

УДК 579.61: 616.34-002

Г. С. Християн, Л. Б. Суходуб, О. М. Шербак, Н. М. Шульга, В. В. Казмірчук  
 Стоматологічна клініка «Нобімед», м. Дніпропетровськ, ДУ «Інститут мікробіології та  
 імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків

### ШВИДКІСТЬ ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ДО ХІТОЗАНУ

Експериментально досліджено швидкість формування резистентності грампозитивних, грамнегативних бактерій та грибів роду *Candida* до хітозанів з різною молекулярною масою. При тридцятикратному культивуванні мікроорганізмів на середовищах, що містили зростаючі концентрації досліджених речовин, було встановлено повільне формування резистентності до них. Отримані результати свідчать про можливість використання хітозанів у якості протимікробної складової при створенні нанокомпозитних матеріалів біомедичного призначення.

**Ключові слова:** хітозан, мікроорганізми, резистентність, нанокомпозитні матеріали.

Робота є фрагментом НДР АМН 97/2011 «Теоретичне та експериментальне обґрунтування розробки нанокомпозитних покриттів на основі біополімерів та протимікробних засобів для медичних імплантів» № ДР 0111U004731.

Хітозан є одним з перспективних біополімерів для інженерії тканин та застосування в якості складової композитних матеріалів для ортопедії та стоматології. Комбінація біосумісності, протимікробної активності, здатність створювати структури з прогнозованим об'ємом пор та контрольованою швидкістю деградації роблять його перспективним матеріалом для кісткових імплантів. Хітозан, як природний полікатион, може зв'язувати такі аніонні молекули, як глікозаміноглікани, ДНК, що робить його потенційним субстратом для генно-активованих матриць для використання в якості генної терапії в ортопедії [10]. Хітозан – нетоксичний, біосумісний полісахарид, здатний до біорезорбції, володіє широким спектром біологічної активності [8, 9, 12]. Структурна формула хітозану приведена на рис. 1.

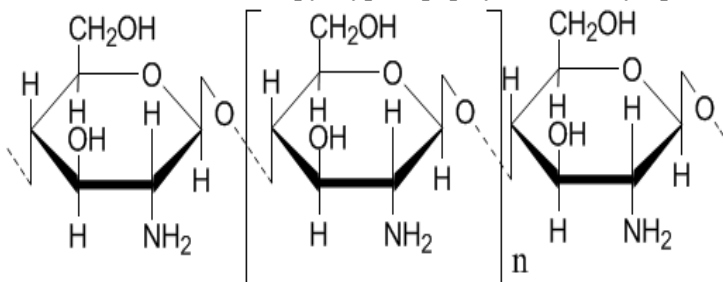


Рис.1. Структурна формула хітозану.

Хітозан важко розчиняється у воді в результаті ефекту гідрофобної взаємодії, коли енергія водневих зв'язків між молекулами води переважає енергію їх взаємодії з молекулами хітозану. В той же час водневі зв'язки визначають здатність хітозану розчинятися в органічних кислотах – оцтовій, лимонній, щавлевій, янтарній [3].

Тому в ході експериментів нами були використані розчини хітозану в оцтовій кислоті. Одними з перших властивостей, помічених у хітозану, були його протибактеріальна та протигрибкова активність. Було відмічено, що хітозан є інгібітором росту бактерій, що обумовлено зв'язуванням молекул полікатиона з клітинною стінкою мікроорганізмів, а також впливом хітозану на механізм репродукції мікробних тіл [2, 14]. Також доведено, що антибактеріальний ефект хітозанів в більшій мірі пов'язаний зі ступенем зарядженості первинних аміногруп, ніж із загальним їх вмістом в полімері. Введення до аміногруп замісників із аніонними групами приводить практично до повної втрати антимікробної активності, що підтверджує вирішальну роль позитивного заряду в пригніченні росту мікроорганізмів [1, 7]. Біоцидній активності хітозану присвячена велика кількість експериментальних робіт [13]. Допускають, що протибактеріальні властивості хітозану пов'язані, в першу чергу, з впливом на клітинну стінку мікроорганізму. Так, у випадку грамнегативних бактерій, першою мішенню дії хітозанового полікатиону є ліпополісахарид (ЛПС), що входить до складу зовнішньої мембрани та заряджений негативно. У той же час, мутантний штам *Salmonella typhimurium*, у зовнішній мембрані якого присутній позитивний заряд, проявляє підвищену стійкість до дії хітозану, що підтверджує роль заряду ЛПС в протибактеріальній активності полімера [11].

