

УДК 615. 281 [6:539] – 022.532

ВЛИЯНИЕ РАСТВОРОВ ХИТОЗАНА НА КЛИНИЧЕСКИЕ ШТАММЫ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Е.В. ГЛАДКОВА, И.В. БАБУШКИНА, И.А. МАМОНОВА, С.В. БЕЛОВА

ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России
410002, ул. Чернышевского, 148, тел. 8(8452) 234668, sarniito-lab@yandex.ru

Аннотация. Целью работы было сравнительное изучение антибактериального действия растворов хитозана различной концентрации в ацетатном буфере на клинических метиллинрезистентных штаммах *Staphylococcus aureus*.

Установлены как антибактериальная активность хитозана, так и его ростостимулирующие свойства в отношении изучаемых штаммов в зависимости от pH среды и конечной концентрации хитозана в субстрате. Перспектива использования хитозана в растворах в качестве антибактериального средства для лечения гнойно-воспалительных осложнений, вызванных золотистым стафилококком, требует детального изучения условий применения.

Ключевые слова: метициллинрезистентность, *Staphylococcus aureus*, антибактериальные свойства, ростостимулирующие свойства.

INFLUENCE OF CHITOSAN SOLUTIONS ON CLINICAL STRAINS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

E.V. GLADKOVA, I.V. BABUSHKINA, I.A. MAMONOVA, S.V. BELOVA

Federal Government-Financed Institution "Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopaedics" of
Ministry of Public Health and Social Development of the Russian Federation
410002, Chernyshevskogo St. 148, Ph. 8 (8452) 234668, sarniito-lab@yandex.ru

Resume. The research objective was a comparative study of antibacterial action of chitosan solutions of various concentration in the acetate buffer on clinical strains *Staphylococcus aureus*. Both chitosan antibacterial activity and its growth stimulating characteristics concerning MRSA depending on pH medium and the finite chitosan concentration in a substratum are determined. The prospect of use of chitosan in solutions as an antibacterial agent for treatment of suppurative inflammatory complications caused by aureococcus, requires a detailed study of application conditions.

Key words: MRSA, *Staphylococcus aureus*, chitosan, antibacterial activity, growth stimulating characteristics.

Одним из актуальных вопросов современной травматологии и ортопедии остается проблема профилактики, возникновения и лечения инфекционных осложнений [3].

При исследовании гнойных очагов пациентов травматолого-ортопедического профиля выявляется разнообразная микрофлора: *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.* [2]. Наиболее часто высеивающийся у пациентов хирургических стационаров возбудитель - *Staphylococcus aureus*, характеризуется, как правило, полиантибиотикорезистентностью [2, 7].

Несмотря на внедрение современных антибактериальных препаратов, проблема поиска и разработки новых антибактериальных средств, характеризующихся высокой антимикробной активностью, отсутствием иммунодепрессивного действия, минимальной аллергенностью и токсичностью, остается открытой.

Ключевым требованием, предъявляемым к данной категории средств, является биосовместимость и биodeградируемость. В свете данных характеристик пристальное внимание уделяется природному биополимеру хитозану, обладающему широким спектром биологических свойств [5, 6]. Одним из ведущих свойств хитозана являются его выраженные антибактериальные свойства [4]. Механизм его действия реализуется, в первую очередь, посредством влияния на клеточную мембрану [1].

Целью работы явилось сравнительное изучение антибактериального действия растворов хитозана различной концентрации в ацетатном буфере на клинических штаммах *St. aureus*.

Исследования проводили на 30 штаммах *St. aureus*, полученных от 30 больных с развившимися гнойными осложнениями, находящимися на лечении в травматолого-ортопедическом стационаре СарНИИТО. Посев на твердую питательную среду Nutrigen Agar (Becton Dickinson, США), выделение *St. aureus* производили общепринятыми методами. Идентификация штаммов осуществлялась с использованием анализатора микробиологического BBL Auto Reader BD (Becton Dickinson, США). О метициллинрезистентности судили по результатам скрининговых исследований с использованием MeReSa Agar Base (MRSA Alert Kit) (Becton Dickinson, США), основа агара для идентификации метициллинрезистент-

ных *St.aureus* (HiMediaLaboratories, Индия). Кроме того, определяли антибиотикочувствительность отобранных штаммов с использованием систем «Сенси-диск» (Becton Dickinson, США). В работе использовали хитозан с сорбционной активностью по ионам меди, мг/г, не менее 86,3; содержанием основного вещества не менее 93,4, с рН 1% р-ра не более 5,17 и динамической вязкостью не менее 101,7, произведенным ЗАО «Биопрогресс».

Изучали антибактериальную активность растворов хитозана в ацетатном буфере с различными значениями рН среды: 4,1; 4,96; 6,0. Концентрация хитозана составляла: опытная группа 1 - 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 мг/мл. К исследуемым растворам добавляли по 100 мкл конечной суспензии метициллинрезистентных *St.aureus* (MRSA) с содержанием 300000 КОЕ/мл в соответствующих растворителях, встряхивали и оставляли на 60 минут при комнатной температуре. После завершения времени воздействия бактериальную суспензию в количестве 100 мкл высевали на чашки с питательным агаром. После суточной инкубации в термостате при 37°С производили подсчет колоний. В качестве контроля использовали бактериальную взвесь в соответствующих растворителях.

