ОЦЕНКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ *L-* И *D-*ИЗОФОРМ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ИХ СОЛЕЙ С ХИТОЗАНОМ

Аль Зубейди А.Ф.А., Малинкина О.Н., Чемодурова А.А., Ксенофонтова О.Ю., Зудина И.В.

ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Саратов, е-таіl: adwa a2000@yahoo.com

Оценивали антибактериальную активность (A_i) L- и D-изоформ аскорбиновой кислоты и их солей с хитозаном (XT3) в отношении грамотрицательных и грамположительных бактериальных штаммов методом диффузии в агар. Были использованы L- и D-аскорбиновая кислота, чда, и XT3 со средневязкостной молекулярной массой 32 кДа и степенью деацетилирования 70 мольн. % (ЗАО «Биопрогресс», РФ). Самые высокие значения антибактериальной активности наблюдались у L-аскорбиновой кислоты (A_i = 45,7 %) и у полисоли гидрохлорид-D-аскорбата XT3 (A_i = 54,7 %) в отношении грамотрицательного тест-штамма E. coli 113-13. По всей видимости, стерические особенности органического лиганда имеют решающее значение для установления полноценного взаимодействия протонированных аминогрупп XT3 с сайтами связывания на поверхности клеток грамотрицательных и грамположительных бактерий.

Ключевые слова: хитозан, L- и D-изоформы аскорбиновой кислоты, антибактериальная активность.

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *L*- AND *D*-ASCORBIC ACID ISOFORMS AND THEIR SALTS WITH CHITOSAN

Al-Zubaidi A.F.A., Malinkina O.N., Chemodurova A.A., Ksenofontova O.Yu., Zudina I.V.

Saratov State University, Saratov, e-mail: adwa a2000@yahoo.com

The antibacterial activity (A_i) of the L- and D-isoforms of ascorbic acid and their salts with chitosan (CHs) against some Gram-negative and Gram-positive bacterial strains was evaluated using the agar diffusion method. L- and D-ascorbic acids, analytical grade, and CHs (Bioprogress Ltd., RF) with a viscosity-averaged molecular weight of 32 kDa and a degree of deacetylation of 70 wt. % were used. The highest levels of antimicrobial activity were observed for L-ascorbic acid ($A_i = 45.7$ %) and the CHs hydrochloride-D-ascorbate-polysalt ($A_i = 54.7$ %) against the Gram-negative test-strain E. coli 113-13. Apparently, some steric features of the organic ligand are critical for the establishment of strong interaction between the protonated amino groups of CHs and the binding sites on the cell surface of the Gram-negative and Gram-positive bacteria.

Keywords: chitosan, L- and D-ascorbic acid isoforms, antibacterial activity.

В последние годы в отечественной литературе опубликован целый ряд статей об успешном опыте применения лекарственных препаратов, включающих в свой состав аскорбат хитозана — соль аминополисахарида хитозана (ХТЗ) и аскорбиновой кислоты (АК) [1, 2]. Как известно, ХТЗ обладает ранозаживляющим, противовоспалительным и биоцидным (антибактериальным, противовирусным и фунгицидным) действием [8, 9], что является крайне важным, в частности, при лечении воспалительных заболеваний пародонта и ран различного генеза. Выбор АК в качестве органического лиганда в составе соли обусловлен прежде всего ее способностью определять нормальное течение репаративных процессов за счет стимуляции синтеза коллагена и пролиферации фибробластов.

Одной из особенностей соли аскорбата XT3 является то, что она образована из двух активных химических соединений. оптически Аминополисахарид XT3 проявляет оптическую активность вследствие наличия асимметрично замещенных атомов углерода в глюкопиранозных циклах макромолекул. Асимметрический атом углерода в фурановом кольце молекулы АК обусловливает существование двух оптических энантиомеров – правои левовращающего изомера, условно именуемых *L*- и *D*-изоформами. Причем, в природных объектах АК находится исключительно в биологически активной *L*-изоформе (витамин С), тогда как при химическом синтезе, как правило, получается рацемат – смесь равных количеств L- и D-изоформ. В отношении D-АК в литературе имеются отдельные экспериментальные данные о ее слабой коллагенстимулирующей активности и низкой скорости поступления в организм [10]. В этой связи вполне логично было бы ожидать, что препараты, содержащие AK в виде смеси L- и D-стереоизомеров, могут существенно отличаться своими фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами, и это не может не отразиться на эффективности проводимого лечения.

