

DOI: <https://doi.org/10.51922/2074-5044.2022.3.40>

В. В. Машель¹, Г. Г. Кондратенко², А. И. Протасевич²,
П. С. Неверов²

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОВОЛОКОН ХИТОЗАНА И ЕГО МОДИФИКАЦИЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ

УЗ «10-ая городская клиническая больница г. Минска»¹
УО «Белорусский государственный медицинский университет»²

Проблема лечения инфицированных и длительно незаживающих ран остаётся актуальной в современной хирургии. Количество внутрибольничных полирезистентных штаммов бактерий увеличивается, что уменьшает значимость антибиотикотерапии. Одним из вариантов решения этой проблемы является разработка новых средств и методов местного лечения, в частности, создание новых высокоэффективных раневых покрытий с антибактериальными и репаративными свойствами. Хитозан – природный биополимер, имеющий собственную антимикробную активность, гемостатическое и сорбционное действия, способность к биодegradации и биостимуляции репаративных процессов. За счёт аминогрупп хитозан может выступать носителем для антисептических агентов, таких как ионы серебра и церия. В статье представлены результаты экспериментального исследования, в котором оценены антибактериальные свойства нановолокон хитозана, непосредственно модифицированных ионами серебра и церия в отношении стандартных и госпитальных штаммов микроорганизмов. Полученные результаты свидетельствуют о высокой антимикробной активности исследуемых образцов и необходимости их дальнейшего изучения на модели раневого процесса.

Ключевые слова: хронические раны, раневые покрытия, хитозан, серебро, церий.

V. V. Mashel', G. G. Kondratenko, A. I. Protasevich, P. S. Neverov

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CHITOSAN NANOVOLLES AND ITS MODIFICATIONS TOWARDS INFECTION PATHOGENS

The problem of wound management infected and chronic wounds is still relevant in modern surgery. The number of nosocomial multidrug-resistant strains of bacteria is increasing, which reduces the significance of antibiotic therapy. One of the options for solving this problem is the development of new agents and methods of local treatment, in particular, in the creation of new highly effective wound dressings with antibacterial and reparative properties. Chitosan is a natural biopolymer that has its own antimicrobial activity, hemostatic and sorption effects, the ability to biodegrade and biostimulate repair processes. Due to the amino groups, chitosan can act as a carrier for antiseptic agents such as silver and cerium ions. The article presents the results of an experimental study that evaluated the antibacterial properties of chitosan nanofibers directly modified with silver and cerium ions against standard and hospital strains of microorganisms. The results obtained indicate a high antimicrobial activity of the studied samples and the need for their further study on the model of the wound process.

Key words: chronic wounds, wound dressings, chitosan, silver, cerium.

Проблема лечения инфицированных и длительно незаживающих ран остаётся актуальной в современной хирургии [2]. Количество внутрибольничных полирезистентных штаммов бактерий увеличивается, что уменьшает значимость антибиотикотерапии [1]. Одним из вариантов решения этой проблемы является разработка новых средств и методов местного лечения, в частности, создание новых высокоэффективных раневых покрытий с антибактериальными и репаративными свойствами [3].

Создание нанокомпозитного средства, содержащего хитозан и ионы серебра и церия, а также оценка их антимикробной активности по отношению к стандартным и госпитальным штаммам основных возбудителей раневой инфекции может стать перспективным направлением в поиске новых высокоэффективных средств для лечения гнойных ран. Целью проведенной работы было изучение антимикробную активность нановолокон хитозана и его модификаций ионами серебра и церия как по отдельности, так и в комплексе, *in vitro* по отношению к основным возбудителям раневой инфекции.

Материалы и методы

Образцы нановолокон были предоставлены Белорусским государственным технологическим университетом. Отличительной осо-

бенностью изучаемого материала являлось то, что непосредственно в состав нановолокон хитозана были введены ионы церия и серебра как в комплексе, так и по отдельности. Микробиологическое исследование было выполнено на базе лаборатории внутрибольничных инфекций НИЧ УО «БГМУ». Оценивалась антимикробная активность нановолокон хитозана с ионами серебра и церия методом диффузии вещества в плотной питательной среде и количественным суспензионным методом. Для оценки антимикробной активности методом диффузии в плотной питательной среде взвеси суточных агаровых культур тест-микробов (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*) в физиологическом растворе стандартизировали до 10^7 КОЕ/мл и засеивали газоном на плотную питательную среду. В стерильных условиях образцы покрытия нарезали фрагментами 1,0 x 1,0 см. На поверхность плотной питательной среды с посевом тест-культур накладывали по 3 фрагмента каждого образца. Всего было оценено 36 образцов. Оценке подвергались следующие образцы: хитозан (ХЗ) + Се (образец 1), ХЗ + Ag (образец 2), ХЗ (образец 3). Контролем служил нетканый синтетический аналог (Спанбел). Посевы выдерживались в термостате в течение 24 часов. Учёт производили, измеряя диаметр зон задержки роста вокруг образцов (Рис. 1).

