

УДК 579.23

С. Н. Куликов, Р.З. Хайруллин

АКТИВАЦИЯ ЛИЗОСТАФИНА

КАК СПОСОБ ОЦЕНКИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА ХИТОЗАНА

Ключевые слова: хитозан, антибактериальная активность, молекулярная масса, лизостафин.

Показана способность хитозанового полимера усиливать лизис лизостафином клеточных стенок стафилококков. Установлено, что усиление действия лизостафина зависит от молекулярной массы хитозана и уровня pH реакционной среды. В слабощелочных условиях наибольшим активирующим действием обладал хитозан со средней молекулярной массой, в слабощелочных условиях – низкомолекулярный образец. Результаты работы позволяют сделать предположение об одном из механизмов антибактериального действия хитозана, которое заключается в усилении деградации клеточной стенки бактерии собственными автолизинами в присутствии хитозанового полимера.

Keywords: chitosan, molecular weight, antibacterial activity, lysostaphin.

The ability of chitosan polymer enhance lysostaphin lysis of the cell walls of staphylococci was demonstrated. It has been found that the potentiation of lysostaphin activity depends on the molecular weight of chitosan and the pH of the reaction medium. In mildly acidic conditions chitosan had the greatest activating effect with an average molecular weight and in weakly alkaline conditions - low molecular weight sample had the greatest activating effect. The results of the lead to the assumption that one of the mechanisms of antibacterial action of chitosan, which is to enhance the degradation of the cell wall of the bacteria in the presence of their own autolysins by chitosan polymer.

Введение

Хитозан – группа веществ, представляющая собой гетерополимер, состоящий из остатков глюкозамина и ацетилглюкозамина, различающихся по молекулярной массе, степени дезацетилирования, расположению ацетилированных и дезацетилированных остатков вдоль полимерной цепи и другими молекулярно-массовыми параметрами. Такая вариация химической структуры хитозана влияет на проявление им биологической активности, в частности – антибактериальной активности [1-4].

Обычно определение антибактериальной активности хитозана сводится к оценке его минимальной бактериостатической (ингибирующей) и/или минимальной бактерицидной концентраций в отношении бактерий, которое требует длительной, от 24 до 48 ч, инкубации [5]. Кроме того, использование живых условно-патогенных бактерий ведёт к необходимости соблюдения специальных требований норм безопасности и дополнительных специальных условий, например, наличие стерильного бокса, необходимость подготовки стерильной посуды и питательных сред.

Вместе с тем, известно, что антибактериальное действие хитозана, как и других антибактериальных веществ, определяются теми биохимическими процессами, которые подвергаются изменению под их воздействием. Одним из механизмов действия хитозана может являться активация этим полимером ферментативного разрушения клеток бактерий. Известно, что в клеточных стенках всех грамположительных бактерий, к которым относятся и стафилококки, содержатся автолизины – ферменты,

участвующие в деградации гликопептидной основы клеточной стенки в процессе роста и деления бактериальных клеток. В регуляции активности этих ферментов принимают участие тейхоевые и тейхуроновые кислоты – отрицательно-заряженные полимерные компоненты клеточных стенок грамположительных прокариот. Отрицательно-заряженные тейхоевые и тейхуроновые кислоты за счёт электростатического взаимодействия связывают автолизины, которые заряжены положительно (характерная особенность для всех автолизинов), тем самым препятствуя их чрезмерному вовлечению в деградацию гликопептида клеточной стенки [6]. Поэтому, искусственное высвобождение автолизинов из их комплекса с тейхоевыми и тейхуроновыми кислотами способно привести к усилению ферментативного расщепления гликопептида клеточной стенки, приводящее к лизису всей клеточной стенки и гибели самой бактериальной клетки. Такими веществами могут выступать положительно-заряженные молекулы, в особенности поликатионные, которые будут конкурентно вытеснять автолизины из их комплекса с полианионными кислотами клеточных стенок. В литературе описан эффект усиления действия автолитических ферментов бактерий на клеточные стенки при добавлении положительно-заряженных веществ белковой природы, также показано, что это связано именно с препятствованием этими веществами связывания автолизинов с тейхоевыми и тейхуроновыми кислотами [7]. Учитывая поликатионную природу хитозана он также способен проявлять свои антибактериальные свойства посредством активации ферментативного разрушения клеток бактерий.

