



Машель В.В.¹✉, Кондратенко Г.Г.², Неверов П.С.², Протасевич А.И.², Слабко И.Н.²

¹ 10-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Нановолокна хитозана, модифицированные церием и серебром, как перспективный антимикробный агент

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Машель В.В. – участие в составлении концепции и дизайна исследования, участие в экспериментальной части исследования, обработка и суммирование экспериментальных данных, формулировка выводов, написание текста статьи; Кондратенко Г.Г. – концепция и дизайн исследования, формулировка выводов, редактирование; Неверов П.С. – обзор литературы, редактирование; Протасевич А.И. – обзор литературы, участие в составлении концепции и дизайна исследования; Слабко И.Н. – экспериментальная часть исследования, участие в суммировании экспериментальных данных, редактирование.

Финансирование. Работа выполнена 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». Рег. № в ГУ «БелИСА» 20220364 от 29.03.2022. Авторы не получали вознаграждений от компаний-производителей.

Подана: 16.03.2023

Принята: 12.06.2023

Контакты: 1.1.statut@gmail.com

Резюме

Введение. Проблема лечения инфицированных и длительно не заживающих ран остается актуальной в современной хирургии, вместе с тем количество госпитальных полирезистентных штаммов бактерий, участвующих в раневой инфекции, увеличивается. Одним из вариантов решения этой проблемы является разработка новых средств местного действия, в частности создание новых высокоэффективных раневых покрытий с антибактериальными и репаративными свойствами. С помощью специальной технологии из натурального биополимера хитозана получены нановолокна, обладающие сверхразвитой структурой и высокой сорбционной емкостью, непосредственно в состав которых в качестве антимикробных агентов введены ионы и наночастицы серебра и церия.

Цель. Определить антибактериальную активность нановолокон хитозана и его модификаций по отношению к клиническим изолятам микроорганизмов.

Материалы и методы. В эксперименте оценены антибактериальные свойства полученных образцов нановолокон хитозана в отношении госпитальных штаммов микроорганизмов методом диффузии в агар и количественным суспензионным методом.

Результаты. Доказана высокая антимикробная активность исследуемых образцов. Наиболее высокую антимикробную активность проявили образцы, модифицированные ионами серебра, наночастицами серебра, а также комплексом наночастиц серебра и церия. При оценке антимикробной активности методом диффузии в агар значения зоны задержки роста у этих образцов имели наибольшие размеры в диапазоне от 11 до 18 мм. Это соответствует результатам оценки суспензионным количественным методом. Показатели фактора редукции (RF) указанных образцов превосходили иные и составляли от 4,3 до 5,9 при экспозиции 3 часа и от 4,62 до 5,23 при экспозиции 24 часа.



Заключение. Отобраны наиболее перспективные образцы для дальнейшего изучения их лечебной эффективности на модели раневого процесса: нановолокна хитозана, модифицированные ионами серебра, наночастицами серебра и комплексом наночастиц серебра и церия.

Ключевые слова: хронические раны, хитозан, нановолокна, наночастицы, ионы, церий, серебро

Valery V. Mashel¹✉, Gennady G. Kondratenko², Pavel S. Neverov², Alexey I. Protasevich², Irina N. Slabko²

¹ 10th City Clinical Hospital, Minsk, Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Chitosan Nanofibers Modified with Cerium and Silver as a Promising Antimicrobial Agent

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Valery V. Mashel – participating in study concept and design, participating in experimental part of the study, processing and summarizing experimental data, formulating conclusions, text writing; Gennady G. Kondratenko – study concept and design, formulating conclusions, editing; Pavel S. Neverov – literature review, editing; Alexey I. Protasevich – literature review, participating in study concept and design; Irina N. Slabko – experimental part of the study, participating in summarizing experimental data, editing.

Funding. The work was carried out in accordance with the plan of scientific research under the assignment "To study the effect of chitosan nanofibers modified with silver and cerium nanoparticles on wound infection pathogens and reparative processes in violation of the integrity of the skin". Reg. No. in BelISA State Institution 20220364 dated March 29, 2022. The authors did not receive remuneration from manufacturing companies.

