

УДК 615.281:577.1

СИНТЕЗ СЕЛЕНСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА И ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2022 г. А. Р. Егоров^{1, *}, А. А. Артемьев¹, В. А. Козырев¹, Д. Н. Сикаона¹, В. В. Рубаник², В. В. Рубаник мл.², И. С. Критченков³, Н. З. Ягафаров^{1, 4}, О. М. Хубиев¹, Т. А. Терёшина¹, Е. К. Култышкина¹, Б. Меджбур¹, В. Н. Хрусталёв^{1, 5}, А. С. Критченков^{1, 2, **}

¹Российский университет дружбы народов, Москва, 117198 Россия

²Институт технической акустики НАН Беларуси, Витебск, 210009 Беларусь

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия

⁵Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991 Россия

*e-mail: sab.icex@mail.ru

**e-mail: kritchenkov-as@rudn.ru

Поступила в редакцию 20.08.2021 г.

После доработки 25.10.2021 г.

Принята к публикации 05.11.2021 г.

Взаимодействие хитозана с 3-(хлорметил)-[1,2,4]селендиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромидом приводит к образованию водорастворимых селенсодержащих катионных производных хитозана. Получены производные хитозана со степенью замещения 0.15, 0.45 и 0.65. Производные характеризовались выраженной антибактериальной активностью *in vitro* в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, причем антибактериальная активность производных возрастала с увеличением степени замещения. Антибактериальная активность высокозамещённого производного была сопоставима с антибактериальной активностью традиционных антибиотиков ампициллина и гентамицина.

Ключевые слова: хитозан, селен, гетероциклы, антибактериальная активность

DOI: 10.31857/S0555109922020052

В связи с неуклонным ростом резистентности возбудителей нозокомиальных и внебольничных инфекций к антимикробным лекарственным средствам разработка и синтез новых эффективных антибактериальных препаратов является одной из приоритетных задач современной фармакологии. Среди различных соединений с антибактериальной активностью хитозан выгодно отличается биосовместимостью, гипоаллергенностью, биodeградируемостью и отсутствием токсичности.

Хитозан представляет собой линейный природный полимер, состоящий из звеньев глюкозамина, чередующихся со звеньями *N*-ацетилглюкозамина. Производные хитозана часто характеризуются выраженной антибактериальной активностью [1]. Известно, что производные хитозана обладают сразу несколькими механизмами антибактериального действия, которые по своей сути являются универсальными физико-химическими механизмами: электростатическое взаимодействие поликатиона с отрицательно заряженной поверхностью бактериальной клетки, хелатирование и связывание важных для микробной клетки ионов и нутриен-

тов и др. В связи с комплексным сложным антибактериальным действием производных хитозана проявление резистентности бактерий к данным полимерам в ближайшем будущем маловероятно, если вообще возможно [2].

В сложном механизме антибактериального действия хитозана ключевым моментом является взаимодействие хитозанового поликатиона с отрицательно заряженной поверхностью бактериальной клетки. Хитозановый поликатион формируется благодаря основным свойствам первичных аминогрупп макромолекулы хитозана. Электростатическое взаимодействие такого поликатиона с бактериальной клеткой приводит как минимум к двум неблагоприятным для клетки последствиям: резкому изменению проницаемости мембраны, которое вызывает внутренний осмотический дисбаланс и, следовательно, ингибирует рост микроорганизмов. Кроме того происходит гидролитическое расщепление пептидогликанов в стенке микроорганизма, что приводит к утечке внутриклеточных электролитов, таких как ионы калия, а также важных компонентов органической природы, таких

Таблица 1. Условия синтеза и степени замещения производных

СЗ	Шифр производного	T, °C	pH	CЗ _N	CЗ _O	МС*	Время
0.15	X-Se-15	60°C	3	0.15	0	1 : 2.2	7 ч
0.45	X-Se-45	60°C	3	0.45	0	1 : 6.0	7 ч
0.65	X-Se-65	60°C	3	0.50	0.15	1 : 13.5	7 ч

* МС – мольное соотношение хитозан : 3-(хлорметил)- [1, 2, 4]селендиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромид.

как белки, нуклеиновые кислоты, глюкоза, лактадегидрогеназа и др. [3]. Эти неблагоприятные для бактериальной клетки процессы в конечном итоге приводят к ее гибели.

