

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

С.Н. Куликов, Ю.А. Тюрин, А.В. Ильина*, А.Н. Левов*, С.А. Лопатин*, В.П. Варламов*

Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
Роспотребнадзора, Казань, Россия

* Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия

Введение

Хитозан - природный полиаминосахарид, состоящий из остатков глюкозамина, был открыт в середине девятнадцатого века, однако, стал находить практическое применение только в последние два десятилетия [1]. Широкий спектр биологической активности, биосовместимость, биodeградируемость делают хитозановый полимер привлекательным объектом для использования в разнообразных целях. Одними из первых свойств, обнаруженных у хитозана, стали его антибактериальная и противогрибная активности, которые в настоящее время интенсивно осваиваются медициной, сельским хозяйством, пищевой и текстильной промышленностями.

Биоцидной активности хитозана посвящено большое количество экспериментальных работ [2, 3]. При этом, ингибируя рост прокариотов, мицелиальных и дрожжеподобных грибов, хитозан оказывает меньшее влияние на клетки млекопитающих [4]. Тем не менее механизмы антибактериального действия этого биополимера на клеточном и молекулярном уровнях раскрыты неполностью.

Полагают, что антибактериальные свойства полимера связаны в первую очередь с его воздействием на клеточные стенки микроорганизмов.

В случае грам-отрицательных бактерий первой мишенью действия хитозанового поликатиона становится липополисахарид (ЛПС), который входит в состав внешней мембраны и заряжен отрицательно. Роль заряда ЛПС в проявлении хитозаном своей антибактериальной активности подтверждается тем, что мутантный штамм *Salmonella typhimurium*, во внешней мембране которого присутствует положительно заряженный ЛПС, обладает повышенной устойчивостью к действию полимера [5]. ЛПС выполняет важную структурную роль и придаёт поверхности микробной клетки гидрофильные свойства, благодаря чему затрудняется проникновение внутрь гидрофобных молекул с антибактериальным действием. Поэтому взаимодействие хитозана с ЛПС и возникающие при этом структурные изменения во внешней мембране делают клетку более чувствительной к действию некоторых детергентов [5]. Кроме того, стабильность мембраны обеспечивается двухвалентными катионами металлов, которые находятся в комплексе с ЛПС. Поэтому хелатирование ионов металлов хитозаном, обладающим многочисленными первичными аминогруппами, приводит к дестабилизации внешних структур грам-отрицательных бактерий. И хотя по сравнению с более сильным хелатирующим агентом – ЭДТА, хитозан не вызывает существенного высвобождения из мембраны ЛПС и глицерофосфолипидов [5], тем не менее изменения в структуре резко снижают её барьерную функцию, делая клетки бактерий более подверженными действию других антибактериальных веществ, которые не способны проникать через неповреждённую мембрану [5, 6].

У грам-положительных бактерий главной мишенью для хитозана могут быть тейхоевые кислоты, отрицательный заряд которым придают многочисленные остатки фосфорной кислоты. Подобно ЛПС грам-отрицательных бактерий тейхоевые кислоты находятся в комплексе с двухвалентными ионами металлов тем самым являясь их важнейшим резервуаром и регулятором ионного обмена. Поэтому связывание хитозаном катионов металлов способно нарушить ионный баланс клетки. Тейхоевые кислоты в составе клеточных стенок также связаны с положительно заряженными белками –

автолизинами, которые играют важную роль в деградации муреина, которая необходима в процессе роста и деления бактерий. Конкурентное вытеснение хитозановым полимером избыточного количества автолизина из их комплекса с тейхоевыми кислотами способно вызвать неконтролируемый лизис клеточной стенки. Именно таким образом активируются автолитические ферменты *Staphylococcus simulans* - N-ацетилмурамил-L-аланин-амидаза и эндо-b-N-ацетилглюкозаминидаза при воздействии некоторых положительно-заряженных веществ [7].

