

УДК 573.6.086.835

НОВЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ГЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С АНТИБИОТИЧЕСКИМИ И БИОСТИМУЛИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ

*Н.А. Кленова, З.П. Белоусова, Т.И. Васильева, Д.А. Евдокименко, И.С. Мажанова,
В.С. Соболева, Т.В. Шарова*

Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева, Самара, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Целлюлоза бактериального происхождения способна сорбировать и удерживать большое количество воды, выдерживать высокие температуры (до 150 °С, а после химической обработки до 275 °С), что позволяет высушивать ее без повреждения структуры. В то же время она обладает хорошей упругостью, пластичностью и эластичностью. Низкие адгезивные свойства к раневой поверхности и инертность для метаболизма человека позволяют успешно использовать материал в качестве органической матрицы при создании композитов путём внесения в гель-плёнки и гели эффективных антибактериальных и биостимулирующих компонентов. Нами уже были получены и исследованы свойства ряда композитов, созданных на основе гель-пленок и гелей бактериальной целлюлозы [1, 2].

Цель работы – получение и изучение свойств новых композитов с использованием в качестве основы бактериальной целлюлозы, обладающих биостимулирующими, регенерирующими и антибиотическими свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы гелей и «вторичных» гель-пленок бактериальной целлюлозы (БЦ) получали путем культивирования штамма *Gluconacetobacter sucrofermentans* ВКПМ В-11267 как описано в предыдущих работах [1, 2]. Пектиновые пленки бактериальной целлюлозы получали добавляя в состав среды яблочный пектин в количестве 10 г./л.

В качестве биостимулирующих и антибиотических добавок использовали экстракты календулы и алоэ. Спиртовой экстракт алоэ готовили по аптечной рецептуре. Экстракт алоэ жидкий получали из биостимулированных листьев алоэ древовидного. Для биостимуляции листья алоэ хранили в темноте при температуре 4–8 °С в течение 21 сут. Затем их мыли, обсушивали, удаляли зубчики, пожелтевшие концы и измельчали.

Экстрагирование проводили 70 %-ным этиловым спиртом в соотношении 1:2. Фильтровали через сложенную в 2–3 раза марлю. Хранили в темной посуде и защищенном от света прохладном месте в течение 7 суток. Для приготовления экстракта календулы лекарственной 1 г сухих цветков заливали 10 мл 70 %-ного спирта и настаивали в течение суток. Фильтровали через 2–3 слоя марли и хранили в темной посуде при температуре 10–12°.

Антибиотические свойства композитам придавали, добавляя известные препараты демилсульфоксид, хлоргексидин и мирамистин, а также вновь синтезированное нами соединение: 2-амино-1-[α -бензотриазолил-1-метил] – хинолиний хлорид. Производные 8-гидроксихинолина обладают бактерицидными и фунгицидными свойствами, а их галогенпроизводные, например, 8-гидрокси-7-иод-5-хлорхинолин – «виоформ», являются амебоцидами. Бактерицидные свойства данных соединений связаны с присутствием хелатного комплекса с железом. Производные меди (II) обладают противогрибковой активностью. 5-нитро-8-оксихинолин (5-НОК) является общепризнанным и очень эффективным антибиотиком. В связи с этим синтез и испытание новых производных хинолина представляет значительный интерес.

Синтез 2-амино-1-[α -бензотриазолил-1-метил] хинолиний хлорида. К 1,68 г. (10 ммоль) растворенного в ацетонитриле (25 мл) 1-хлорметилбензотриазола прибавили 1,44 г. (10 ммоль) 2-аминохинолина. Смесь кипятили с обратным холодильником в течение 14 ч. Затем образовавшийся кристаллический осадок отфильтровали. К фильтрату добавили 50 мл воды, упарили раствор до половины первоначального объема и выдерживали в течение 5 ч при охлаждении. Затем отфильтровали выпавшие кристаллы, повторяли процедуру охлаждения-фильтрования 4 раза.

Выход 2,31 г. (74 %) 2-амино-1-[α -бензотриазолил-1-метил] хинолиний хлорида в виде светло-желтых кристаллов. Его водный раствор проявляет заметную флуоресценцию.