Особенностями хитозана, сильно ограничивающими его антибактериальный эффект являются его плохая растворимость в воде и невысокая катионная плотность. Введение катионного заместителя способно преодолеть эти ограничения [4–6]. Обычно для этих целей используют химическую модификацию хитозана заместителем, содержащим кватернизованный атом азота.

Известно также, что ряд селенсодержащих гетероциклов характеризуется выраженным антибактериальным эффектом и фармакологической активностью [7]. В связи с этим, селенсодержащие производные хитозана представляют несомненный интерес как потенциальные антибактериальные агенты, однако до настоящего исследования они не были описаны в литературе.

Цель работы – проведение химической модификации хитозана селенсодержащим катионным гетероциклическим фрагментом и исследовании антибактериальной активности полученных производных хитозана в сравнении с исходным хитозаном и антибиотиками гентамицином и ампициллином в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий (*Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*).

МЕТОДИКА

В настоящем исследовании использовали крабовый хитозан (ООО “Биопрогресс”, Россия) со средней молекулярной массой 3.6×10^4 , степенью ацетилирования 0.26, влажностью 8.8%, 3-(хлорметил)-[1, 2, 4]селендиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромид, любезно предоставленный А.Г. Цховребовым (Российский университет дружбы народов, Россия). Диализные мембраны MWCO 12.000–14.000 были приобретены в Orange Scientific (“Braine-l’Alleud”, Бельгия). Спектры ЯМР ¹H регистрировали на приборе Bruker Avance (“Bruker”, США) II+ 400 MHz в растворе D₂O/CF₃COOH 100/1 при 70°C. Интегральную интенсивность сигналов H-1 глюкозаминных фрагментов хитозана и его производных принимали за 1.

Синтез селенсодержащих производных хитозана проводили следующим образом. 0.1 г хитозана

на растворяли в 10 мл 1%-ной уксусной кислоты, pH 3.0, и добавляли 2.2, 6.0 или 13.5 эквивалентов 3-(хлорметил)-[1, 2, 4]селендиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромида. Реакционную смесь укупили, барботировали аргоном, перемешивали при 60°C в течение 7 ч на магнитной мешалке. Образовавшиеся полимеры осаждали ацетоном, отмывали от примесей низкомолекулярных соединений метанолом, диэтиловым эфиром, растворяли в дистиллированной воде и диализовали против дистиллированной воды 3 сут, затем лиофильно высушивали.

Антибактериальную активность полученных производных хитозана изучали методом диффузии в агар в отношении штаммов *S. aureus* RCMB 010027 и *E. coli* RCMB 010051 (коллекция микроорганизмов Витебского государственного медицинского университета, Беларусь). В качестве коммерчески доступных антибиотиков для сравнения в случае *S. aureus* использовали ампициллин, а в случае *E. coli* – гентамицин (“Aldrich”, США). Активность определяли путем измерения диаметра зоны ингибирования (в мм). Каждую зону ингибирования измеряли после суточного выращивания в термостате при 37°C. Опыты повторяли не менее трех раз [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Селенсодержащие производные хитозана были получены путём обработки хитозана 3-(хлорметил)-[1, 2, 4]селендиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромидом (рис. 1). Реакцию проводили при 60°C, pH 3, в течение 7 ч.

Варьируя избыток 3-(хлорметил)-[1, 2, 4]селендиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромида, были получены производные хитозана с низкой (0.15), средней (0.45) и высокой (0.65) степенью замещения (СЗ). В случае небольшого избытка реагента при синтезе низко- и среднезамещённых производных реакция протекала селективно по аминогруппе хитозана с образованием N-замещённых полимеров (рис. 1, реакция I). В случае использования большого избытка реагента (13.5-кратного) образуются высокозамещённые производные (СЗ = 0.65), при этом доля N-замещения (СЗ_N) составляла 0.50, а доля O-замещения (СЗ_O) – 0.15 (рис. 1, реакция II). Строение полученных соединений было подтверждено с помо-