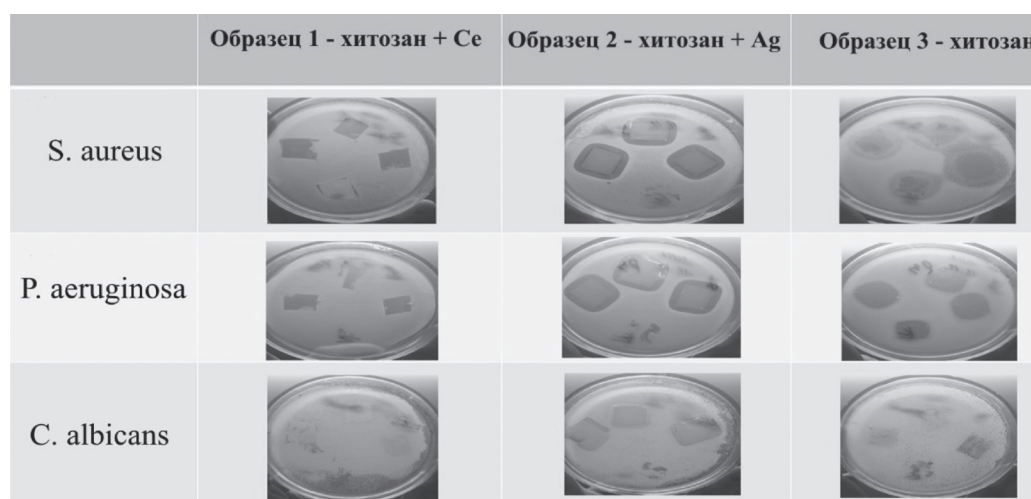


Рис. 1. Оценка антимикробных свойств образцов методом диффузии в плотной питательной среде

Таблица 1. Оценка антимикробной активности нановолокон хитозана методом диффузии вещества в плотной питательной среде (образец 1 – X3 + Ce)

Вид тест-микроба	№ накладки	Диаметр зон задержки роста (мм)	
		тест-культура	контроль
S. aureus ATCC 6538	1	12,0	рост
	2	10,0	рост
	3	11,0	рост
P. aeruginosa ATCC 15442	1	под образцом роста нет	рост
	2	под образцом роста нет	рост
	3	под образцом роста нет	рост
C. albicans ATCC 10231	1	рост	рост
	2	рост	рост
	3	рост	рост

Таблица 2. Оценка антимикробной активности нановолокон хитозана методом диффузии вещества в плотной питательной среде (образец 2 – X3 + Ag)

Вид тест-микроба	№ накладки	Диаметр зон задержки роста (мм)	
		тест-культура	контроль
S. aureus ATCC 6538	1	20,0	рост
	2	22,0	рост
	3	20,0	рост
P. aeruginosa ATCC 15442	1	25,0	рост
	2	23,0	рост
	3	24,0	рост
C. albicans ATCC 10231	1	20,0	рост
	2	23,0	рост
	3	21,0	рост

Таблица 3. Оценка антимикробной активности нановолокон хитозана методом диффузии вещества в плотной питательной среде (образец 3 – X3 + Ag + Ce)

Вид тест-микроба	№ накладки	Диаметр зон задержки роста (мм)	
		тест-культура	контроль
S. aureus ATCC 6538	1	единичные колонии	рост
	2	единичные колонии	рост
	3	единичные колонии	рост
P. aeruginosa ATCC 15442	1	под образцом роста нет	рост
	2	под образцом роста нет	рост
	3	под образцом роста нет	рост
C. albicans ATCC 10231	1	рост	рост
	2	рост	рост
	3	рост	рост