Протягом останніх років у всьому світі в умовах зростаючого селекційного тиску спостерігається прогресуючий розвиток резистентності збудників позаликарняних та нозокоміальних інфекцій до антибактеріальних та хімотерапевтичних препаратів. Формування та інтенсивне розповсюдження в умовах лікувально-профілактичних закладів антибіотикостійких мікроорганізмів пов'язано з підвищенням їх адаптаційних можливостей, зміною етіологічної

структури збудників гнійно-запальних захворювань, зниженням частини облігатних патогенів, розширенням спектру і підвищенням питомої ваги умовно-патогенних мікробів.

Зважаючи на вищезазначене, представляє інтерес визначення можливості формування стійкості деяких штамів мікроорганізмів щодо хітозану. Завдяки широкому спектру біологічної активності, біосумісності, протимікробної дії обраний об'єкт може бути придатний для розробки наноконкомпозитних покриттів для медичних імплантів та застосування в ортопедії та стоматології.

**Метою** роботи було вивчення формування стійкості грамположитивних, грампегативних мікроорганізмів та грибів роду *Candida* до хітозанів з різною молекулярною масою.

**Матеріал та методи дослідження.** Предметом дослідження стали зразки хітозану з молекулярною масою 39 кДа, 500 кДа та ступенем деацетилювання 87% (виробництво "Біопрогрес", Москва). Як препарати порівняння використані протимікробні засоби: ампіцилін, гентаміцин (виробництва ПАТ «Київмедпрепарат», Україна) та флуконазол (виробництва ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», Харків, Україна). Експерименти проведені на музейних штаммах мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* ATCC 885-653, рекомендованих для вивчення антибактеріальних властивостей досліджуваних препаратів [6].

Вивчення швидкості формування стійкості мікроорганізмів до експериментальних зразків хітозану з молекулярною масою 39 кДа та 500 кДа проводили *in vitro* шляхом багаторазових пасажів [4, 5]. У якості контролю застосовували кислоту оцтову з об'ємною часткою 0,5 %, у якій були розчинені зразки хітозанів. Дослідження зразків здійснювали стандартним методом двократних серійних розведень в бульйоні впродовж тридцяти тижнів, що відповідало терміну 30 пасажів. Густина мікробної суспензії при візуальному контролі відповідала стандарту мутності 0,5 за Мак-Фарландом. Для кожного наступного пасажу застосовували культури мікроорганізмів попереднього дослідного та контрольного ряду з виявленою мінімальною інгібуючою концентрацією (МІК). Критерієм оцінки дослідження вважали кратність збільшення МІК у кожному п'ятому послідовному пасажі.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Розвиток резистентності тест-штаму *S. aureus* ATCC 25923 до експериментальних зразків хітозану та ампіциліну представлено на рис. 2.

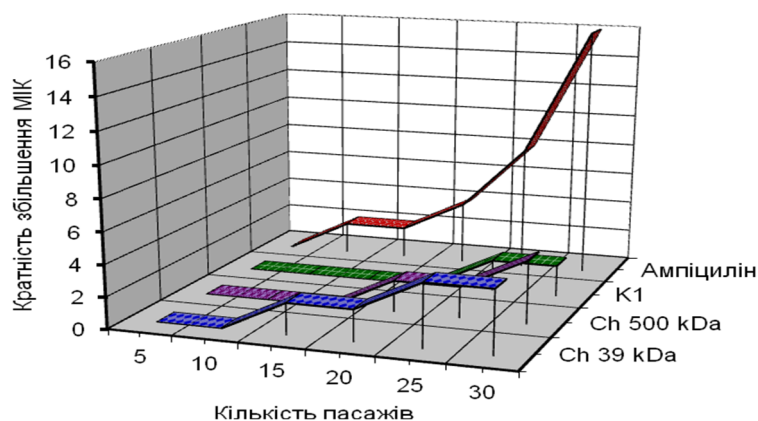


Рис. 2. Динаміка розвитку резистентності штаму *S. aureus* ATCC 25923 до зразків хітозану (Ch 39 kDa, Ch 500 kDa), розчину 0,5 мас.% оцтової кислоти (K1) та ампіциліну.