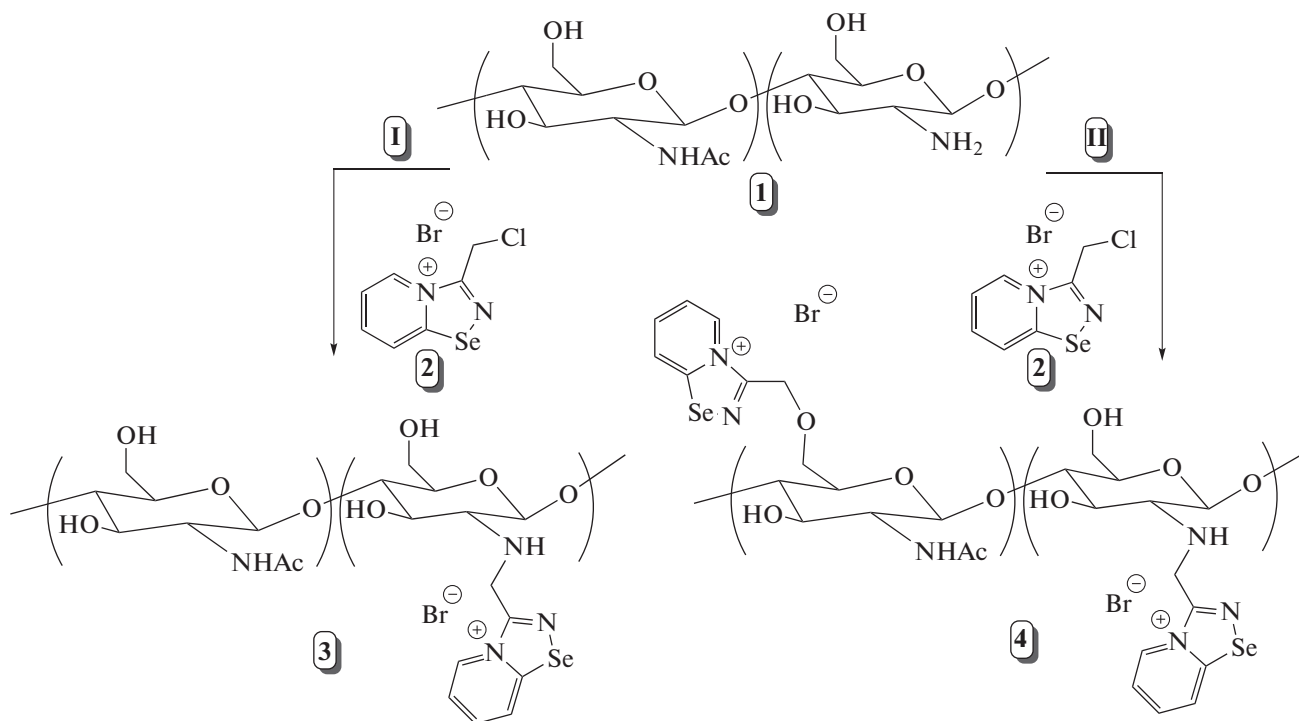


Рис. 1. Синтез селенсодержащих производных хитозана: 1 – хитозан; 2 – (хлорметил)-[1, 2, 4]селенадiazоло[4,5-а]пиридиния бромид; 3 – *N*-([1, 2, 4]селенадiazоло[4,5-а]пиридин-3-илметил) хитозан; 4 – *N,O*-([1, 2, 4]селенадiazоло[4,5-а]пиридин-3-илметил) хитозан; I – реакция при небольшом избытке реагента 3-(хлорметил)-[1, 2, 4]селендiazоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромида; II – реакция при большом избытке реагента 3-(хлорметил)-[1, 2, 4]селендiazоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромида.

щью спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H . Типичный спектр приведен на рис. 2.

Антибактериальная активность полученных производных была изучена *in vitro* с использованием метода диффузии в агар. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Данные, приведенные в табл. 2 свидетельствуют о том, что антибактериальная активность всех полученных производных хитозана превышала таковую для исходного хитозана. При этом анти-

бактериальный эффект производных повышался с увеличением степени замещения. С одной стороны, данный факт может быть объяснен повышением катионной плотности при увеличении доли катионного заместителя в макромолекуле. С другой стороны, возможно, введенный гетероциклический селенсодержащий заместитель характеризуется сам по себе наличием выраженного антибактериального эффекта. Для проверки данного предположения была исследована антибактериальная активность соответствующих введенному заместителю а низкомолекулярных соединений б и в (рис. 3).

