., Hagen A., Dornish M. Влияние хитозанов с различным молекулярным весом и степенями деацетилирования на проницаемость кишечных эпителиальных клеток человека // Chitosan Per os: from Dietary Supplement to Drug Carrier. Grottammare: Atec. 2001. P.153–163.
4. Дарашкевич О.Н., Добролеж О.В., Вербицкая Н.Б. и др. Бицидные свойства хитозана различной степени деполимеризации // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Материалы VII Междунар. конф. М.: Изд-во ВНИРО, 2003. С.239–240.
5. Жоголев К.Д., Никитин В.Ю. Экспериментально-лабораторное изучение иммуномодулирующих свойств препаратов хитина и хитозана // Иммунология. 1998. №6. С.53–54.
6. Куликов С.Н., Чирков С.Н., Ильина А.В. и др. Влияние молекулярной массы хитозана на его противовирусную активность в растениях // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т.42, № 2. С.224–228.
7. Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Материалы VIII Междунар. конф. М.: Изд-во ВНИРО, 2006. 398 с.
8. Gamzazade A.I., Shlimak V.M., Sklar A.M. et al. // Acta Polymerica. 1985. Vol.36B, №8. P.420–425.
9. Kettering Ch.F. Newer methods of polymer characterization. N.Y.; L.; S.: Wiley-Interscience publ., 1964. 572 p.