Следующей по значимости мишенью для хитозана после компонентов клеточной стенки бактерий является ЦПМ. Под воздействием полимера нарушается проницаемость плазмалеммы, что ведёт к падению мембранного потенциала, выходу из клетки цитоплазматических веществ. Вызванные действием хитозана конформационные изменения мембранных белков, участвующих в переносе электронов в процессе аэробного дыхания, могут негативно повлиять на работу электрон транспортной цепи. Это подтверждается тем, что при действии хитозана усиливается экспрессия генов, которые кодируют ферменты, участвующие в энергетическом метаболизме в условиях недостатка кислорода или при разрыве электрон транспортной цепи: форматацетил-трансферазы, форматацетил-трансферазного активирующего белка, нитрат-редуктазы, НАДН-дегидрогеназы и некоторых других [8].

Кроме механизма антимикробного действия остаётся до конца невыясненной взаимосвязь между химической структурой хитозанового полимера и его биологическим эффектом на клетки микроорганизмов [9]. Установление подобной взаимосвязи осложняется тем, что хитозан, являющийся природным сополимером N-ацетилглюкозамина и глюкозамина, представляет собой гетерогенную группу веществ, различающихся по молекулярной массе, степени ацетилирования, расположению ацетилированных звеньев вдоль полимерной цепи, вязкости, значению pK_a [10, 11].

В первую очередь биоцидная активность хитозана определяется его аминокетильными группами, положительный заряд которых обуславливает связывание полимера с поверхностными структурами клеток микроорганизмов. Установлено, что увеличение степени деацетилирования хитозана усиливает его антибактериальную активность [12].

Поскольку положительный заряд аминокетильных групп определяется уровнем pH среды, то максимальную антибактериальную активность хитозан проявляет в кислых условиях, а защелачивание среды ведёт к её снижению [12]. Положительный заряд позволяет хитозану связываться с анионными компонентами клеточных структур бактерий за счёт электростатического взаимодействия, а увеличение заряда полимера при закислении среды способствует более прочному связыванию хитозановой молекулы на поверхности клеток микроорганизмов.

Противоречивыми остаются сведения о влиянии молекулярной массы хитозана на его антимикробное действие. Возможно это связано с тем, что молекулы полимера сильно различающиеся по степени полимеризации имеют различные pH оптимумы для проявления своей максимальной антибактериальной активности. Так, исходный высокомолекулярный хитозан обладает наибольшим антибактериальным эффектом в кислой среде, поскольку при значениях pH выше 6,0-6,5 его аминокетильные группы теряют заряд и полимер выпадает в осадок. В меньшей степени теряют эффективность антимикробного действия в среде с близким к нейтральному значению pH хитозаны с небольшой степенью полимеризации – так называемые низкомолекулярные водорастворимые хитозаны с молекулярной массой от 2 до 50 кДа, которые получают из исходного высокомолекулярного с помощью кислотного или ферментативного гидролиза [1].

Не менее важным в оценке биологической активности хитозана, в том числе его антибактериального действия, является молекулярно-массовая характеристика используемых в экспериментах хитозановых образцов. Поскольку часто применяемое на практике указание только молекулярной массы хитозана (обычно средневязкостной) не даёт представления о молекулярно-массовом распределении хитозановых молекул в

образце. Кроме того, в случае большой степени полидисперсности образцов затрудняется интерпретация экспериментальных данных, поскольку биологический эффект хитозана может определяться минорной долей молекул с молекулярной массой, значительно отличающейся от средней для данного образца величины [13].

Для усиления антибактериальных свойств хитозанового полимера получают его производные. Наличие реакционноспособных функциональных групп в хитозане обеспечивает возможность подобной химической модификации полимера. Производные хитозана как антибактериального агента получают с двумя целями: повысить собственно биоцидные свойства вещества либо обеспечить лучшую растворимость полимера, особенно при нейтральном и щелочном значениях рН среды.

Целью настоящей работы являлось получение производных хитозана с улучшенными антибактериальными свойствами. Для достижения цели были поставлены задачи: получить низкомолекулярный узкодисперсный хитозан; получить ацильные производные низкомолекулярного хитозана; провести исследование антибактериальной активности хитозана и его производных.

Методы исследования

Низкомолекулярный узкодисперсный хитозан был получен методом деполимеризации в соляной кислоте из высокомолекулярного исходного хитозана со средневязкостной молекулярной массой 700 кДа и степенью деацетилирования 85% (ЗАО «Биопрогресс», Щёлково, Московская обл.).