В ходе оценки антимикробной активности композитного материала количественным суспензионным методом образцы погружались в 0,9 мл стерильной дистиллированной воды, выдерживались 24 часа при комнатной температуре. Взвеси суточных культур тест-микробов в физиологическом растворе с 20% лошадиной сывороткой стандартизировали до 10^9 КОЕ/мл по стандарту мутности, суспензию вносили в воду с раневым покрытием (температура раствора 20 °С) в соотношении 1:10. Через 24 часа производились посевы по 0,1 мл микробной взвеси на сектора чашек Петри с питательными средами. Всего было выполнено 50 посевов. Посевы инкубировали в термостате в течение 48 часов, после чего подсчитывали число колоний и устанавливали количество выживших бактерий (КОЕ/мл) в опыте и контроле. Определяли факторы редукции (RF) числа бактерий путём вычитания десятичного логарифма КОЕ/мл после экспозиции от десятичного логарифма изначального количества КОЕ/мл в опыте по сравнению с контролем. Оценке подвергались следующие образцы покрытий размером 10 × 10 мм: образец 1 – (X3 + Ce), образец 2 – (X3 + Ag), образец 3 – (X3 + Ag + Ce), образец 4 – (X3). В качестве тест-культур использовали следующие микроорганизмы: P. aeruginosa ATCC 15422, E. coli ATCC 11229, S. aureus ATCC 6538, S. haemolyticus 17748, C. albicans ATCC 10231, C. krusei 2493 – типовые штаммы, P. aeruginosa 12561, P. aeruginosa 11478, S. aureus 3223, C. albicans 5013 – госпитальные штаммы.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения антимикробных свойств образцов нановолокон хитозана и его модификаций методом диффузии на плотной питательной среде представлены в таблицах 1–3.

В ходе оценки антимикробной активности образцов было установлено, что комплекс нановолокон хитозана с церием высокоэффективен в отношении S. aureus и умеренно

эффективен в отношении *P. aeruginosa*, однако его фунгицидные свойства не выражены. Комплекс с серебром был высокоэффективен в отношении всех задействованных микроорганизмов. Собственные антибактериальные свойства нановолокон хитозана проявлялись в отношении *P. aeruginosa* и *S. aureus*, однако в отношении последнего микроорганизма эффект оказался нестойким. Фунгицидная активность нановолокон хитозана отсутствовала.

При оценке антимикробной активности образцов суспензионным количественным

методом (таблица 4) комплекс нановолокон хитозана с серебром проявил крайне высокую антимикробную активность по отношению ко всем исследованным культурам, фактор редукции достигал 7 и выше, что указывает на снижение микробного числа более чем на 7 порядков.

Для наглядности результаты оценки антимикробной активности модифицированных образцов нановолокон хитозана суспензионным количественным методом представлены в виде гистограмм 1-2.

Таблица 4. Оценка бактерицидной активности образцов раневого покрытия с нановолокнами хитозана и ионами серебра в отношении тест-культур бактерий и грибов в количественном суспензионном методе

Тест-культура	Образец	Экспозиция					
		3 часа			24 часа		
		КОЕ/мл	Ig	RF	КОЕ/мл	Ig	RF
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	Ag	$1,0 \cdot 10^6$	6,0	3,07	$<10^2$	2,0	7,07
	Ce	$1,0 \cdot 10^8$	8,0	1,07	$1,0 \cdot 10^7$	7,0	2,07
	Ag+ Ce	$1,0 \cdot 10^6$	6,0	3,07	$3,0 \cdot 10^2$	2,47	6,6
	O	$1,0 \cdot 10^8$	8,0	1,07	$1,0 \cdot 10^7$	7,0	2,07
	Контроль	$1,2 \cdot 10^9$	9,07	0	$1,2 \cdot 10^9$	9,07	0
<i>P. aeruginosa</i> 12561	Ag	$2,0 \cdot 10^3$	3,3	5,81	$<10^2$	2,0	7,11
	Ce	$1,0 \cdot 10^8$	8,0	1,11	$1,0 \cdot 10^7$	7,0	2,11
	Ag+ Ce	$1,0 \cdot 10^4$	4,0	5,11	$5,0 \cdot 10^3$	3,69	5,42
	O	$1,0 \cdot 10^8$	8,0	1,11	$2,0 \cdot 10^7$	7,3	1,81
	Контроль	$1,3 \cdot 10^9$	9,11	0	$1,3 \cdot 10^9$	9,11	0
<i>P. aeruginosa</i> 11478	Ag	$1,0 \cdot 10^5$	5,0	4,04	$<10^2$	2,0	7,04
	Ce	$1,0 \cdot 10^8$	8,0	1,04	$1,0 \cdot 10^7$	7,0	2,04
	Ag+ Ce	$1,0 \cdot 10^6$	6,0	3,04	$7,0 \cdot 10^3$	3,84	5,2
	O	$1,0 \cdot 10^8$	8,0	1,04	$1,0 \cdot 10^7$	7,0	2,04
	Контроль	$1,1 \cdot 10^9$	9,04	0	$1,1 \cdot 10^9$	9,04	0
<i>E. coli</i> ATCC 11229	Ag	$<10^2$	2,0	7,3	$<10^2$	2,0	7,3
	Ce	$1,0 \cdot 10^8$	8,0	1,3	$1,0 \cdot 10^7$	7,0	2,3
	Ag+ Ce	$<10^2$	2,0	7,3	$<10^2$	2,0	7,3
	O	$1,0 \cdot 10^8$	8,0	1,3	$1,0 \cdot 10^7$	7,0	2,3
	Контроль	$2,0 \cdot 10^9$	9,3	0	$2,0 \cdot 10^9$	9,3	0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Ag	$1,7 \cdot 10^3$	3,23	5,81	$1,7 \cdot 10^3$	3,23	5,81
	Ce	$1,0 \cdot 10^8$	8,0	1,04	$1,0 \cdot 10^7$	7,0	2,04
	Ag+ Ce	$2,0 \cdot 10^3$	3,3	5,74	$<10^2$	2,0	7,04
	O	$1,0 \cdot 10^8$	8,0	1,04	$1,0 \cdot 10^6$	6,0	3,04
	Контроль	$1,1 \cdot 10^9$	9,04	0	$1,1 \cdot 10^9$	9,04	0
<i>S. haemolyticus</i> 17748	Ag	$1,0 \cdot 10^5$	5,0	4,0	$<10^2$	2,0	7,0
	Ce	$1,0 \cdot 10^8$	8,0	1,0	$1,0 \cdot 10^7$	7,0	2,0
	Ag+ Ce	$1,0 \cdot 10^6$	6,0	3,0	$1,6 \cdot 10^3$	3,2	5,8
	O	$1,0 \cdot 10^8$	8,0	1,0	$1,0 \cdot 10^7$	7,0	2,0
	Контроль	$1,0 \cdot 10^9$	9,0	0	$1,0 \cdot 10^9$	9,0	0