Известно также, что стереоизомеры лекарственных веществ могут существенно различаться своим терапевтическим эффектом, и не всегда он оказывается благоприятным. Так, например, D-соталол оказывает антиаритмическое действие, а L-соталол является альфа-блокатором; D-этамбутол используется в качестве противотуберкулезного препарата, в то время как прием L-этамбутола приводит к слепоте. Поэтому само существование явления стереоизомеризма лекарственных веществ инициировало развитие целого направления исследований в области клинической фармакологии, основной целью которого является сравнение эффективности и безопасности как отдельных энантиомеров, так и их рацемической смеси [7].

Не так давно было установлено, что взаимодействие XT3 с АК пространственно отличается от его взаимодействия с другими органическими или неорганическими кислотами [5]. Вопрос о влиянии хиральности АК на биологическую активность полимера XT3 остается практически не изученным.

Данная работа посвящена сравнению антибактериальной активности L- и D-изоформ АК и их солей с XT3.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили водные растворы L- и D-изоформ AK, а также водные растворы их солей с XT3. В качестве исходных субстанций использовали L- и D-аскорбиновую кислоту ($C_6H_8O_6$) производства ООО «Люми» (г. Санкт-Петербург) и ЗАО «Вектон» (г. Санкт-Петербург), соответственно, аналитической степени чистоты, а

также порошок водорастворимого хитозана (XT3) со средневязкостной молекулярной массой 32 кДа и степенью деацетилирования 70 мольн.% (ЗАО «Биопрогресс», г. Щелково). Проведенный дополнительный химический анализ коммерческого порошка XT3 показал, что он представлен полисолью гидрохлорида XT3 (XT3·HCl). Навески XT3·HCl предварительно стерилизовали в ламинарном боксе NUAIRE Biological Safeti Cabinets (Франция) в течение 15 мин. При приготовления растворов использовали стерильную дистиллированную воду, дегазированную от CO₂ и O₂ кипячением при 100 °C в течение 1 часа.

Исходные 9 %-ные растворы L- и D-изоформ АК получали растворением навесок L- и D-АК в воде при 20 ± 2 °C в отсутствие естественного освещения. Исходные растворы гидрохлорида-аскорбата XT3 (XT3·HCl·AK) готовили порционным смешиванием твердой навески XT3·HCl с 9 %-ным водным раствором L- или D-АК в количестве, обеспечивающем мольное соотношение XT3·HCl : AK = 1 : 0.6. В эксперименте использовали суточные растворы L- и D-АК и их солей XT3·HCl·D-АК и XT3·HCl·L-АК.

Антибактериальную активность полученных препаратов определяли методом, разработанным С. Е. Есиповым с соавторами [3]. Для этого в застывшем мясопептонном агаре, содержащем взвесь клеток суточной бактериальной тест-культуры (108 к.т. в 1 мл по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича), делали шесть лунок диаметром 7 мм по окружности чашки Петри на расстоянии 30–33 мм от центра (рисунок). В три лунки (через одну) вносили по 0.1 мл контрольного препарата (стандарта) – 0.05 %-ного раствора хлоргексидина биглюконата (производство ООО «Южфарм», РФ). В три другие лунки вносили по 0.1 мл водных растворов *L*- и *D*-изоформ АК или растворов солей XT3·HCl·*D*-АК и XT3·HCl·*L*-АК в разведениях, указанных в таблице. На каждый испытуемый препарат брали по пять чашек с тест-культурами *Staphylococcus aureus* 209Р и *Escherichia coli* 113-13. Для лучшей диффузии испытуемых препаратов в питательную среду чашки с нанесенными образцами сначала выдерживали в течение 2-х часов при комнатной температуре, а затем помещали в термостат на 37 °C. Зоны задержки роста бактерий замеряли через 18–20 часов культивирования. Эксперимент повторяли троекратно.



Зоны угнетения роста культуры S. aureus 209P водными растворами соли XT3·HCl·L-AK концентрации 9 (1), 4.5 (2), 2.25 % (3) и стандартом — 0.05 %-ным раствором хлоргексидина биглюконата

Антибактериальную активность (A_i , %) анализируемых образцов рассчитывали в точном соответствии с тем, как это указано в статье [4]. Все вычисления и статистическую обработку данных проводили с помощью программ Microsoft *Excel* (пакет ПО Microsoft Office 2010) и StatSoft Statistica v6.0 Rus (2006).

Результаты исследования и их обсуждение

Предложенный С.Е. Есиповым с соавт. [3] и модифицированный В.М. Игидбашян с соавт. [4] математический алгоритм обработки данных позволяет рассчитывать величину антибактериальной активности A_i относительно опорной концентрации какого-либо стандарта, то есть антибиотика или антисептика, биоцидная активность которого известна. В данной работе в качестве стандарта был выбран 0.05%-ный раствор хлоргексидина биглюконата, применяющийся в медицине в качестве асептического средства для лечения ран, потертостей, трещин, ожогов, бактериальных и грибковых заболеваний кожи и слизистых оболочек.