Полученный в ходе кислотного гидролиза низкомолекулярный хитозан имел степень деацетилирования $\geq 99,9\%$, средневесовую молекулярную массу (Mw) 8,3 кДа, индекс полидисперсности (Ip) 1,5. Средневесовую молекулярную массу и значение полидисперсности хитозана определяли методом гель-проникающей ВЭЖХ на приборе «Сукам» (Германия) с использованием тандема колонок Ultrahydrogel 250 и Ultrahydrogel 500 (Waters, США). Контроль и обсчёт хроматографии осуществляли с помощью программы «Мультихром» версия 1.6 (ЗАО «Амперсенд», Москва). Растворы хитозана стерилизовали посредством фильтрации через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм.

Ацилированные производные низкомолекулярного хитозана получали в результате реакции между свободными аминогруппами полимера и ангидридами соответствующих жирных кислот, содержащих 2, 4, 6 и 14 атомов углерода.

Антибактериальную активность хитозана и его производных в отношении *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* исследовали согласно методике [8]. Для этого готовили двойные разведения веществ в МПБ (рН 6,5), затем добавляли суспензию бактерий в той же среде до конечного количества клеток 10^5 КОЕ/мл. После 24 ч инкубации при 37°C определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) и минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) вещества. МИК – минимальная концентрация вещества при которой не наблюдается рост бактериальной культуры, МБК – минимальная концентрация вещества при которой погибают $\geq 99,9\%$ клеток.

Результаты и обсуждение

Для усиления антибактериальных свойств хитозана в молекулу полимера могут быть внедрены заместители, которые способны, например, усиливать его действие на клеточные липидные мембраны. Таким образом, эти заместители должны обладать сродством к компонентам мембран и могут иметь ярко выраженные гидрофобные свойства. Нами были получены такие производные узкодисперсного низкомолекулярного хитозана. В качестве заместителя к аминогруппам хитозана были присоединены ацильные остатки различной длины и в разном количестве (рис.1).

Было показано, что *E. coli* и *S. aureus* обладают одинаковой чувствительностью к исходному низкомолекулярному хитозану (табл. 1). Введение С-2 ацильного (ацетильного) остатка практически никак не влияло на активность хитозана, поэтому

можно сказать, что 10% ацетилирования практически не изменяет антибактериальный эффект за счёт уменьшения свободных аминогрупп, но и не улучшают таковую вследствие малого размера алкильного остатка. Введение более длинных ацилов (С-4, С-6, С-14) повышает антибактериальные свойства хитозанового полимера, особенно в отношении грам-отрицательной кишечной палочки, которая имеет внешнюю мембрану и потому обладающая хорошей мишенью на поверхности клетки для взаимодействия с модифицированными хитозанами.