В качестве тест-объектов для изучения антибактериального действия были использованы культуры *Escherichia coli* M-17 и *Staphylococcus epidermidis* NCTC8325–4, использовали суточные инокуляты в мясо-пептонном бульоне с плотностью популяций от 0,15 до 0,44 ед. оптической плотности ($\lambda = 670$ нм, $l = 0,5$ см). Тест-объекты для исследования антифунгального действия – *Penicillium* sp. и *Aspergillus niger*. Для посевов использовали инокуляты в минеральной среде Чапека с плотностью популяций от 0,07 до 0,1 ед. оптической плотности ($\lambda = 670$ нм, $l = 0,5$ см). Об антибактериальном и антифунгальном действии судили по зонам отсутствия роста вокруг образцов после 1–3-х суточного роста на МПА и агаре Чапека при температуре 30°С.

Получение композитов на основе гелей БЦ. Для получения композитов с биостимулирующими и антибиотическими свойствами в гель добавляли экстракт алоэ или экстракт календулы, водный раствор хлоргексидина биглюконата и диметилсульфоксид. Композит содержал 33 % экстракта, 16 % хлоргексидина и 3 % диметилсульфоксида (ДМСО). Полученные композиты гелей бактериальной целлюлозы с экстрактом календулы или алоэ, водным раствором хлоргексидина и ДМСО формировались в виде шаровидных образцов с помощью пинцета и стеклянных палочек. В качестве контроля использовались гели с добавлением 96 % этилового спирта в соотношении 1:1.

Получение композитов на основе «вторичных» гель-пленок БЦ. Для получения композитов «вторичных» гель-пленок в гель бактериальной целлюлозы добавляли экстракт календулы или алоэ в соотношении 1:1. Композиты распределяли тонким слоем по полиэтиленовой пленке и сушили в кристаллизаторе до постоянного веса. В качестве контроля использовались «вторичные» гель-пленки с добавлением 96 %-ого этилового спирта в соотношении 1:1. На часть «вторичных» гель-пленок наносили 0,5 %-ый раствор хлоргексидина биглюконата в количестве 10 мкл на каждый образец площадью 0,25 см² после помещения его на свежие посевы бактерий.

Перед использованием композиты подвергались стерилизации с помощью УФ-облучения или термообработки горячим или сухим паром.

«Вторичные» пленки бактериальной целлюлозы, пропитанные 2-амино-1-[α -бензотриазолил-1-метил] хинолиний хлоридом, получали следующим способом. С гелей бактериальной целлюлозы удаляли избыток влаги фильтровальной бумагой, помещали их в растворы 2-амино-1-[α -бензотриазолил-1-метил] хинолиний хлорида разной концентрации: 1,5; 0,75; 0,15; 0,075 % и перемешивали в шейкере-инкубаторе (EnvironmentalShaker-IncubatorES-20/60) 20 минут, режим перемешивания – 250 об/мин. Полученные смеси выкладывали в чашки Петри на полиэтиленовую пленку. Часть гель-пленок высушивали до постоянной массы при 80 °С, часть использовали во влажном состоянии.

Химическое строение гель-пленок БЦ исследовалось на инфракрасном спектрофотометре SPECTRUM 100 (PerkinElmer, США). Для записи спектров была использована приставка нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) фирмы PikeTechnologiesInc.

Пектино-целлюлозную пленку выдерживали в растворе мирамистина и образцы пленок помещали на свежие посевы бактерий либо во влажном состоянии, либо после высушивания.

Исследование аллергической реакции немедленного типа. В качестве испытуемых были выбраны 10 студентов Самарского Университета в возрасте от 20 до 25 лет, выразивших согласие на проведение исследования. Среди участников эксперимента был проведен опрос на предмет наличия аллергии на компоненты, содержащиеся в образцах. Трое из десяти не смогли дать точный ответ, у остальных аллергия на используемые вещества отсутствует. За 48 часов до исследования испытуемые не принимали противоаллергические препараты.

Композиты накладывали на внутреннюю часть предплечья. Участки кожи предварительно были очищены. По истечении 20 минут образцы снимались и фиксировались изменения кожных покровов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование гелей бактериальной целлюлозы показало, что гель, содержащий этиловый спирт не сдерживал рост *Escherichia coli*, однако обладал выраженным антибактериальным действием по отношению к *Staphylococcus epidermidis*. Добавление в гели экстрактов календулы или алоэ, хлоргексидина и DMSO характеризовалось антибактериальным действием против *Escherichia coli*, давая задержку роста около 9–11 мм (таблица 1). Но большую эффективность гели оказывали на рост *Staphylococcus epidermidis*. Наблюдаемый эффект был выше более, чем в 2 раза по сравнению с *Escherichia coli*.