Submitted: 16.03.2023

Accepted: 12.06.2023

Contacts: 1.1.statut@gmail.com

Abstract

Introduction. The problem of infected and long-term non-healing wounds treatment remains relevant in modern surgery, while the number of hospital multi-resistant bacterial strains involved in wound infection is increasing. One of the options for resolving this issue is developing new local agents, in particular, new highly effective wound coatings elaboration having antibacterial and reparative properties. Using a special technology, nanofibers with an overdeveloped structure and high sorption capacity were obtained from the natural biopolymer chitosan with silver and cerium ions and nanoparticles introduced directly into their composition as antimicrobial agents.

Purpose. To determine the antibacterial activity of chitosan nanofibers and its modifications against clinical isolates of microorganisms.

Materials and methods. In the experiment, antibacterial properties of the obtained samples of chitosan nanofibers against hospital microorganism strains were evaluated using agar diffusion and quantitative suspension tests.

Results. Proven a high antimicrobial activity of samples tested. The samples modified with silver ions, silver nanoparticles, as well as with a complex of silver and cerium nanoparticles showed the highest antimicrobial activity. When assessing the antimicrobial activity by agar diffusion test method, the growth inhibition zone in these samples had

the largest dimensions in the range from 11 to 18 mm. This is consistent with the results of the evaluation by quantitative suspension test method. The reduction factor (RF) values of these samples were superior to the others and ranged from 4.3 to 5.9 at 3 hours exposure and from 4.62 to 5.23 at 24 hours exposure.

Conclusion. The most promising samples were selected for further study of their therapeutic efficacy on the wound process model: chitosan nanofibers modified with silver ions, silver nanoparticles and a complex of silver and cerium nanoparticles.

Keywords: chronic wounds, chitosan, nanofibers, nanoparticles, ions, cerium, silver

■ ВВЕДЕНИЕ

В физиологических условиях заживление ран происходит эффективно, однако при нарушении этого процесса могут возникать длительно не заживающие или хронические раны [1]. Основываясь на этиологии, хронические раны классифицируют на четыре категории: пролежни, диабетические язвы, язвы артериальной и венозной этиологии [2]. Для хронических ран характерна бактериальная колонизация, и именно она считается основной причиной хронического процесса [3]. Распространенность длительно не заживающих ран увеличивается с возрастом. В возрастной группе от 45 до 65 лет от них страдают 120 человек из 100 000, в группе старше 75 лет этот показатель увеличивается до 800 [4]. В зависимости от этиологии и тяжести септического воспалительного процесса, длительно не заживающие раны могут варьировать от поверхностных дефектов до жизнеугрожающих поражений [5]. На начальной стадии инфекционного процесса в раневом экссудате обычно преобладают грамположительные микроорганизмы, такие как *Staphylococcus aureus* (*St. aureus*), *Streptococcus pyogenes* (*St. pyogenes*), в то время как грамотрицательные микроорганизмы, такие как *Escherichia coli* (*E. coli*) и *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), обнаруживаются только на поздних стадиях процесса, т. е. данная микрофлора более характерна для длительно не заживающих ран [6].

Изменение микробного пейзажа, рост устойчивости патогенных штаммов микроорганизмов к современным антибактериальным препаратам диктует необходимость поиска и оценки эффективности различных химических элементов и соединений, а также их композиций в лечении хирургической инфекции. Особый интерес в данном направлении в последние годы представляет медицинское применение наноматериалов, в том числе изучение влияния наночастиц на патогенные микроорганизмы. Было показано, что при переходе на нанометровый уровень (диапазон от 1 до 100 нм) у материалов изменяются физико-химические свойства, которые невозможно предсказать [7]. Также установлено, что нульвалентное серебро в виде наночастиц может прикрепиться к клеточной стенке микроорганизмов и выделять ионы, когда находится во взвешенном состоянии в растворе. Биodeградируемые материалы, к которым относится биополимер хитозан, постепенно разрушаясь, способны высвобождать наночастицы, поэтому образцы модификаций нановолокон хитозана частицами серебра, церия и их комплексом потенциально могут стать новым средством для создания высокоэффективных раневых покрытий.