Однако в отношении внутрибольничного штамма *C. albicans* фактор редукции достиг лишь 5,0, что, тем не менее, является высоким показателем. Комплекс нановолокон хитозана с церием оказался значительно менее эффективным, фактор редукции находился в пределах 1–2, достигнув 2,6 лишь в отношении *C. krusei*. Активность комплекса нановолокон хитозана с церием и серебром не имела видимых отличий от таковой у нановолокон комплекса хитозана с серебром, за исключением более высокой активности в отношении культур *C. albicans*, при том, что активность комплексов с церием и серебром по отдельности была ниже.

Выводы

1. Нановолокна хитозана проявляют умеренные антибактериальные свойства в отношении стандартных штаммов *P. aeruginosa*, *E. coli*. Существует определённая антимикробная активность в отношении штаммов *S. aureus*, однако этот эффект не является стойким. Фунгицидная активность нановолокон хитозана не выражена.

2. Комплекс ионов серебра с нановолокнами хитозана проявляет высокую антимикробную активность в отношении всех изученных стандартных и госпитальных штаммов бактерий и грибов.

Литература

1. Huemer, M. Antibiotic resistance and persistence – Implications for human health and treatment perspectives / M. Huemer [et al.] // EMBO rep. – 2020. – Vol. 21. – P. 2–5. DOI: 10.15252/embr.202051034

2. Järbrink, K. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a sys-

References

1. Huemer, M. Antibiotic resistance and persistence – Implications for human health and treatment perspectives / M. Huemer [et al.] // EMBO rep. – 2020. – Vol. 21. – P. 2–5. DOI: 10.15252/embr.202051034

2. Järbrink, K. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a sys-

3. Комплекс ионов церия с нановолокнами хитозана проявляет умеренную антимикробную активность в отношении стандартных штаммов микроорганизмов. Его активность в отношении госпитальных штаммов значительно ниже.

4. Комплекс нановолокон хитозана и ионов серебра имеет высокий потенциал как антимикробное средство и требует дальнейшего экспериментального изучения на модели раневого процесса, в ходе которого следует оценить его антимикробные, сорбционные и регенеративные свойства *in vivo*.

Финансирование

Работа выполнялась в соответствии с планом научных исследований по заданию «Изучить влияние нановолокон хитозана, модифицированных добавками наночастиц серебра и церия на возбудителей раневой инфекции и репаративные процессы при нарушении целостности кожных покровов» подпрограммы «Синтез и направленное модифицирование регуляторов биопроцессов (Биорегуляторы)» государственной научно-технической программы «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорганоматериалы» на 2021–2025 годы, присвоен № гос. Регистрации в ГУ «Бел ИСА» 20220364 от 29.03.2022

tematic review / K. Järbrink [et al.] // Syst. Rev. – 2016. – Vol. 5. – P. 152–158.

3. Winter, G. D. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig / G. D. Winter // Nature. – 1962. – Vol. 193. – P. 293–294. DOI: 10.1038/193293a0

tematic review / K. Järbrink [et al.] // Syst. Rev. – 2016. – Vol. 5. – P. 152–158.

3. Winter, G. D. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig / G. D. Winter // Nature. – 1962. – Vol. 193. – P. 293–294. DOI: 10.1038/193293a0

Поступила 10.05.2022