Формування стійкості до оцтової кислоти з об'ємною часткою 0,5 % спостерігалось після проведення двадцяти пасажів, але слід відзначити значно вищий початковий рівень МІК, який становив 625,0 мкг/мл. Кратність збільшення у 2 рази з'явилась лише після проведення двадцяти п'яти пасажів і залишалась на такому рівні по завершенню експерименту.

Результати дослідження швидкості розвитку стійкості тест-штаму *E. coli* ATCC 25922 продемонстровано на рис. 3. Доведено, що після десяти пасажів значення МІК для обох зразків хітозанів лишилось на рівні вихідної чутливості. Для хітозану з М. м. 500 кДа означена концентрація спостерігалась і після 15 пасажів. Подальшим дослідженням виявлено, що після двадцяти пасажів рівень МІК збільшився у 2 рази, що свідчить про повільний розвиток резистентності тест-штаму кишкової палички до хітозанів. Зростання стійкості до кислоти оцтової з об'ємною часткою 0,5 % спостерігалось лише після проведення двадцяти пасажів, але початковий рівень МІК також був досить високим (625,0 мкг/мл). Збільшення МІК у 2 рази з'явилось після проведення двадцяти п'яти пасажів і залишалось на такому рівні до кінця

експерименту. Прояв резистентності тест-штаму *E.coli* до гентаміцину з'явився після п'яти пасажів, а до завершення дослідження МІК зростає у 32 рази. Експериментально визначено, що поява стійкості тест-штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853 щодо дослідних зразків хітозанів формувалась повільно протягом 30 пасажів (рис. 4). У той же час до гентаміцину рівень МІК збільшився у 2 рази вже після п'яти пасажів. По завершенні пасажування вихідна МІК збільшилась у 32 рази. Швидкість формування резистентності тест-штаму до кислоти оцтової з об'ємною часткою 0,5 % була аналогічною як по відношенню до хітозанів.

У результаті проведених досліджень виявлено повільне формування резистентності *S. albicans* ATCC 885-653 до обраних зразків хітозанів, що відображено на рис. 5. Після двадцятого пасажу спостерігалось збільшення МІК у порівнянні з вихідною концентрацією у 2 рази. У контролі – кислоті оцтовій з об'ємною часткою 0,5 % така ж кратність збільшення МІК виявилась також після двадцяти пасажів. Подальше пасажування *S. albicans* показало, що після двадцять п'ятого пасажу значення МІК становило 250,0 мкг/мл. В присутності флуконазолу розвиток резистентності відбувався швидше.

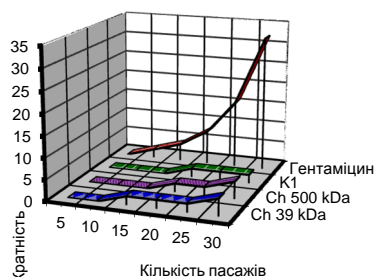


Рис. 3. Динаміка розвитку резистентності штаму *E.coli* ATCC 25922 до експериментальних зразків хітозану (Ch 39 kDa, Ch 500 kDa), розчину 0,5 мас.% оцтової кислоти (К1) та гентаміцину

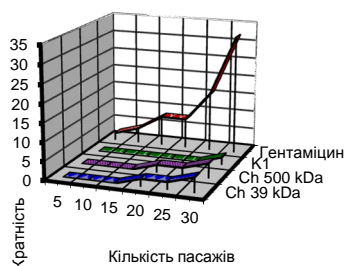


Рис.4. Динаміка розвитку резистентності штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853 до експериментальних зразків хітозану (Ch 39 kDa, Ch 500 kDa), розчину 0,5 мас.% оцтової кислоти (К1) та гентаміцину.

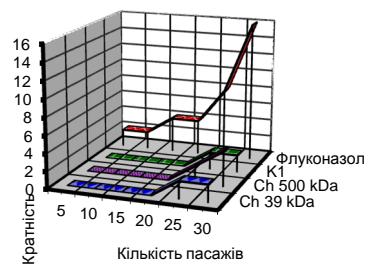


Рис. 5. Динаміка розвитку резистентності штаму *S. albicans* ATCC 885-653 до експериментальних зразків хітозану (Ch 39 kDa, Ch 500 kDa), розчину 0,5 мас.% оцтової кислоти (К1) та флуконазолу.