Антифунгальный эффект композиты проявляли только по отношению к аспергиллу, на посевах пенициллу зоны ограничения практически не меняются по сравнению с контролем (табл. 1).

Использование «вторичных» гель-пленок в составе композитов показали сходные результаты по отношению к бактериальным тест-объектам (табл. 2).

Таблица 1 – Зоны задержки роста бактерий, мм вокруг образцов композитов на основе гелей БЦ с экстрактами календулы и алоэ, хлоргексидином и ДМСО

Тест-объекты	Зоны задержки роста, мм		
	Образцы гелей + этиловый спирт (контроль)	Композит геля + экстракт календулы + хлоргексидин + ДМСО	Композит геля + экстракт алоэ + хлоргексидин + ДМСО
<i>Escherichia coli</i>	нет зон	11,00 ± 0,87Δ	8,90 ± 0,23Δ
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14,3 ± 2,04*	23,80 ± 1,17×Δ	20,80 ± 0,41×Δ
<i>Aspergillus niger</i>	10,6 ± 0,96	18,3 ± 2,79×Δ	19,60 ± 2,34×Δ
<i>Penicillium sp.</i>	8,75 ± 1,00	10,86 ± 1,09	11,00 ± 1,10

*P < 0,01 по отношению к *Escherichia coli* и *Penicillium sp.*

Δ P < 0,01 по отношению к контролю

Таблица 2 – Зоны задержки роста бактерий, мм вокруг образцов композитов на основе «вторичных» гель-пленок БЦ с экстрактами календулы и алоэ, хлоргексидином и ДМСО

Тест-объекты	Зоны задержки роста, мм		
	«Вторичная» гель-пленка с добавлением этилового спирта в соотношении 1:1 (контроль)	«Вторичная» гель-пленка с добавлением экстракта календулы в соотношении 1: 1 + 10 мкл хлоргексидина	"Вторичная" гель-пленка с добавлением экстракта алоэ в соотношении 1: 1 + 10 мкл хлоргексидина
<i>Escherichia coli</i>	нет	18,70 ± 2,13	18,20 ± 1,95
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	нет	24,60 ± 1,18*	20,50 ± 1,75

*P < 0,05 по отношению к *Escherichia coli*

«Вторичная» гель-пленка с экстрактом календулы и хлоргексидином наиболее эффективна по отношению к грам-положительным бактериям рода *Staphylococcus*. Замена экстракта календулы на экстракт алоэ нивелирует этот эффект, антибиотическое действие для *Escherichia coli* и *Staphylococcus epidermidis* становится сопоставимым.

Полученные нами пектиново-целлюлозные пленки приобрели новые свойства в отличие от обычных бактериальных целлюлозных пленок. Пектины представляют собой группу высокомолекулярных полисахаридов, входящих в состав клеточных стенок и межклеточных образований растений, он локализован в первичной клеточной стенке у всех высших растений [3]. Биологическая активность пектинов в значительной мере зависит от их молекулярной массы и степени этерификации. В зависимости от наличия свободных и этерифицированных карбоксильных групп, пектины проявляют различные свойства, например, слабую антибактериальную активность [4] и сорбционные свойства.

Мы наблюдали значительную антибактериальную активность «вторичных» пленок БЦ с 2-амино-1-[α -бензотриазолил-1-метил] – хинолиний хлоридом в концентрациях 1,5 % и 0,75 %, где площадь подавления роста *Escherichia coli* на третьи сутки культивирования составила $4,19 \pm 0,48 \text{ см}^2$ и $1,83 \pm 0,26 \text{ см}^2$ соответственно. В то время как в контрольных чашках отметили практически сплошной газонный рост на самих образцах «вторичных» пленок и вокруг них (табл. 3).

Таблица 3 – Площадь задержки роста *E. Coli* (3-и сутки культивирования) на плотной среде вокруг «вторичных» гель-пленок БЦ с 2-амино-1-[α -бензотриазолил-1-метил] – хинолиний хлоридом различных концентраций

Проба	Площадь зоны ограничения роста вокруг образца, см^2
Контроль: «вторичная» гель-пленка БЦ	Заращение
«Вторичная» гель-пленка БЦ + 0,075 %-ый раствор 2-амино-1-[α -бензотриазолил-1-метил] – хинолиний хлорида	Заращение
«Вторичная» гель-пленка БЦ + 0,15 %-ый раствор 2-амино-1-[α -бензотриазолил-1-метил] – хинолиний хлорида	$0,61 \pm 0,07$
«Вторичная» гель-пленка БЦ + 0,75 %-ый раствор 2-амино-1-[α -бензотриазолил-1-метил] – хинолиний хлорида	$1,83 \pm 0,26^*$
«Вторичная» гель-пленка БЦ + 1,5 %-ый раствор 2-амино-1-[α -бензотриазолил-1-метил] – хинолиний хлорида	$4,19 \pm 0,48^*$

