



Биол. журн. Армении, 1 (67), 2015

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНОВЫХ ПЛЕНОК, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПИРАЗОЛ КАРБОНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

А.Э. АКОПЯН¹, А.А. МАРГАРЯН², О.С. АТТАРЯН¹, Г.В. АСРАТЯН³,
И.Л. БАЗУКЯН², О.А. ПАНОСЯН², А.А. ТРЧУНЯН²

¹Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА,
Институт органической химии

²Ереванский государственный университет

³Институт прикладной химии “АРИАК” РА

arminemargaryan@ysu.am

С применением пиразол карбоновых кислот было получено 10 различных модификаций хитозанов. Изучена антимикробная активность полученных модификаций как в виде пленок, так и различных концентраций растворов хитозанов. Наибольшую антибактериальную активность проявляет карбокси-пиразол модифицированный хитозан. Наличие формил- групп в четвертом положении пиразолового кольца увеличивает антибактериальную активность хитозанов по сравнению с другими модификациями.

Показана высокая антимикробная активность по отношению к эндоспорообразующим грамположительным бактериям. Модифицированные хитозаны не обладали антигрибковой активностью.

Модификации хитозанов – пиразол карбоновые кислоты – антимикробная активность

Պիրազոլկարբոնաթթուների կիրառմամբ ստացվել են ձևափոխված խիտոզանների 10 տարբերակներ: Ուսումնասիրվել էին ինչպես ձևափոխված խիտոզանային թաղանթների, այնպես էլ դրանց ջրային լուծույթների հակամանրէային ակտիվությունը: Կարբոքսիպիրազոլ ձևափոխված խիտոզանը օժտված է ավելի բարձր հակամանրէային ակտիվությամբ: Պիրազոլային օղակի չորրորդ դիրքում ֆորմիլ խմբի առկայությունը, այլ ձևափոխությունների հետ համեմատ, բարձրացնում է խիտոզանների հակաբակտերիալական ակտիվությունը: Ցույց է տրվել, որ ձևափոխված խիտոզանները արգելակում են էնդոսպոր առաջացնող գրամդրական մանրէների աճը, սակայն չեն ձևափոխում սնկերի աճը:

Խիտոզանի ձևափոխություններ – պիրազոլկարբոնաթթուներ – հակամանրէային ակտիվություն

Ten different chitosan modifications have been synthesized by using of pyrazole carbonic acids. The antimicrobial activity of modified chitosan's films, as well as different solutions of modified chitosans was studied. The presence of formic group at fourth position in pyrazolic chain has increased the antimicrobial activity of chitosans compared with other modifications. High antibacterial and no antifungal activity of modified chitosans against endospore-forming gram positive bacteria were shown.

Modification of chitasan – pyrazole carbonic acid – antimicrobial activity

Хитозан, деацетилованный производный хитина – линейный биополимер, состоящий из β -(1-4)-связанного N-ацетил-D-глюкозамина [9]. Благодаря уникальной поликатионной природе хитозаны и его производные обладают широким спектром антимикробной активности и были предложены для применения в медицине, пищевой и фармацевтической промышленности, сельском хозяйстве [4].

Различные теории о механизме антимикробного действия хитозанов были предложены в последнее время [6]. Одной из теорий является гипотеза “внутриклеточной утечки” [6,7]. Положительно заряженные хитозаны связываются с отрицательно заряженной поверхностью бактериальной клетки, что приводит к изменению проницаемости мембран. Последнее приводит к гибели клеток [7, 8]. Однако при нейтральном и высоком pH среды хитозаны теряют положительно заряженные группы аминокислот, становясь малорастворимыми. Это ограничивает их употребление [3, 9]. Различные модификации хитозанов, такие как N-алкилированный хитозан с производными моносахаридов, а также хитозан-O-поли(этилен гликоль) были получены для улучшения водорастворимости и усиления биологической активности хитозанов [5]. Традиционный метод модификации хитозанов основывается на ковалентном связывании химических групп, что обычно трудно выполнимо, а иногда и меняет некоторые их свойства [9].

Целью данной работы являлось получение новых четвертичных аммониевых солей хитозана с пиразол карбоновыми кислотами и изучение их антимикробной активности.

Материал и методика. Для получения новых модификаций хитозанов в качестве модификаторов были синтезированы и применены следующие пиразол карбоновые кислоты: 1-карбок시에тилпиразол(I), 1-карбоксиетил-3-метилпиразол(II), 3-[2-(3-пионо-метилпиразол-1-ил)этиламино] пропионовая кислота(III), (3-(4'-формилпиразол-1'-ил) пропионовая кислота(IV) и 3-(4'-формил-3'-метилпиразол-1'-ил) пропионовая кислота(V).