В таблице приведены значения A_i исследуемых растворов в отношении тестовых культур двух видов микроорганизмов — грампозитивного S. aureus 209P и грамнегативного E. coli 113-13. Важно отметить, что во всех экспериментах коэффициент корреляции r_i^2 имел величину не менее 0.99, что свидетельствовало о наличии линейной зависимости между логарифмом дозы препарата, внесенной в лунки питательного агара, и диаметром зон подавления роста. Следовательно, указанные в таблице значения A_i были определены с относительной ошибкой не более 5 % [3].

Значения антибактериальной активности (A_i) водных растворов L- и D-изоформ аскорбиновой кислоты (AK) и их солей с гидрохлоридом хитозана ($XT3 \cdot HCl$), рассчитанные относительно 0.05%-ного раствора биглюконата хлоргексидина, r_i^2 =0.99

	Разведе- ние	Staphylococcus aureus 209P				Escherichia coli 113-13			
		Диаметр зон, мм	d_{st}	C_{i}	A _i ,%	Диаметр зон, мм	d_{st}	Ci	A _i ,%
L-AK	1	17.6				18.2			
	2	14.8	20.0	0.3684	36.4	15.4	20.0	0.4570	45.7
	4	12.2				12.8			
D-AK	1	15.4	20.0	0.1699	17.0	16.4	20.0	0.2459	24.6
	2	13.0				13.8			
	4	10.8				11.4			
XT3·HCl· <i>L</i> -AK	1	14.0	20.0	0.0924	9.2	13.6	20.0	0.0727	7.3
	2	11.8				11.4			
	4	10.0				9.6			
XT3·HCl· <i>D</i> - AK	1	17.0	20.0	0.2920	29.2	18.8	20.0	0.5469	54.7
	2	14.2				16.0			
	4	11.6				13.2			

Примечание. d_{st} – среднее значение диаметра зон подавления роста контрольным стандартным раствором для девяти измерений; C_i – экспериментально определенное значение концентрации препарата в трех разведениях анализируемого образца относительно концентрации контрольного стандартного раствора.

При сравнении значений величины A_i у стереоизоформ AK было установлено, что биоцидная активность раствора L-AK по сравнению раствором D-AK была выше и в отношении штамма E. $coli\ 113$ -13 (в 1.9 раза, $p \le 0.05$), и в отношении S. $aureus\ 209P$ (в 2.1 раза, $p \le 0.05$). Иная картина наблюдалась при воздействии на культуры бактерий растворов солей стереоизоформ AK и XT3·HCl. Оказалось, что раствор XT3·HCl·L-AK по сравнению с раствором XT3·HCl·D-AK был в 3.2 раза менее активен в отношении культуры S. $aureus\ 209P\ (p \le 0.05)$ и в 7.5 раза — в отношении E. $coli\ 113$ -13 ($p \le 0.05$).

При сравнении антибактериальной активности стереоизомеров АК и соответствующих им полимерных солей было установлено, что антибактериальная активность D-АК была статистически значимо ниже по сравнению с $XT3 \cdot HCl \cdot D$ -АК: в

отношении *S. aureus* 209Р – в 1.7 раза; в отношении *E. coli* 113-13 – в 2.2 раза. В то же время, значения A_i у L-АК были существенно выше таковых у XT3·HCl·L-АК: в 6.3 раза ($p \le 0.05$) в отношении E. coli 113-13 и в 4.0 раза ($p \le 0.05$) в отношении S. aureus 209Р.

Более чувствительным к действию растворов стереоизомеров АК оказался грамнегативный микроорганизм $E.\ coli\ 113$ -13. Значения величины антибактериальной активности в отношении этого штамма у растворов L-АК и D-АК были, соответственно, в 1.3 раза ($p \ge 0.05$) и в 1.5 раза ($p \le 0.05$) выше, чем таковые в отношении грампозитивного $S.\ aureus\ 209P$. Статистически значимых различий в чувствительности к биоцидному действию растворов XT3·HCl·L-АК у тестируемых культур установлено не было. Отношение значений A_i , рассчитанных для $S.\ aureus\ 209P$ и для $E.\ coli\ 113$ -13, у этой полисоли составляло величину 1.3 ($p \ge 0.05$). В то же время, к действию растворов XT3·HCl·D-АК штамм $E.\ coli\ 113$ -13 проявлял бо́льшую чувствительность по сравнению с $S.\ aureus\ 209P$ — в 1.9 раза, причем $p \le 0.05$.