В связи с этим задачей настоящей работы являлась разработка простого способа, позволяющая быстро определять антибактериальный потенциал (активность) хитозана в отношении грамположительных бактерий, путём оценки активации хитозановым полимером ферментативного разрушения (лизиса) клеток бактерий.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования использовали высокомолекулярный крабовый хитозан со средневязкостной молекулярной массой (M_w) 400 кДа и степенью дезацетилирования 85% (ЗАО «Биопрогресс», Московская Область), а также образцы хитозанов полученные методом ферментативного гидролиза высокомолекулярного с использованием ферментного препарата Целловиридин Г20х [8] с M_w 120, 30 и 5,5 кДа и степенью дезацетилирования 85, 87 и 90%, соответственно. Средневязкостную молекулярную массу хитозана рассчитывали из уравнения Марка-Хаувинка для хитозанов с различной степенью дезацетилирования согласно [9], степень дезацетилирования определяли как описано в работе [8]. В качестве мономера использовали глюкозамин (Sigma). Образцы хитозана перед экспериментом готовили как описано в работе [10].

В работе использовали штамм грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* ATCC 35591.

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) образцов хитозана в отношении стафилококка определяли по методу [10]. Оценку МИК проводили по результатам трёх независимых экспериментов.

Оценку лизирующей активности лизостафина и влияние на этот процесс хитозана проводили в соответствии с модифицированным методом [7]. В качестве лизирующего фермента (аналога автолизина) использовали лизостафин (E.C.3.4.24.75) из *Staphylococcus staphylolyticus* (Sigma). В качестве субстрата использовали термически инактивированные клетки *S. aureus* в виде суспензии в 0,05 М MES-ACES-TES-Na буфере с pH 6,5 и 7,5 с оптической плотностью 0,300 при 600 нм. В опытном варианте добавляли к суспензии клеток аликвоту раствора хитозана до конечной концентрации равной 20 мкг/мл, затем 1U лизостафина. Полученную смесь инкубировали при температуре 37°C. За единицу активности фермента принимали уменьшение оптической плотности суспензии клеток на 0,001 за 1 мин. Активность фермента активированную хитозаном рассчитывали вычитая из общей активности в опыте с хитозаном величину активности фермента в отсутствие полимера.

Результаты и их обсуждение

Было установлено, что лизостафин эффективно лизирует клетки стафилококков, по падению оптической плотности клеточных суспензий. Благодаря предварительной термической инактивации бактериальных клеток также

обеспечивалась и инактивация собственных автолитических ферментов бактерий, содержащихся в клеточной стенке. Таким образом, в лизисе клеточных стенок участвовал только вносимый фермент – лизостафин.

В слабокислых условиях (pH 6,5) добавление в реакционную смесь хитозанов усиливало литический эффект лизостафина (табл 1). Как видно из таблицы величина активации хитозаном литического действия фермента зависело от молекулярной массы хитозанового полимера. Эта величина не имела прямой зависимости от молекулярной массы поликатиона – наибольшим эффектом усиления активности лизостафина демонстрировал образец со средней M_w , составляющий 30 кДа. Близким значением активации фермента обладал образец с M_w 120 кДа. Дальнейшее увеличение молекулярной массы полимера ещё более уменьшало способность хитозана активировать лизис клеток.

Таблица 1 – Зависимость активации лизостафина и минимальной ингибирующей концентрации хитозана от молекулярной массы хитозанового полимера

Молекулярная масса хитозана $M_w \cdot 10^{-3}$	Ед. акт.	МИК
pH 6,5		
400,0	91	250
120,0	120	104
30,0	125	83
16,0	102	125
5,5	85	250
0,2	25	>1000
pH 7,5		
400,0	34	>1000
120,0	45	>1000
30,0	106	666
16,0	136	500
5,5	158	333
0,2	26	>1000

При уменьшении молекулярной массы поликатиона также наблюдалось падение способности хитозана активировать действие лизостафина (табл 1). При этом мономер хитозана – глюкозамин – практически был неактивен.

Полученные результаты по активации литического действия лизостафина хитозанами в отношении инактивированных клеток стафилококка согласуются с показателями МИК данных образцов полимера в отношении живых клеток *S. aureus*. Наибольшей антибактериальной активностью обладал хитозан с M_w 30 кДа, который обладал и максимальной способностью активировать литическое действие лизостафина. Антибактериальная активность образцов также снижалась при уменьшении или увеличении их молекулярной массы.