В исследованиях использовали хитозан (Sigma Aldrich) с низкой (α -Mr=300 кДа) и средней (β -Mr = 600 кДа) молекулярной массой. Для получения модификации хитозанов были взяты водные растворы пиразол карбоновой кислоты и хитозана в молярных соотношениях 1:1.3. Пиразол карбоновые кислоты растворяли в воде, нагревая до 60°C и при перемешивании порциями добавляли хитозан [9]. Полученные хитозановые пленки сушили при комнатной температуре. На рис.1 изображены формулы полученных модификаций хитозана.

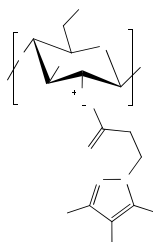


Рис.1. Формулы полученных модификаций хитозана.

Для определения антимикробных свойств модифицированных хитозанов в качестве тест-организмов использовали *Escherichia coli* VKPM-M17, *Staphylococcus aureus* WDCM 5233, *Bacillus subtilis* WT-A1 и *Aspergillus flavus* WT. Предварительно тест-культуры бактерий выращивали в питательном бульоне в течение 12-16 ч при оптимальной температуре. В случае изучения антигрибковой активности на среду

добавляли *A. flavus* в расчете 10^4 спор на чашку Петри [2]. Для предварительного скрининга наиболее активных модификаций хитозанов была изучена антибактериальная активность хитозановых пленок, вырезанных в виде дисков с диаметром 5 мм. Пленки были предварительно стерилизованы ультрафиолетом на расстоянии 20 см в течение 30 мин (продолжительность обработки и расстояние подобраны эмпирически). Стерильные диски выкладывали на поверхность засеянной тест-культурой среды.

Определение антибактериальных свойств водных растворов модифицированных хитозанов (1, 10, 20 мг/мл) проводили методом диффузии в агар с использованием лунок (8 мм). В лунки вносили по 0,1 мл изучаемых растворов. Чашки Петри предварительно выдерживали в холодильнике в течение двух часов для диффундирования исследуемого вещества.

О наличии антибактериальной активности судили по результатам 3-х независимых экспериментов, по образованию зон отсутствия роста тест-организмов после 24-часового инкубирования. Зону подавления роста диаметром 2 мм по меньшей мере регистрировали как положительный результат [1].

Результаты и обсуждение. Применением пиразол карбоновых кислот были получены модифицированные хитозановые пленки с низкой и средней молекулярной массой хитозана.

Исследование антимикробной активности дисков полученных пленок хитозанов выявило ярко выраженную антибактериальную активность. Результаты обобщены в табл. 1.

Таблица 1. Антимикробная активность дисков хитозановых пленок

Модифицированный хитозан	Диаметр отсутствия роста тест-культур (Ø см)			
	<i>B. subtilis</i> WT-A1	<i>S. aureus</i> WDCM 5233	<i>E. coli</i> VKPM-M17	<i>A. flavus</i> WT
Ia	0.3	0.6	0	0
Iб	0.2	0	0	0
IIa	0.3	0.6	0.3	0
IIб	0	0	0	0
IIIa	0.2	0.2	0	0
IIIб	0.1	0	0	0
IVa	2.5	2.8	2.5	0
IVб	2.0	2.0	2.0	0
Va	1.5	2.0	2.5	0
Vб	2.0	2.5	2.0	0

*стандартное отклонение составляло ± 0.1 см

Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что все модифицированные хитозаны обладали антибактериальной активностью, за исключением пленок модифицированного хитозана IIб. Модифицированный же хитозан IIIб только незначительно ингибировал рост эндоспорообразующих бактерий. Диски модифицированных хитозанов Ia и IIIa подавляли рост только грамположительных бактерий. Особый интерес представляли пробы IVa, IVб, Va и Vб, которые подавляли рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, следовательно, они имеют широкий спектр действия. Модифицированные хитозановые пленки низкой молекулярной массы проявляли большую антибактериальную активность по сравнению с модифицированными хитозановыми пленками средней молекулярной массы.

Большинство модифицированных хитозанов подавляло рост грамположительных, эндоспорообразующих бактерий, однако ни один из хитозанов не подавлял роста мицелиального гриба *A. flavus* WT.

Исследование антибактериальной активности растворов указанных образцов выявило аналогичные результаты (табл. 2).

Растворы хитозановых пленок проявляют антибактериальную активность по отношению к *B. subtilis* WT-A1 в концентрациях 20 мг/мл (рис. 2). Образцы не демонстрировали антибактериальную активность при низких концентрациях (1 мг/мл).