$P < 0,01$ по отношению к предыдущему разведению 2-амино-1-[α -бензотриазолил-1-метил] хинолиний хлорида*

Таким образом, «вторичные» пленки БЦ с 2-амино-1-[α -бензотриазолил-1-метил] хинолиний хлоридом обладают достаточно высокими антибактериальными свойствами, поэтому такие пленки могут служить эффективными покрытиями для защиты раневых поверхностей кожи и пораженных участков ногтей. «Вторичные» пленки БЦ удобны в применении: хорошо фиксируются на коже и ногтях и свободно отдают лекарственные препараты.

Пектиново-целлюлозная пленка проявляет слабовыраженные антибактериальные свойства по сравнению с пленкой из чистой бактериальной целлюлозы (табл. 4), вероятно, за счет присутствия пектина в составе композита.

Пектиново-целлюлозная пленка имеет слабый отрицательный заряд за счет наличия в пектиновой молекуле свободных карбоксильных групп [5], поэтому способна удерживать положительно заряженные молекулы. Поэтому нами был использован мирамистин, представляющий собой катионное поверхностно-активное соединение. Пектиново-целлюлозные пленки, выдержанные в мирамистине проявляли выраженное антибактериальное действие, наиболее значительное по отношению к *Staphylococcus epidermidis*. По отношению к *Escherichia coli* были более эффективны влажные пектиново-целлюлозные пленки.

Для композитов, приготовленные на основе геля бактериальной целлюлозы, растительных экстрактов, хлоргексидина и ДМСО были проведены исследования на выявление аллергической реакции немедленного типа. Композит, состоящий из геля БЦ, экстракта календулы, хлоргексидина и ДМСО, не выявил наличия аллергической реакции на компоненты ни у одного из 10-ти испытуемых. Композит, содержащий экстракт алоэ, хлоргексидин и ДМСО, вызвал у одного из 10-ти появление зуда и покраснение вокруг пробы (положительная проба).

Таблица 4 – Зоны подавления роста *Staphylococcus epidermidis* и *Escherichia coli* вокруг дисков из различных носителей

	Диаметр зоны подавления роста микроорганизмов, мм	
	E.coli (размер диска 5 мм)	S. epidermis (размер диска 10 мм)
Сухая пектиново-целлюлозная пленка	6,3 ± 0,7	12,0 ± 0,1
Сухая целлюлозная пленка	0 сплошной рост	0 сплошной рост
Сухая пектиново-целлюлозная пленка, заранее выдержанная в мирамистине	5,3 ± 0,3	16,3 ± 0,3 *
Влажная пектиново-целлюлозная пленка, заранее выдержанная в мирамистине	7,6 ± 0,8°	14,8 ± 0,3*

°P < 0,05 по отношению к высушенной пленке *P < 0,05 по отношению к *Escherichia coli*

Полученные новые композиционные материалы на основе гелей и пленок бактериальной целлюлозы, обладают антибиотическими и биостимулирующими свойствами за счет входящих в их состав компонентов и могут быть использованы для приготовления покрытий раневых поверхностей.

ЛИТЕРАТУРА

Ревин В.В. Кленова Н.А., Белоусова З.П. и др. Получение и изучение свойств композитов на основе бактериальной целлюлозы и поли-N, N-диметил – 3,4 – метиленипирролидиний хлорида // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология, 2017. Т.7. № 1. С. 102–110.

Кленова Н.А., Овчинникова Т.А., Маркова Ю.А. и др. Получение, свойства, использование и скорость деградации пленок и гелей бактериальной целлюлозы, продуцируемой *Gluconacetobacter sucrofermentans* // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова, 2018. № 1. С. 27–31.

Аверьянова Е.В., Школьников М.Н. Пектин: методы выделения и свойства. Бийск: Изд-во Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова. 2015. 41 с.

Потиевский Э.Г., Дроздов В.Н. Антибактериальное действие пектина в эксперименте и клинике. Омск, 1997. – 96 с.

Хотимченко, Ю.С., Кропотов, А.В., Хотимченко, М.Ю. Фармакологическое свойство пектинов // Эффективная терапия, 2001. Т.7, № 4.С. 22–36.