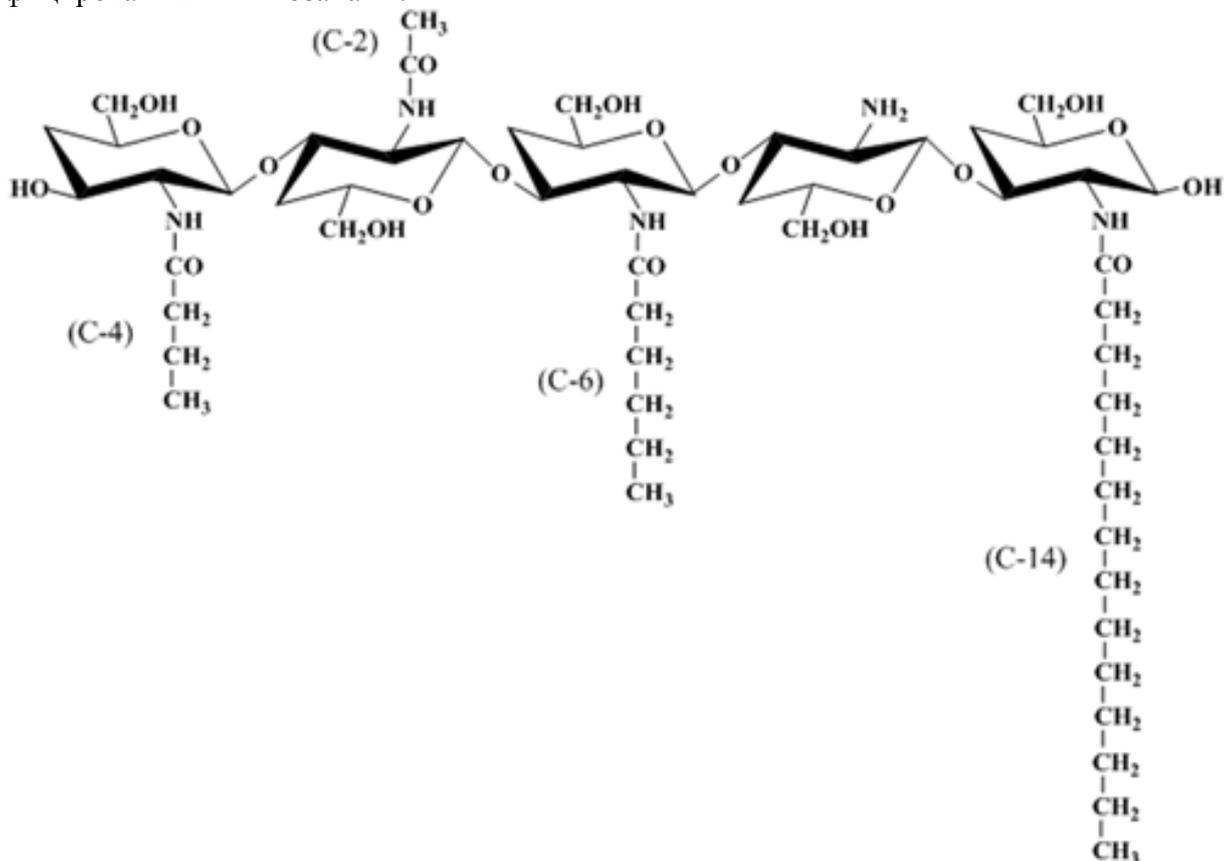


Рисунок 1 – Структурные производные хитозана с ацильными заместителями.

Таблица 1 – Антибактериальная активность ацил-производных хитозана

Виды бактерий	Хитозаны	МИК, мкг/мл	МБК, мкг/мл
<i>E. coli</i>	8,3 кДа (исходный)	250	250
	С-2 ¹ 10% ²	250	250
	С-4 8%	125	125
	С-4 12%	500	500
	С-4 27%	1000	1000
	С-6 8%	125	125
	С-6 17%	500	500
	С-6 27%	1000	1000
	С-14 8%	125	125
<i>S. aureus</i>	8,3 кДа (исходный)	250	250
	С-2 10%	250	250
	С-4 8%	250	250
	С-4 12%	1000	1000
	С-4 27%	>2000	>2000
	С-6 8%	250	250
	С-6 17%	500	500
	С-6 27%	1000	1000
	С-14 8%	125	125

1 - количество атомов углерода в алкильном заместителе; 2 – количество алкилированных аминогрупп хитозана.

В отношении золотистого стафилококка было отмечено увеличение ингибирующей активности только у миристил-хитозана. Увеличение антибактериального действия хитозана отмечалось только, когда в молекулу полимера было введено небольшое количество ацильных заместителей, увеличение их количества резко снижало биоцидный эффект, что по всей видимости связано с критическим уменьшением количества свободных аминогрупп и излишней гидрофобности производных в целом и согласуется с результатами, полученными другими авторами [14].