Таблица 2. Антимикробная активность растворов хитозановых пленок

Модифицированный хитозан	Диаметр отсутствия роста тест-культур (Ø см)								
	<i>B. subtilis</i> WT-A1			<i>S. aureus</i> WDCM-5233			<i>E. coli</i> VKPM-M17		
	Концентрация модифицированного хитозана мг/мл								
	1	10	20	1	10	20	1	10	20
Ia	0	0	2.0	0	0	0.6	0	0	0
Iб	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0
IIa	0	0	1.0	0	0	1.0	0	0	0.6
IIб	0	0	1.0	0	0	1.0	0	0	0
IIIa	0	0	2.5	0	0	3.0	0	0	2.5
IIIб	0	0	2.0	0	0	1.5	0	0	0
IVa	0	3.0	3.0	0	1.5	3.0	0	0	3.0
IVб	0	1.0	2.0	0	0	2.0	0	0	2.8
Va	0	1.5	2.0	0	0	2.0	0	0	3.0
Vб	0	2.0	2.5	0	0	2.5	0	0	2.0

*стандартное отклонение составляло ± 0.1 см

При исследовании растворов хитозановых пленок в некоторых случаях наблюдается увеличение зоны подавления роста тест-организма. Несмотря на то что образцы подавляли рост эндоспорообразующих бактерий, антигрибковая активность не проявлялась даже при высоких концентрациях.

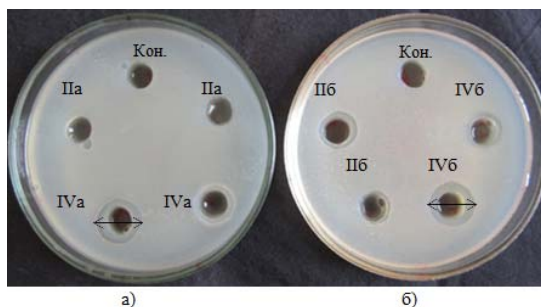


Рис. 2. Антибактериальная активность растворов хитозановых пленок по отношению к *B. subtilis* в концентрациях 10 мг/мл (а) и 20 мг/мл (б).

Растворы модифицированных хитозановых пленок низкой молекулярной массы более активны по сравнению с таковыми, средней молекулярной массы, что наблюдалось и при изучении антимикробной активности сухих модифицированных пленок хитозанов.

С точки зрения химического строения очевидно, что наибольшую антибактериальную активность проявляет карбоксипиразол модифицированный хитозан. Однако в случае наличия формил- групп в четвертом положении пиразолового кольца антибактериальная активность хитозанов увеличивается по сравнению с другими модификациями (образцы IVa и IVб по сравнению с образцами Ia и Ib).

Хитозановые пленки, модифицированные пиразол карбоновыми кислотами, содержащими остаток пропионовой кислоты в первом положении

пиразолового кольца, более активны, чем пленки, модифицированные пиразол карбоновыми кислотами, содержащими остаток этиламинопропионовой кислоты (образцы Va и Vб по сравнению с образцами III а и III б).

Из результатов исследований пиразоловых пленок следует, что образцы проявляют высокую антибактериальную активность широкого спектра.

*"Получение хитозановых пленок выполнено при финансовой поддержке ГКН
МОН РА в рамках научного проекта N13Ap- 2e 031"*

ЛИТЕРАТУРА

1. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках, Издательство МГУ "Наука", 525 с., 2004.
2. *Петрусов А.И.* Практикум по микробиологии, Изд. Академия, М., 606 с., 2005.
3. *Chung Y.-Ch., Yeh J.-Y., Tsai Ch.-F.* Antibacterial characteristics and activity of water-soluble chitosan derivatives prepared by the millard reaction. *Molecules*, 16, pp. 8504-8514, 2011.
4. *Devlieghere F., Vermeulen A., Debevere J.* Chitosan: Antimicrobial activity, interaction with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables, *Food Microbiology*, 21, pp. 703-714, 2004.
5. *Gorochovceva N., Makuska R.* Synthesis and study of water-soluble chitosan-O-poly (ethylene glycol) graft copolymers. *European Polymer journal*, 40, pp. 685-691, 2004.
6. *Jeon S.J., Oh M., Yeo W.-S., Galvão K.N., Jeong K.C.* Underlying mechanism of antimicrobial activity of chitosan microparticles and implications for the treatment of infectious diseases. *Plos One*, 9, Issue 3, e92723, pp. 1-10, 2014.
7. *Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J.* Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, pp. 51-63, 2010.
8. *Rabea E.I., Badawy M.E.T., Stevens C.V., Smagghe G., Steurbaut W.* Chitosan as antimicrobial agent: application and mode of action. *Biomacromolecules*, 4, pp. 1457-1465, 2003.
9. *Yan Li, Xi G. Ch., Nan Liu, Cheng Sh. L., Chen G. L., Xiang H. M., Le Jun Yu, Kenedy J. F.* Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. *Carbohydrate polimers*, 67, pp. 227-232, 2007.

Поступила 12.09.2014