■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить антибактериальную активность нановолокон хитозана и его модификаций по отношению к клиническим изолятам микроорганизмов.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые образцы модифицированных нановолокон хитозана были представлены УО «БГТУ». Оценивались следующие образцы:

- 1) нановолокна хитозана, модифицированные ионами серебра (Ag ионы);
- 2) нановолокна хитозана, модифицированные ионами церия (Ce ионы);
- 3) нановолокна хитозана, модифицированные ионами серебра и церия (Ag + Ce ионы);
- 4) нановолокна хитозана, модифицированные наночастицами серебра (Ag наночастицы);
- 5) нановолокна хитозана, модифицированные наночастицами церия (Ce наночастицы);
- 6) нановолокна хитозана, модифицированные наночастицами серебра и церия (Ag + Ce наночастицы).

Все образцы были помещены в специальную упаковку и простерилизованы низкотемпературной плазмой. Характеристики изучаемых образцов приведены в таблице.

Исследования антимикробной активности нановолокон хитозана были выполнены сотрудниками лаборатории внутрибольничных инфекций научно-исследовательской части УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Антимикробную активность нановолокон хитозана, модифицированных ионами серебра и церия, а также наночастицами серебра и церия, оценивали методом диффузии в агар [8] и количественным суспензионным методом [9]. Было оценено 175 фрагментов образцов, из них 105 – методом диффузии в агар, 70 – количественным суспензионным методом.

В эксперименте была исследована антимикробная активность по отношению к клиническим изолятам *P. aeruginosa* (n=1), *A. baumannii* (n=1), *Kl. pneumoniae* (n=1), *E. coli* (n=1), *St. aureus* (n=1), выделенным в 2022 году от пациентов, находящихся на стационарном лечении в отделениях различного профиля г. Минска.

Характеристики изучаемых образцов
Characteristics of test samples

Образец	Плотность нанесения, г/м ²	Средний диаметр волокон, нм	Содержание Ag/Ce, % мас.	Диаметр частиц, нм
Нановолокна хитозана (контроль)	10,5	250	–	–
Ag ионы	11,0	210	3,75	715<
Ce ионы	11,5	200	3,55	320<
Ag + Ce ионы	10,5	220	1,29/1,65	570<
Ag наночастицы	11,5	210	3,75	70<
Ce наночастицы	10,5	200	3,31	40<
Ag + Ce наночастицы	11,0	220	1,69/1,23	65<

Выбор клинических изолятов был основан на приближенности их характеристик резистентности к таковым у наиболее часто встречающихся микробов по материалам микробиологического мониторинга в стационарах г. Минска в 2017–2021 гг.

Бактерии культивировали на питательных средах: мясо-пептонный агар (МПА) (HiMedia, Индия), мясо-пептонный бульон (МПБ) (HiMedia, Индия) – при 35 ± 2 °C в течение 18–24 ч.

Суспензии микроорганизмов готовили из 18-часовых культур, разводя их в стерильном изотоническом растворе до плотности 0,5 по стандарту мутности Мак-Фарланда ($1-2 \times 10^8$ КОЕ/мл) и затем полученные суспензии разводили еще в 10 раз ($1-2 \times 10^7$ КОЕ/мл). Полученными суспензиями «газоном» засеивали питательные среды. После высыхания микробной суспензии на поверхности агара наносили исследуемые образцы хитозана (размер 1×1), в количестве 3 шт. каждого образца на 1 чашку Петри. Чашки Петри инкубировали в термостате при температуре 35 ± 2 °C в течение 24–48 ч.

Учет производили, измеряя размер зон задержки роста вокруг образцов. В качестве контроля использовали образец с немодифицированными нановолокнами хитозана.

Для оценки антимикробной активности количественным суспензионным методом экспериментальные 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%-ной лошадиной сывороткой стандартизировали до 107 КОЕ/мл по стандарту мутности, суспензию вносили в воду с изучаемым образцом (температура раствора 200 °C) в соотношении 1:10. Через 3 и 24 часа производились посевы по 0,1 мл микробной взвеси на сектора чашек Петри с питательными средами. 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 путем вычитания десятичного логарифма КОЕ/мл после экспозиции от десятичного логарифма изначального количества КОЕ/мл.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования антибактериальной активности изучаемых образцов хитозана методом диффузии в агар на плотной питательной среде приведены на гистограмме на рис. 1. Контролем в исследовании служили фрагменты немодифицированных нановолокон хитозана. Собственные антибактериальные свойства нановолокон хитозана в отношении клинических изолятов микроорганизмов оказались невыраженными: даже непосредственно под образцами отмечен рост всех участвующих в исследовании микроорганизмов.