Заключение

Проведенное микробиологическое исследование продемонстрировало существенное изменение биоцидных свойств раствора комплексной соли гидрохлорида-аскорбата XT3 в зависимости от знака удельного оптического вращения стереоизомера АК, использованного при ее приготовлении. Из всех протестированных нами растворов самой высокой антибактериальной активностью обладала соль XT3·HC1·*D*-АК. Это вполне согласуется с опубликованным ранее наблюдением, что наибольшую биологическую активность проявляют растворы солей XT3, имеющие малое по модулю отрицательное значение удельного оптического вращения [6]. Как показали А. Б. Шиповская с соавт. (2015), водные растворы XT3·HC1 в *L*-АК и *D*-АК имеют отрицательные значения [α], причем кривая дисперсии удельного оптического вращения раствора XT3·HC1·*D*-АК (мольное соотношение XT3·HC1:АК – 1:2) в большей степени смещена в область, где величина [α] приближается к 0 [5].

Большинство исследователей склоняются к мнению, что антибактериальная активность у XT3 определяется положительно заряженными аминогруппами (–NH₃⁺) мономерных звеньев макроцепи аминополисахарида, которые обеспечивают связывание полимера с анионными компонентами поверхностных структур клеток микроорганизмов [8, 9]. В этом случае главной мишенью для XT3 у грамотрицательных бактерий становится отрицательно заряженный липополисахарид, у грамположительных – тейхоевые кислоты с многочисленными отрицательно заряженными остатками фосфорной кислоты. В наших экспериментах наиболее высокие значения антибактериальной активности были отмечены у

L-стререоизомера AK ($A_i = 45.7 \%$) и у XT3·HCl·D-AK ($A_i = 54.7 \%$) в отношении грамнегативного микроорганизма E. $coli\ 113$ -13. Физическая сущность наблюдаемого нами явления, к сожалению, пока не имеет объяснения, и требуются дополнительные исследования. Можно лишь предположить, что стерические особенности органического лиганда являются критичными для установления полноценного взаимодействия протонированных аминогрупп XT3 с сайтами связывания на поверхности клеток грамнегативных и грампозитивных микроорганизмов.

Список литературы

- 1. Большаков И.Н. Биодеградируемые раневые покрытия на основе полисахаридных полимеров в лечении обширной ожоговой травмы (клиническое исследование) / И.Н. Большаков, А.В. Еремеев, Д.В. Черданцев, А.В. Каскаев, А.К. Кириченко, А.А. Власов, А.Н. Сапожников // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. Пластическая хирургия. −2011. − Т. 38, № 3. − С. 56-62.
- 2. Булкина Н. В. Опыт применения солей хитозана в комплексной терапии генерализованного пародонтита / Н.В. Булкина, П.В. Иванов, А.П. Ведяева, Е.В. Токмакова, О.В. Попкова // Фарматека. 2015. № 2. С. 43-47.
- 3. Есипов С. Е. Новый математический подход при определении концентрации антибиотиков методом диффузии в агар / С.Е. Есипов, Л.Л. Жиркова, В.В. Воронкова // Антибиотики и химиотерапия. 1998. № 2. С. 14-19.
- 4. Игидбашян В.М., Зудина И.В., Булкина Н.В., Китаева В.Н., Сирицина В.С., Зюлькина Л.А. Применение математического подхода при оценке антибактериальной активности серебросодержащих препаратов // Современные проблемы науки и образования. − 2014. − № 5; URL: http://www.science-education.ru/119-14655.
- Шиповская А.Б. Новые антимикробные препараты на основе комплексных солей хитозана
 с хиральным органическим лигандом / А.Б. Шиповская, И.В. Зудина, В.И. Фомина,
 О.Н. Малинкина // Бутлеровские сообщения. 2015. Т. 41, № 3. С. 82-94.
- 6. Шиповская А. Б. Биологическая активность олигомеров хитозана / А.Б. Шиповская, В.И. Фомина, М.Н. Киреев, Е.С. Казакова, И.А. Касьян // Известия Саратовск. ун-та. Новая серия. Сер. Химия. Биология. Экология. 2008. Т. 8, № 2. С. 46-49.
- 7. Chhabra, N. A review of drug isomerism and its significance/ N. Chhabra, M. L. Aseri, D. Padmanabhan // Int J Appl Basic Med Res. − 2013. − Vol. 3, № 1. − P. 16-18.

- 8. Liu, H. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage / H. Liu, Y. Du, X. Wang, L. Sun / Int. J. Food Microbiol. − 2004. − №. 95. − P. 147–155.
- 9. Raafat, D. Chitosan and its antimicrobial potential a critical literature survey / D. Raafat, H.-G. Sahl // Microb Biotechnol. 2009. Vol. 2, N 2. P. 186-201.
- 10. Robertson, W. V. D-Ascorbic acid and collagen synthesis / W. V. Robertson // Biochim. Biophys. Acta. 1963. Vol. 74. P. 135-137.