Было показано, что низкомолекулярные соединения б и в характеризовались выраженной антибактериальной активностью в отношении как *S. aureus*, так и *E. coli*, причем их антибактериальная активность сопоставима с таковой для антибиотиков ампициллина и гентамицина. Следует также отметить, что высокзамещенное селенсодержащее производное хитозана X-Se-65 характеризовалось антибактериальным эффектом, превышающим действие ампициллина и гентамицина. Этот факт может быть объяснен симбатным эффектом введенного в хитозановую матрицу антибактериального селенсодержащего фармакофора и полимерной цепи. По-видимому, это связано с тем, что полимерная

Таблица 2. Антибактериальная активность полученных производных

Образец	Микроорганизм	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
	зона ингибирования, мм*	
Хитозан	14.3 ± 0.1	11.4 ± 0.3
Ампициллин	30.3 ± 0.1	–
Гентамицин	–	22.2 ± 0.3
В	30.8 ± 0.3	21.4 ± 0.3
С	30.4 ± 0.1	21.6 ± 0.2
X-Se-15	20.6 ± 0.1	12.4 ± 0.3
X-Se-45	26.8 ± 0.3	17.6 ± 0.2
X-Se-65	34.4 ± 0.2	26.3 ± 0.2

* Среднее значение ± стандартное отклонение ($n = 3$).

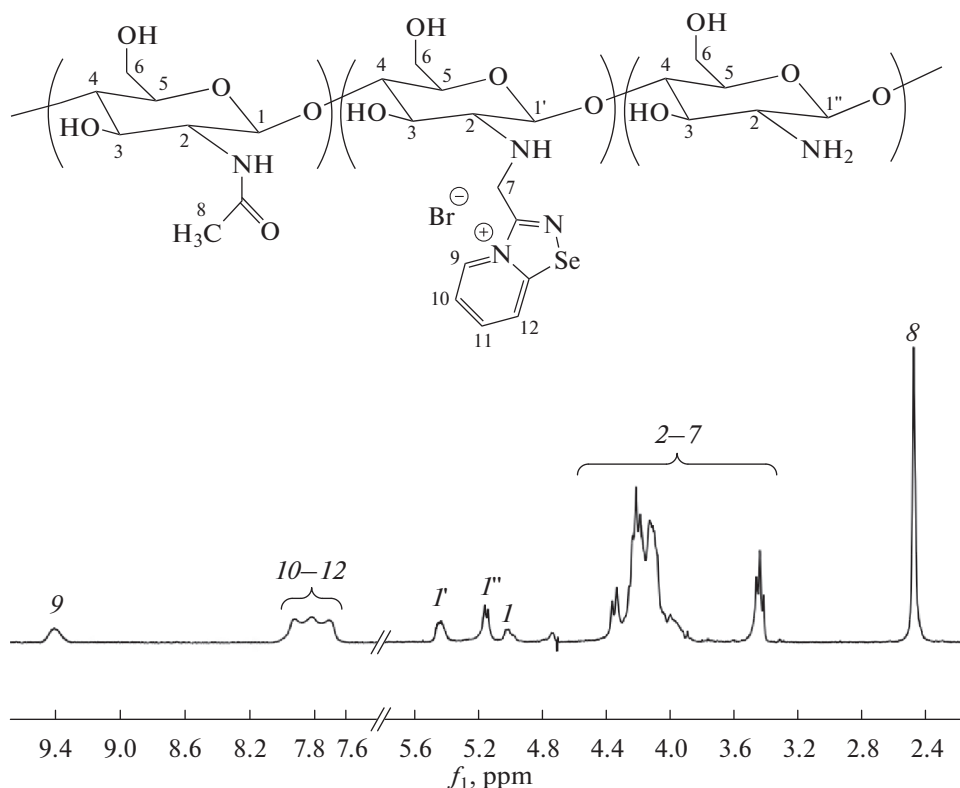


Рис. 2. ЯМР-спектр *N*-([1, 2, 4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-3-илметил) хитозана со степенью замещения 0.45 (X-Se-45).

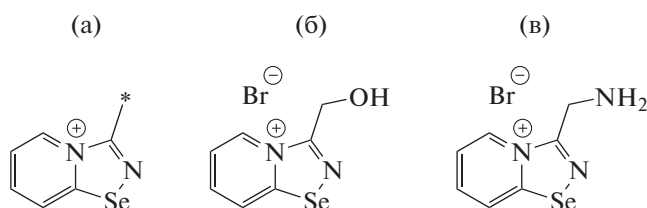


Рис. 3. Заместитель и соответствующие низкомолекулярные соединения, где а – 3-метил- [1, 2, 4]селенадиазоло[4,5-а]пиридиний; б – 3-(гидроксиметил)- [1, 2, 4]селенадиазоло[4,5-а]пиридиния бромид; в – 3-(аминометил)- [1, 2, 4]селенадиазоло[4,5-а]пиридиния бромид.