Высокую антимикробную активность в отношении госпитальных штаммов бактерий проявили нановолокна хитозана, модифицированные серебром, как ионами, так и наночастицами. При этом в отношении *P. aeruginosa* и *A. baumannii* большую активность проявили нановолокна хитозана, модифицированные ионами серебра, а в отношении *K. pneumoniae* и *St. aureus* нановолокна хитозана, модифицированные наночастицами серебра. В отношении *E. coli* антимикробная активность этих образцов была примерно одинакова.

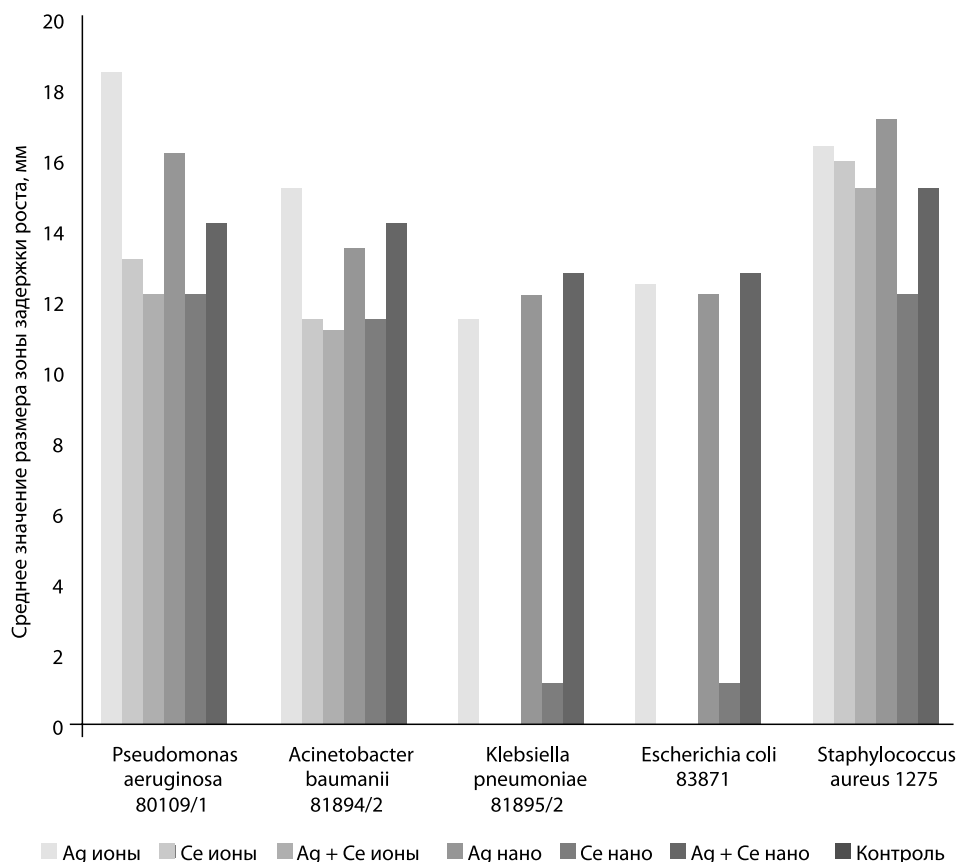


Рис. 1. Изучение антибактериальной активности исследуемых образцов методом диффузии в агар
Fig. 1. Study of the antibacterial activity of test samples by agar diffusion method

Установлено, что антимикробные свойства нановолокон хитозана, модифицированных ионами и наночастицами церия, выражены умеренно, они были ниже, чем у образцов, модифицированных серебром, но значительно выше, чем у немодифицированных нановолокон хитозана.

Антимикробная активность модификации нановолокон хитозана наночастицами и ионами церия была примерно одинаковой. Только в отношении *S. aureus* активность нановолокон хитозана, модифицированных ионами церия, была выше, чем у таковых, модифицированных наночастицами церия.