Початкова МІК флуконазолу складала 31,2 мкг/мл, але вже після проведення п'яти пасажів рівень МІК становив 62,5 мкг/мл. В цілому, протигрибкова активність флуконазолу по завершенні дослідження зменшилась у 16 разів. Результати даного дослідження представлені на рис. 5.

### Висновок

Результати вивчення формування стійкості грамозитивних – *S. aureus* ATCC 25923, грамнегативних тест-штамів – *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 та грибів роду *S. albicans* ATCC 885-653 до хітозанів з різною молекулярною масою показали повільне формування резистентності досліджуваних мікроорганізмів у порівнянні з чутливістю до антибіотиків.

*Перспективи подальших розробок у даному напрямку. Означене свідчить про можливість використання хітозанів у якості протимікробної складової при створенні нанокмозитних матеріалів біомедичного призначення.*

### Список літератури

- Бузинова А. Сорбционные и бактерицидные свойства плёнок хитозана / А. Бузинова, А. Б. Шиповская // Известия Саратовского университета. – 2008. – Т. 8. Сер. Химия. Биология. Экология. – Вып. 2.
- Гамзазаде А.И. Антибактериальная активность хитозанов /А.И. Гамзазаде, С.М. Насибов, О.В. Лукин // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Мат-лы 8-й Международной конф. – М.: ВНИРО, - 2006. – С.183–186.
- Евдокимов И. А. Физико-химические характеристики растворов хитозана / И. А. Евдокимов, С. В. Василисин, Л. Р. Алиева [и др.] // Вестник СевГТУ, серия «Продовольствие». – 2003. – №1 (6).
- Лабинская А. С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинской, Л. П. Бленковой, А. С. Ещиной // – М. : Медицина, - 2004. – С. 216–219.
- Поліщук Н. М. Дослідження чутливості та швидкості формування резистентності штамів *Yersinia enterocolitica* до похідних 4*H*-піридо[4,3':5,6]пірано[2,3-*d*]піримідинів / Н. М. Поліщук, І. Ю. Кучма, В. В. Казмірчук [и др.] // Вісник проблем біології і медицини. – 2010. – № 3. – С. 227–230.
- Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» : наказ МОЗ України від 05. 04. 2007 № 167 // Новини медицини і фармації. – 2007. – №18. – С. 1–7.
- Скрябин К. Г. Хитин и хитозан : Получение, свойства и применение / К. Г. Скрябин, Г. А. Вихорева, В. П. Варламов // – М.: Наука, - 2002. – 368 с.
- Суходуб Л. Б. Біосумісні кальцій фосфатні покриття для металевих імплантатів / Л. Б. Суходуб, А. Ю. Волянський, Л. Ф. Суходуб [та ін.] // Аналіз Мечніковського інституту. – 2011. – №4. – С. 252-258.
- Суходуб Л.Б. Вплив протимікробних компонентів біокмозитних матеріалів на основі гідроксиапатиту на адгезію мікроорганізмів / Л.Б. Суходуб, Т.П. Осолодченко, Г.Є. Христян [та ін.] // Запорізький медичний журнал. – 2014. – № 2. – С. 112-114.

10. Di Martino Chitosan : A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering / A. Di Martino // Biomaterials. – 2005. – Vol. 26. – P. 5983-5990.
11. Helander I. M. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria / I. M. Helander, E. L. Nurmiaho-Lassila, R. Ahvenainen [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2001. – Vol. 71. – P. 235–244.
12. Ming Kong Antimicrobial properties of chitosan and mode of action : A state of the art review / Ming Kong, Xi Guang Chen, Ke Xing [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2010. – Vol. 144. – P. 51–63.
13. Rabea E. I. Chitosan as antimicrobial agent : application and mode of action /E. I. Rabea, M. E. Badawy, C. V Stevens [et al.] // Biomacromol. – 2003. – Vol. 4. № 6. – P.1457–1465.
14. Uchida Y. Antibacterial activity by chitin and chitosan /Y. Uchida // Food Chemical. – 1998. – Vol. 2. – P. 22–29.