цепь способна принимать конформацию, обеспечивающую наиболее сильное ее связывание с мембраной микробной клетке по сравнению с низкомолекулярным соединением и, следовательно, что приводит к более выраженной дисфункции клеточной мембраны.

Таким образом, в результате работы получено высокоактивное антибактериальное катионное селенсодержащее производное хитозана, представляющее несомненный интерес для дальнейших исследований *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН “Приоритет-2030”, РФФИ (№№ 20-53-04027 и 20-53-00009) и БРФФИ (Т20Р-375 и

X21PM-081) в рамках научных проектов, РФФИ и ВАНТ в рамках научного проекта № 20-53-54006, РФФИ в рамках научных проектов №№ 19-016-00077, 19-33-60039 и 20-04-60014.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seidi F, Yazdi M. K., Jouyandeh M., Dominic M., Naeim H., Nezhad M. N., Bagheri B., Habibzadeh S., Zarrintaj P., Saeb M. R., Mozafari M. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 183. P. 1818–1850.
2. Tien N.D., Lyngstadaas S.P., Mano J.F., Blaker J.J., Haugen H.J. // *Molecules.* 2021. V. 26. № 9. <https://doi.org/10.3390/molecules26092683>
3. Ke C.L., Deng F.S., Chuang C.Y., Lin C.H. // *Polymers.* 2021. V. 13. № 6. <https://doi.org/10.3390/polym13060904>
4. Kritchenkov A.S., Egorov A.R., Dysin A.P., Volkova O.V., Zabodalova L.A., Suchkova E.P., Kurliuk A.V., Shakola T.V. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 137. P. 592–603.
5. Kritchenkov A.S., Egorov A.R., Artemjev A.A., Kritchenkov I.S., Volkova O.V., Kurliuk A.V., Shakola T.V., Rubanik V.V., Tskhovrebov A.G., Yagafarov N.Z., Khrustalev V.N. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 143. P. 143–152.
6. Kritchenkov A.S., Egorov A.R., Volkova O.V., Kritchenkov I.S., Kurliuk A.V., Shakola T.V., Khrustalev V.N. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 139. P. 103–113.

7. *Semenov K.N., Charykov N.A., Keskinov V.A., Kritchenkov A.S., Murin I.V.* // Industrial & Engineering Chemistry Research. 2013. V. 52. № 46. P. 16095–16100.
8. *Bioassay Techniques for Drug Development.* / Ed. *A.-u.-Rahman, M.I. Choudhary, W.J. Thomson.* Harwood Academic Publishers. 2005.

Synthesis of Selenium-Containing Chitosan Derivatives and Their Antibacterial Activity

**A. R. Egorov^{a,*}, A. A. Artemjev^a, V. A. Kozyrev^a, D. N. Sikaona^a, V. V. Rubanik^b, V. V. Rubanik Jr.^b,
I. S. Kritchenkov^c, N. Z. Yagafarov^{a,d}, O. M. Khubiev^a, T. A. Tereshina^a, E. K. Kultyshkina^a,
B. Medjbour^a, V. N. Khrustaley^{a,e}, and A. S. Kritchenkov^{a,b,**}**

^a Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Faculty of Science,
Miklukho-Maklaya St., 6, Moscow, 117198 Russia

^b Institute of Technical Acoustics NAS of Belarus, Ludnikova Prosp., 13, Vitebsk, 210009, Republic of Belarus

^c Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia

^d Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovityanov Street, Moscow, 117997 Russia

^e Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS, Leninsky Prosp., 47, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: sab.icex@mail.ru

**e-mail: kritchenkov-as@rudn.ru

The interaction of chitosan with 3-(chloromethyl)-[1,2,4]seleniazolo[4,5-a] pyridin-4-ium bromide leads water-soluble selenium-containing cationic chitosan derivatives. Derivatives of chitosan with degrees of substitution of 0.15, 0.45, and 0.65 were obtained. These derivatives are characterized by a pronounced *in vitro* antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and the antibacterial activity of the derivatives increases with an increase in their degree of substitution. The antibacterial activity of the highly substituted derivative is comparable to that of the conventional antibiotics ampicillin and gentamicin.

Keywords: chitosan, selenium, heterocycles, antibacterial activity