Интерес представляет сравнение антимикробной активности нановолокон хитозана, модифицированных ионами и наночастицами серебра и церия в комплексе. Нановолокна хитозана, модифицированные ионами серебра и церия, на данном этапе исследования проявили наиболее низкую активность среди всех оцененных

модифицированных нановолокон хитозана, что, вероятно, объясняется более низкой концентрацией каждого из металлов. Если в случае модификации только одним металлом (как для ионов, так и для наночастиц) его массовая доля составляла 3%, то в случае модификации церием и серебром в комплексе такая же массовая доля была суммарной для обоих металлов, т. е. массовая доля каждого металла по отдельности была примерно в 2 раза ниже.

Из сравнения антимикробных свойств нановолокон хитозана, модифицированных комплексом ионов и модифицированных комплексом наночастиц серебра и церия, можно сделать вывод о том, что антимикробная активность наночастиц проявляется при значительно меньшей концентрации металлов.

Значения размеров задержки зоны роста вокруг образцов нановолокон хитозана, модифицированных комплексом наночастиц серебра и церия, были сравнимы с таковыми у образцов, модифицированных только ионами и только наночастицами серебра, а в отношении *K. pneumoniae* и *E. coli* превосходили их. Стоит подчеркнуть, что *K. pneumoniae* является клинически значимым госпитальным штаммом с высокой резистентностью к антибактериальным средствам, доля которого в микробном пейзаже ран за последние 5 лет возросла. Результаты изучения антибактериальной активности исследуемых образцов количественным суспензионным методом через 3 часа и через 24 часа экспозиции представлены на рис. 2 и 3.

Согласно полученным в количественном суспензионном методе данным, все модифицированные образцы нановолокон хитозана проявили антимикробную активность. Однако нановолокна хитозана, модифицированные серебром как в виде ионов, так и в виде наночастиц, продемонстрировали наиболее высокую антимикробную активность через 3 и через 24 часа экспозиции. Через 3 часа экспозиции в отношении *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli* фактор редукции был выше 5,0, а в отношении *St. aureus* RF равнялся 4,7. Важно отметить, что антимикробное влияние нановолокон хитозана, модифицированных наночастицами серебра, церия и их комплексами, в отношении госпитальных штаммов через 24 часа экспозиции снизилось лишь незначительно. Так, RF у *P. aeruginosa* и *E. coli* уменьшился на 0,3, у *A. baumannii* на 0,69, у *S. aureus* лишь на 0,08. Интересным является тот факт, что в отношении *K. pneumoniae* под влиянием модифицированных наночастицами серебра нановолокон хитозана при экспозиции 3 часа $RF=4,3$, а при экспозиции 24 часа этот показатель увеличился до 5,23. Антимикробная активность нановолокон хитозана, модифицированных ионами церия, оказалась выше таковой у нановолокон хитозана, модифицированных наночастицами церия, причем для последних была характерна отличная от остальных образцов закономерность: их антимикробная активность с увеличением длительности экспозиции возрастала, а не снижалась, что, вероятно, связано с более медленным высвобождением наночастиц церия в раствор из структуры нановолокон хитозана. Исключением были лишь опыты в отношении *A. baumannii*. Нановолокна хитозана, модифицированные сочетанием ионов серебра и церия, проявили наиболее низкие антибактериальные свойства в отношении *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, что сходится с данными, полученными в эксперименте на твердой питательной среде.

Таким образом, нановолокна хитозана, модифицированные ионами серебра, проявили высокие показатели антимикробной активности в отношении специально