Вторая серия экспериментов включала нанесение бактериальной суспензии (1000 КОЕ) на поверхность чашек Петри с твердой питательной средой и хитозаном. После суточной инкубации при 37°С производили подсчет колоний.

Статистическая обработка материала включала в себя подсчет средних значений (M), их среднеквадратичных ошибок (m) и уровня достоверности (p).

Результаты подсчета количества колоний, выросших на твердых питательных средах после воздействия растворов хитозана представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние рН среды и концентрации хитозана на ростовые свойства MRSA

Концентрация хитозана, мг/мл	Количество микробных клеток на твердых питательных средах			
	Растворители			
	Изотонический р-р NaCl	Ацетатный буфер, рН=4,1	Ацетатный буфер, рН=4,96	Ацетатный буфер рН=6,0
0 (контроль)	1058,8±104,8	356,0±7,4	446,87±34,7	560,0±36,0
0,1	374,3±34,8***	466,7±3,9***	587,37±52,2**	406,4±21,6***
0,2	281,8±26,6***	326,7±13,5	564,5±24,8*	476,8±20,5**
0,5	254,5±20,9***	196,0±15,8***	659,0±30,2***	392,8±30,4***
1,0	451,5±63,9***	228,0±18,7***	534,0±47,7	579,2±31,7
2,0	288,1±72,0***	332,0±18,7	417,8±33,0	355,2±31,3***
5,0	244,9±67,7***	400±16,2**	336,9±47,2	355,2±27,0***

Примечание: *** p<0,001 по отношению к контрольной группе; ** p<0,05 по отношению к контрольной группе; * p<0,01 по отношению к контрольной группе.

Число микроорганизмов, выросших на твердой питательной среде после 60-минутного воздействия хитозана в физиологическом растворе при всех концентрациях хитозана, было ниже (p<0,001), чем в контроле. Раствор хитозана в ацетатном буфере при рН=4,1 демонстрировал ростстимулирующие свойства в отношении клинических штаммов стафилококка в концентрации 0,1 мг/мл (p<0,001), 5,0 мг/мл (p<0,05). Ингибирующие свойства (p<0,001) раствора хитозана в ацетатном буфере (рН=4,1) подтверждены при концентрации действующего вещества 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл. Растворы хитозана с более низкой концентрацией действующего вещества: 0,1 мг/мл (p<0,05), 0,2 мг/мл (p<0,01) и 0,5 мг/мл (p<0,001) проявляли ростстимулирующий эффект. При повышении рН до 6,0 было отмечено ярко выраженное антибактериальное действие (p<0,001) растворов хитозана с концентрацией 0,1 мг/мл; 0,5 мг/мл; 2,0 мг/мл; 5,0 мг/мл, а также -0,2 мг/мл (p<0,05).

Внесение хитозана непосредственно в среду АГВ приводило к ингибции роста микроорганизмов уже при концентрации 1 мг/мл хитозана в субстрате и к полному прекращению роста бактериальных клеток при концентрациях 2 мг/мл и 5 мг/мл. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние хитозана в твердых питательных средах на ростовые свойства клинических штаммов стафилококка

Контроль, КОЕ	Исследуемые группы		
	1 мг/мл хитозана в твердой питательной среде, КОЕ/мл	2 мг/мл хитозана в твердой питательной среде, КОЕ/мл	3 мг/мл хитозана в твердой питательной среде, КОЕ/мл
1957,1±34,1	908,3±19,3***	Роста нет	Роста нет

Примечание: *** p<0,001 по отношению к контрольной группе.

Таким образом, установлены как антибактериальная активность хитозана в отношении метициллин-резистентных клинических штаммов стафилококка, так и его ростстимулирующие свойства в отношении данного возбудителя. Выявленные особенности требуют учета условий воздействия, таких как pH среды и конечной концентрации хитозана в субстрате. Перспектива использования природного биополимера хитозана в растворах в качестве антибактериального средства для лечения гнойно-воспалительных осложнений, вызванных золотистым стафилококком, требует детального изучения условий применения.

Литература

1. Куликов, С.Н. Исследование бактерицидных свойств хитозана / С.Н. Куликов // Рыбпром, 2010. – № 2. – С.36–41.
2. Науменко, З.С. Устойчивость *Staphylococcus aureus* к антибактериальным препаратам / З.С. Науменко, Л.В. Розова // Гений ортопедии, 2007. – № 2. – С.36–38.
3. Пхакадзе, Т.Я. Выбор антибактериальных средств для профилактики и лечения инфекционных осложнений у травматолого-ортопедических больных на основе микробиологического мониторинга / Т.Я. Пхакадзе, Г.Г. Окропиридзе, Э.С. Малышева // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, 2009. – № 4. – С.73–78.
4. Регенерирующая активность и антимикробное действие низкомолекулярного хитозана / Т.А. Байтукалов, О.А. Богословская, И.П. Ольховская [и др.] // Изв. РАН. Сер. Биология. 2005, Т. 32. С. 659–663.
5. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова – М.: Наука, 2002. – 368 с.
6. Шаповалов, С.Г. Современные раневые покрытия в комбустологии / С.Г. Шаповалов // ФАР-Миндекс-Практик, 2005. – Вып. 8. – С.38–46.
7. Эпидемиология антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в России: результаты многоцентрового исследования / А.В. Дехнич, И.А. Эйдельштейн, А.Д. Нарезкина [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2002. – Т.4. – № 4. – С.325–336.