**Реферати**

**СКОРОСТЬ ФОРМИРОВАНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ  
МИКРООРГАНИЗМОВ К ХИТОЗАНУ**  
Христьян Г. Е., Суходуб Л. Б., Щербак О. Н., Шульга Н. Н.,  
Казмирчук В. В.

Экспериментально изучено скорость формирования резистентности грамположительных, грамотрицательных бактерий и грибов рода *Candida* к хитозанам с разной молекулярной массой. При тридцатикратном культивировании микроорганизмов на средах, содержащих возрастающие концентрации изучаемых веществ, было установлено медленное формирование резистентности к ним. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования хитозанов в качестве противомикробного компонента при создании нанокomпозитных материалов биомедицинского назначения.

**Ключевые слова:** хитозан, микроорганизмы, резистентность, нанокomпозитные материалы.

Стаття надійшла 15.10.2014 р.

**VELOCITY OF THE MICROORGANISM RESIS-  
TANCE FORMATION AGAINST CHITOSAN**  
Khchristyan G. E., Sukhodub L. B., Shcherbak O. N.,  
Schulga N. M., Kazmirchuk V. V.

Experimentally studied the formation rate of resistance of Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi of the genus *Candida* to the chitosan with different molecular weights. When thirtyfold culturing microorganisms in media containing increasing concentrations of test substances was set slow development of resistance to them. The results suggest the possibility of using chitosan as an antimicrobial component for making nanocomposite materials for biomedical applications.

**Key words:** chitosan, microorganisms, resistance, nanocomposite materials.

Рецензент Куц О.Г.

УДК 612.017.1:616-099-092.9:547.911-311-145.82

**Н. Г. Щербак, Ю. К. Резуненко, М. А. Кучерявиченко, О. В. Николаева**  
Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков

**СОСТОЯНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ЖИВОТНЫХ В  
УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО СУБТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛАПРОКСИДОВ**

Изучено влияние субтоксических доз лапроксидов Л-303 и Л-500 на аллергенные свойства и состояние клеточного и гуморального иммунитета экспериментальных животных. Тестирование лапроксидом Л-303 выявило клинические и кожные проявления сенсibilизации животных, а также отсутствие таковых при тестировании Л-500. В дозах 1/100 и 1/1000 ЛД<sub>50</sub> Л-303 ингибирует клеточный и гуморальный иммунитет, синтез ДНК, РНК и белка, стимулирует развитие провоспалительных реакций. Лапроксид Л-500 в дозе 1/100 ЛД<sub>50</sub> ингибирует клеточный и гуморальный иммунитет, подавляет синтез ДНК, РНК и белка на фоне активации проластомных цитокинов. Установлено, что Л-500 в 1/100 ЛД<sub>50</sub>, а Л-303 в 1/100 и 1/1000 ЛД<sub>50</sub> формируют развитие иммунологической недостаточности и дисфункции иммунологической реактивности.

**Ключевые слова:** ксенобиотики, лапроксиды, сенсibilизация, иммунологическая недостаточность.

*Работа является фрагментом НИР „Изучение механизмов биологического действия простых полиэфилов в связи с проблемой охраны окружающей среды” (№ государственной регистрации 0110U001812).*

Стремительное развитие химической, нефтеперерабатывающей, фармацевтической, металлургической, машиностроительной промышленности, интенсивная химизация сельского хозяйства и использование большого ассортимента химических средств в быту, создают реальную угрозу глобального загрязнения окружающей среды ксенобиотиками. Среди ксенобиотиков встречаются соединения представляющие, как потенциальную, так и непосредственную опасность для здоровья населения. Многочисленные исследования свидетельствуют, что ведущая роль в его сохранении и укреплении принадлежит интегративным системам контроля гомеостатической функции организма: нервной, эндокринной и иммунной [1, 2, 5]. Большие объемы и широкое внедрение в производство и быт лапроксидов, ставят важную и актуальную задачу оперативной и своевременной оценки потенциальной опасности данных ксенобиотков для теплокровных животных и человека. Это в полной мере относится и к изучению влияния данной группы соединений на состояние иммунобиологической реактивности в условиях длительного субтоксического воздействия на организм [2]. При этом, весьма важным является оценка аллергенности и сенсibilизирующих свойств химических веществ, которые самым тесным