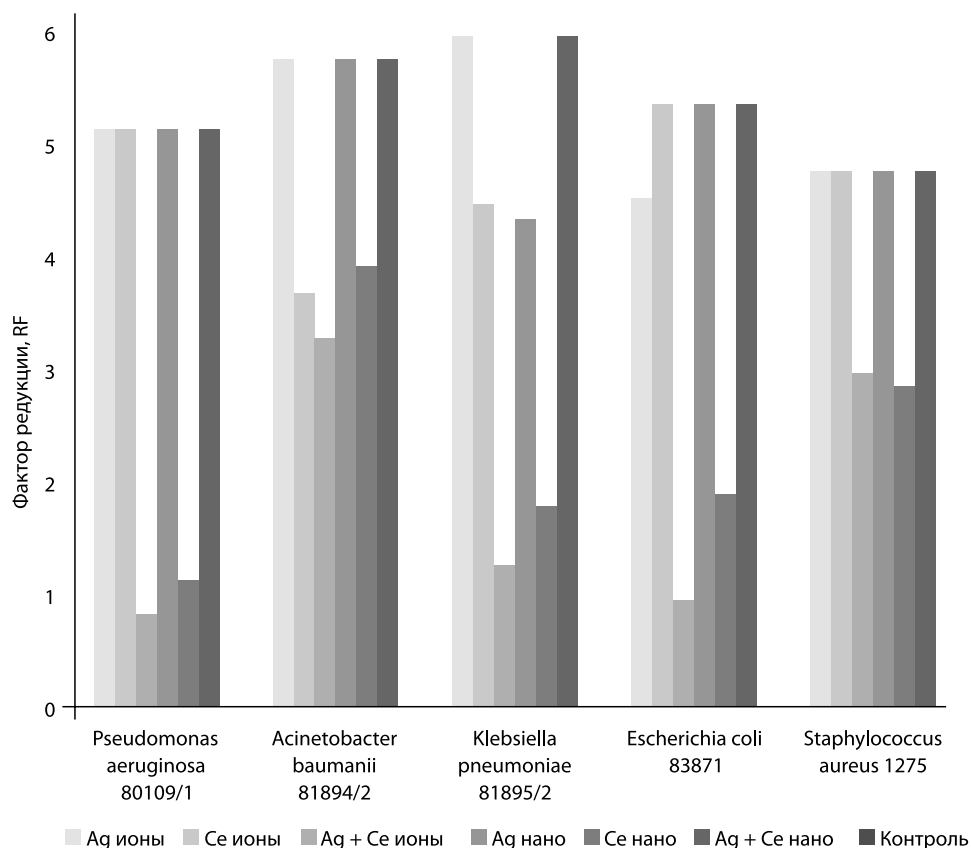


Рис. 2. Изучение антибактериальной активности исследуемых образцов количественным суспензионным методом, экспозиция 3 часа

Fig. 2. Study of the antibacterial activity of test samples by quantitative suspension method, exposure for 3 hours

отобранных госпитальных штаммов *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *St. aureus*. Образцы нановолокон хитозана с ионами церия проявили умеренную антимикробную активность в отношении госпитальных штаммов бактерий.

Антимикробная активность образцов нановолокон хитозана, модифицированных комплексом ионов серебра и церия, заметно ниже таковой у образцов, модифицированных только серебром или только церием, что, по-видимому, связано с более низкой концентрацией металлов.

Образцы нановолокон хитозана с наночастицами серебра продемонстрировали высокие антимикробные свойства в отношении всех специально отобранных госпитальных штаммов, эти свойства оказались несколько выше таковых у нановолокон хитозана, модифицированных ионами серебра. Нановолокна хитозана

