

УДК 577.114.083:615.281

Диэтиламиноэтилхитозан: синтез и антибактериальная активность

Критченков А.С.^{1,2}, Курлюк О.В.³, Шаколо Т.В.³, Егоров А.Р.², Федотова Ю.О.⁴¹Российский университет дружбы народов (Москва, Российская Федерация)²ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» (Российская Федерация)³Витебский государственный медицинский университет (Республика Беларусь)⁴ФГБУН «Институт физиологии им. Павлова» РАН (Санкт-Петербург, Российская Федерация)

Diethylaminoethylchitosan: synthesis and antibacterial activity

Kritchenkov A.S.^{1,2}, Kurlyuk O.V.³, Shakolo T.V.³, Egorov A.R.², Fedotova Yu.O.⁴¹Peoples' Friendship University of Russia (Moscow, the Russian Federation)²St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics (the Russian Federation)³Vitebsk State Medical University (the Republic of Belarus)⁴Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences (St. Petersburg, the Russian Federation)

АННОТАЦИЯ

В результате эксперимента получены неселективно замещенный *N,O*-диэтиламиноэтилхитозан (ДЭАЭ-ХЗ-I) с высокой степенью замещения 1.2 и селективно *N*-замещенный диэтиламиноэтилхитозан (ДЭАЭ-ХЗ-II) с умеренной степенью замещения 0.57. Диэтиламиноэтильный заместитель обуславливает повышенную антибактериальную активность *in vitro* полученных полимеров по сравнению с исходным хитозаном. Антибактериальная активность диэтиламиноэтильных производных возрастает с увеличением степени замещения. Наибольшая антибактериальная активность выявлена для производного ДЭАЭ-ХЗ-I. Токсичность полученных производных также возрастает с увеличением степени замещения и для высокозамещенного производного имеет выраженную зависимость от концентрации. В концентрациях, близких к минимальной ингибирующей концентрации, токсичность обоих производных сопоставима с токсичностью исходного хитозана. Полученные производные представляют интерес для дальнейших исследований *in vivo*.

Ключевые слова: антибактериальная активность, полисахариды, антибиотики, полимераналогичные превращения.

ABSTRACT

In this study, non-selectively substituted *N,O*-diethylaminoethylchitosan (DEAE-CS-I) with a high degree of substitution of 1.2 and selectively *N*-substituted diethylaminoethylchitosan (DEAE-CS-II) with a moderate degree of substitution of 0.57 were obtained. The diethylaminoethyl substituent causes increased antibacterial activity *in vitro* of the obtained polymers compared to the initial chitosan. The antibacterial activity of diethylaminoethyl derivatives increases with a rise of the degree of substitution. The highest antibacterial activity was detected for the DEAE-CS-I derivative. The toxicity of the derivatives obtained also increases with an growth in the degree of substitution and, for a highly substituted derivative, has a pronounced dependence on concentration. At concentrations close to the minimum inhibitory concentration, the toxicity of both derivatives is comparable to the toxicity of the starting chitosan. The derivatives obtained are of interest for further *in vivo* studies.

Keywords: antibacterial activity, polysaccharides, antibiotics, polymer-analogous transformations.

Поступила 23.12.2018
Принята 18.01.2019

*Автор, ответственный за переписку
Критченков Андрей Сергеевич: Российский университет дружбы народов, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.
E-mail: platinist@mail.ru

Received 23.12.2018
Accepted 18.01.2019

*Corresponding author
Kritchenkov Andrey Sergeevich: Peoples' Friendship University of Russia, 6, Miklukho-Maklaya Str, Moscow, 117198, Russia.
E-mail: platinist@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

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 (ХЗ) представляет собой линейный природный полимер, состоящий из звеньев глюкозамина, чередующихся со звеньями *N*-ацетилглюкозамина. Производные хитозана зачастую 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 нутриентов и др.). В связи с комплексным сложным антибактериальным действием производных хитозана появление 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 заряженными поверхностями бактериальной клетки. Хитозановый поликатион формируется благодаря основности первичных аминогрупп макромолекулы хитозана.