Нами ранее были синтезированы производные низкомолекулярного хитозана содержащие остатки галактозы и маннозы, присоединённые к полимеру через его свободные аминогруппы с использованием реакции Майара. Такие производные с боковыми моносахаридными заместителями характеризовались лучшей растворимостью и обладали повышенной антибактериальной активностью в отношении *Bacillus subtilis*, но не в отношении *E. coli* [15]. Возможно это связано со структурными различиями в строении клеточных стенок грам-положительных и грам-отрицательных бактерий. Поскольку возникновением водородных связей между хитозаном и поверхностью клеток микроорганизмов, возникающим затем напряжением между молекулами хитозана, находящимися на клеточной стенке, и последующим её разрывом объясняют один из механизмов действия полимера в отношении грам-положительных бактерий [16]. Возможно, наличие боковых галактозных и маннозных остатков обеспечивает возможность образования дополнительных водородных связей между полимером и клеточной поверхностью и более высокую антибактериальную активность этих производных. Кроме того, Шиффово основание, образующееся на первой стадии реакции Майара, а также промежуточные соединения, являющиеся результатом перегруппировки Амадори, как полагают, тоже могут быть ответственны за антимицробный эффект [17].

Выводы

Таким образом, в ходе работы был получен низкомолекулярный узкодисперсный хитозан, на основе которого были синтезированы производные, содержащие различные по длине ацильные заместители с различной степенью замещения. Было показано, что антибактериальная активность производных хитозана увеличивалась по сравнению с исходным немодифицированным образцом при невысокой степени замещения ацильными остатками и возрастала при увеличении длины их жирных хвостов.

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 09-04-99035 р_офи).

Список литературы

1. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. - М.: Изд-во Наука, 2002. - 368 с.
2. Lim S.H., Hudson S.M. / Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals // J. Macromol. Sci. – 2003. - V. C43. - № 2. - P. 223-269.
3. Rabea E.I., Badawy M.E., Stevens C.V., Smagghe G., Steurbaut W. / Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action // Biomacromol. – 2003. - V. 4. - № 6. - P. 1457-1465.
4. Rhoades J., Roller S. / Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. - V. 66. P. 80-86.
5. Helander I.M., Nurmiaho-Lassila E.L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S. / Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria // Int. J. Food Microbiol. – 2001. - V. 71. - P. 235-244.
6. Liu H., Du Y., Wang X., Sun L. / Chitosan kills bacteria through cell membrane damage // Int.

- J. Food Microbiol. – 2004. - V. 95. - P. 147-155.
7. Bierbaum G., Sahl H.G. / Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22: influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase // J. Bacteriol. – 1987. - V. 169. - P. 5452-5458.
8. Raafat D., Barga K., Haas A., Sahl H.G. / Insight into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound // Appl. Env. Microbiol. – 2008. - V. 74. - № 12. - P. 3764-3773.
9. Куликов С.Н., Тюрин Ю.А., Долбин Д.А., Хайруллин Р.З. / Роль структуры в биологической активности хитозана // Вестник Казанского технологического университета. – 2007. - № 6. - С. 10-15.
10. Singla A.K., Chawla M. / Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update // J. Pharm. Pharmacol. – 2001. - V. 53. - P. 1047-1067.
11. Tharanathan R.N., Kittur F.S. / Chitin – the undisputed biomolecule of great potential // Crit. Rev. Nutr. – 2003. - V. 43. - P. 61-87.
12. Liu X.F., Guan Y.L., Yang D.Z., Li Z., Yao K.D. / Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan // J. Appl. Polym. Sci. – 2001. - V. 79. - P. 1324-1335.
13. Куликов С.Н., Чирков С.Н., Ильина А.В., Лопатин С.А., Варламов В.П. / Влияние молекулярной массы хитозана на его противовирусную активность в растениях // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. - Т. 42. - № 2. - С. 224-228.
14. Kong M., Chen X.G., Liu C.S., Liu C.G., Meng X.H., Yu L.J. / Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli* // Colloids Surface B: Biointerfaces. – 2008. – V. 65. – P. 197-202.
15. Ильина А.В., Куликов С.Н., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Варламов В.П. / Получение и исследование моносахаридных производных низкомолекулярного хитозана // Прикладная Биохимия и Микробиология. – 2008. - Т. 44. - № 5. - P. 606-614.
16. Kumar A.B.V., Varadaraj M.C., Gowda L.R., Tharanathan R.N. / Characterization of chitoooligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* // Biochem. J. – 2005. - V. 391. - P. 167-175.
17. Chung Y-C., Kuo C-L., Chen C-C. / Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction // Bioresource Technol. – 2005. - V. 96. - № 13. - P. 1473-1482.