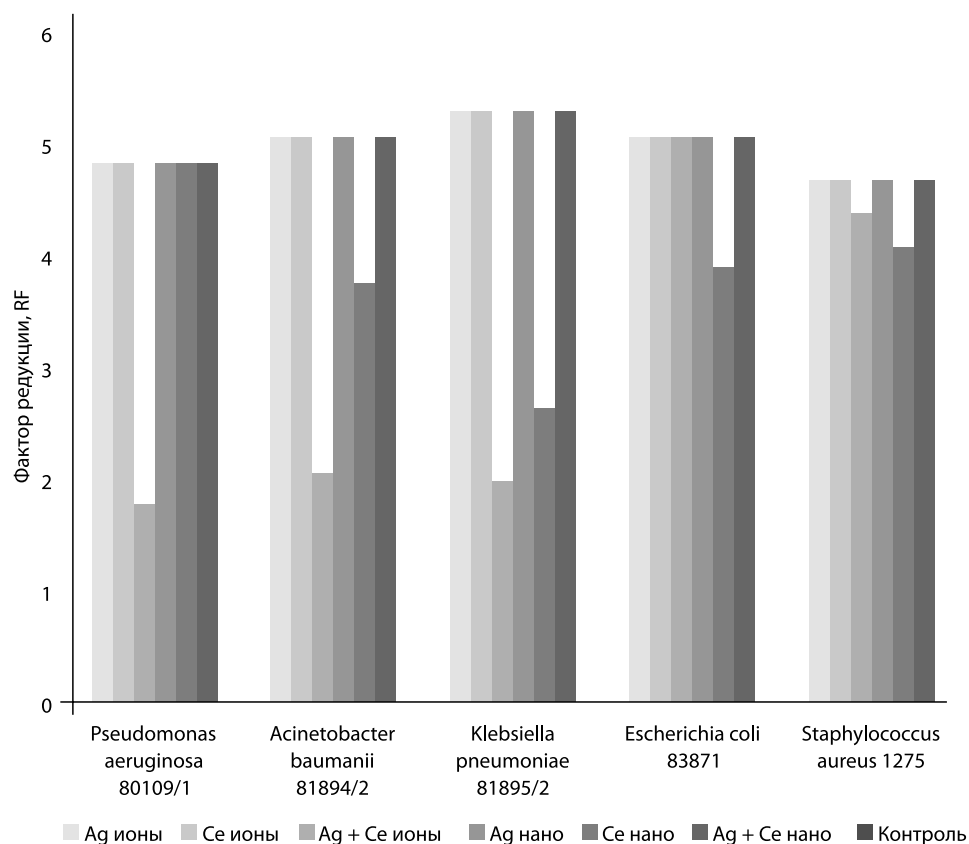


Рис. 3. Изучение антибактериальной активности исследуемых образцов количественным суспензионным методом, экспозиция 24 часа
Fig. 3. Study of the antibacterial activity of test samples by quantitative suspension method, exposure for 24 hours

с наночастицами церия проявили высокую антимикробную активность в отношении *P. aeruginosa* и *St. aureus* и умеренную в отношении *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, уступая в активности нановолокнам хитозана с ионами церия. Образцы нановолокон хитозана, модифицированные комплексом наночастиц серебра и церия, проявили антимикробные свойства, сопоставимые с таковыми у образцов, модифицированных только ионами и только наночастицами серебра, а в отношении *K. pneumoniae*, *Escherichia coli* – превосходящими их.

Низкая концентрация металлов в исследуемых материалах в перспективе может принести как клиническую пользу за счет уменьшения нежелательных явлений, связанных с воздействием серебра и церия на организм пациента, так и экономическую выгоду за счет уменьшения количества необходимого сырья, представляющего собой драгоценные и редкие металлы.



■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нановолокна хитозана, модифицированные наночастицами серебра, наночастицами церия, а также комплексом наночастиц серебра и церия, проявляют высокую антимикробную активность в отношении всех изученных госпитальных штаммов *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *St. aureus*. Поэтому образцы именно этих составов представляют интерес для дальнейшего исследования их лечебного действия в эксперименте на модели раневого процесса.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Järbrink K. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Syst. Rev.* 2016;5:152–158. doi: 10.1186/s13643-016-0329-y
2. Eming S.A., Martin P., Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Translational Med.* 2014;6:265–266. doi: 10.1126/scitranslmed.3009337
3. Bowler G. Wound pathophysiology, infection and therapeutic options. *Ann. Med.* 2002;34:419–427. doi: 10.1080/078538902321012360
4. Natarajan S. Advances in wound care and healing technology. *Am J Clin Dermatol.* 2000;1:269–275. doi: 10.2165/00128071-200001050-00002
5. Ki V., Rotstein C. Bacterial skin and soft tissue infections in adults: a review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2008;19:173–184. doi: 10.1155/2008/846453
6. Cardona F., Wilson S.E. Skin and soft-tissue infections: a critical review and the role of telavancin in their treatment. *Clin. Infect. Dis.* 2015;61:69–78. doi: 10.1093/cid/civ528
7. Rzheussky S. Silver nanoparticles in medicine. *Vestnik VGMU.* 2022;21(2):15–24. doi: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2022.2.15>. (in Russian)
8. Sidorenko S., Kolupaev V. *Antibiogram: Disk diffusion method. Interpretation of results.* M.: "Arina", 1999. 32 p. (in Russian)
9. *Methods for testing and evaluating the antimicrobial activity of disinfectants and antiseptics. Instructions for use.* Registration number 11-20-204-2003. Approved on December 22, 2003 by the Chief State Sanitary Doctor of the Republic of Belarus. (in Russian)