Схожие данные были получены и при определении влияния хитозана на литическое

действие лизостафина и МИК в слабощелочных условиях (рН 7,5) с той разницей, что наибольшей антибактериальной активностью обладал образец с M_n 5,5 кДа (табл 1). Тогда как более высокомолекулярные хитозаны в этих условиях были малоактивны. Это связано с тем, что в щелочной среде свободные аминогруппы хитозана теряют свой положительный заряд и полимер выпадает в осадок теряя и свои антибактериальные свойства. Известно, что низкомолекулярные хитозаны обладают лучшей растворимостью, что и обуславливает сохранение их антибактериальных свойств в слабощелочных условиях [5, 10]. Эти данные согласуются с результатами по антибактериальной активности в отношении *S. aureus*, полученными нами ранее при использовании образцов хитоолигосахаридов с различной молекулярной массой, полученных химическим гидролизом [10].

Проведенные исследования показали, что антибактериальная активность хитозана зависит от молекулярной массы полимера, а его антибактериальный потенциал можно определять путём оценки активации хитозановым полимером ферментативного разрушения (лизиса) клеток бактерий. Выявленный в работе эффект также открывает возможность использования данного эффекта для увеличения ферментативного извлечения белков из клеточных стенок бактерий при производстве бактериальных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке регионального гранта Российского фонда фундаментальных исследований №12-04-97039 р_поволжье_a.

Литература

1. Куликов, С.Н. Роль структуры в биологической активности хитозана / С.Н. Куликов, Ю.А. Тюрин, Д.А. Долбин, Р.З. Хайруллин // Вестник Казанского технологического университета, - 2007. - №6. - С. 10-14.
2. Куликов, С.Н. Антибактериальная и антимикотическая активность хитозана: механизм действия и роль структуры / С.Н. Куликов, Ю.А. Тюрин, Р.С. Фассахов, В.П. Варламов // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. - 2009. - №5. - С. 91-97.
3. Хайруллин, Р.З. Зависимость растворимости хитозана от молекулярной массы и значения рН среды / Р.З. Хайруллин, С.Н. Куликов, В.Е. Тихонов, Е.А. Степнова, С.А. Лопатин, В.П. Варламов // Вестник Казанского технологического университета, - 2010. - №7. - С. 148-152.
4. Tharanathan, R.N. Chitin – the undisputed biomolecule of great potential / R.N. Tharanathan, F.S. Kittur // Crit. Rev. Nutr. – 2003. – V. 43. – P. 61-87.
5. Герасименко, Д.В. Антибактериальная активность водорастворимых низкомолекулярных хитозанов в отношении различных микроорганизмов / Д.В. Герасименко, И.Д. Авдиенко, Г.Е. Банникова, О.Ю. Зуева, В.П. Варламов // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40. – №3. – С. 301-306.
6. Дмитриева, Н.Ф. Липотейхоевые и тейхоевые кислоты патогенных стрептококков: структура, функции, роль во взаимодействии возбудителя с макроорганизмом / Н.Ф. Дмитриева, Ю.М. Тимофеев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. – №6. – С. 100-107.
7. Bierbaum, G. Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22: influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase / G. Bierbaum, H.G. Sahl // J. Bacteriol. – 1987. – V. 169. – P. 5452-5458.
8. Ильина, А.В. Демонстрация хитозана ферментным препаратом Целловиридин Г20х / А.В. Ильина, Ю.В. Ткачёва, В.П. Варламов // Прикл. биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38. – №2. – С. 132-135.
9. Wang, W. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degree of deacetylation / W. Wang, S. Bo, S. Li, W. Qin // Int. J. Biol. Macromol. – 1991. V 13. – №5. – P. 281-285.
10. Kulikov, S. Molecular weight and pH aspects of efficacy of oligochitosan against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / S. Kulikov, V. Tikhonov, I. Blagodatskikh, E. Bezrodnykh, S. Lopatin, R. Khairullin, Yu. Philippova, S. Abramchuk // Carb. Polymers. – 2012. – V. 87. – №1. – P. 545-550.

© С. Н. Куликов – канд. биол. наук, с.н.с. лаб. иммунологии и разработки аллергенов Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, kuliks@yandex.ru; Р. З. Хайруллин – ст. препод. каф. промышленной безопасности КНИТУ, khairullinrz@gmail.com.