Электростатическое взаимодействие хитозанового поликатиона с бактериальной клеткой приводит как минимум к двум неблагоприятным для клетки последствиям: 1) резкому изменению свойств проницаемости мембраны, что провоцирует внутренний осмотический дисбаланс и, следовательно, ингибирует рост микроорганизмов и 2) гидролитическому расщеплению пептидогликанов в стенке микроорганизма, что приводит к утечке внутриклеточных электролитов, таких как ионы калия, а также важных компонентов органической природы, таких как белки, нуклеиновые кислоты, глюкоза, лактатдегидрогеназа и др. [3]. Эти неблагоприятные для бактериальной клетки процессы в конечном итоге вызывают ее гибель.

INTRODUCTION

Due to the steady increase in the resistance of pathogens of nosocomial and community-acquired infections to antimicrobial drugs, the development and synthesis of new effective antibacterial drugs is one of the priorities of modern pharmacology. Among the various compounds with antibacterial activity, chitosan is advantageously distinguished by biocompatibility, hypoallergenicity, biodegradability, and lack of toxicity.

Chitosan (CS) is a linear natural polymer consisting of glucosamine units, alternating with *N*-acetylglucosamine units. Chitosan derivatives are often characterized by marked antibacterial activity [1]. It is known that chitosan derivatives possess several mechanisms of antibacterial action, which are inherently universal physicochemical mechanisms (electrostatic interaction of a polycation with a negatively charged surface of a bacterial cell, chelation and binding of important for microbial cells ions and nutrients, etc.). Due to the complex, intricate antibacterial effect of chitosan derivatives, the emergence of bacterial resistance to these polymers is unlikely in the near future, if possible at all [2].

In the complex mechanism of the antibacterial action of chitosan, the key point is the interaction of the chitosan polycation with the negatively charged surfaces of the bacterial cell. The chitosan polycation is formed due to the basicity of the primary amino groups of the chitosan macromolecule.

Electrostatic interaction of a chitosan polycation with a bacterial cell results in at least two adverse consequences for the cell: 1) a drastic change in the permeability properties of the membrane, which provokes an internal osmotic imbalance and, therefore, inhibits the growth of microorganisms and 2) hydrolytic cleavage of peptidoglycans in the wall of the microorganism, which leads to leakage of intracellular electrolytes, such as potassium ions, as well as important components of an organic nature, such as proteins, nucleic acids, glucose, lactate dehydrogenase and others [3]. These processes, unfavourable to the bacterial cell, ultimately cause its death.

A feature of chitosan, which greatly limits the study of antibacterial properties, is its poor solubility in water. Chemical modification of chitosan can not only overcome this drawback but also improve the antibacterial properties of chitosan due to the antibacterial pharmacophores introduced into the polymer chain [4].

Особенностью хитозана, сильно ограничивающей изучение антибактериальных свойств, в том числе является его плохая растворимость в воде. Химическая модификация хитозана способна не только преодолеть этот недостаток, но и улучшить антибактериальные свойства хитозана благодаря вводимым в полимерную цепь антибактериальным фармакофорам [4].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Химическая модификация хитозана диэтиламиноэтильным фрагментом и изучение антибактериальной активности полученных производных хитозана в сравнении с исходным хитозаном и антибиотиками гентамицином и ампициллином в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий (*S. aureus* и *E. coli*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящем исследовании использовали низкомолекулярный крабовый хитозан (ЗАО «Биопрогресс») со средней молекулярной массой 6.9×10^4 , степенью ацетилирования 0.22, влажностью 8.9 %, 2-хлор-*N,N*-диэтилэтиламин гидрохлорид (диэтиламиноэтилхлорид) (Aldrich), диализные мембраны (MWCO 12.000–14.000) были приобретены в Orange Scientific (Braine-l'Alleud, Бельгия). Спектры ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) ^1H регистрировали на приборе Bruker Avance (Bruker) II+ 400 MHz в растворе $\text{D}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOH}$ 100/1 при 70 °C. Интегральную интенсивность сигналов H-1 глюкозаминных фрагментов хитозана и его производных принимали за 1. Клеточные культуры HEK-293 инкубировались в CO_2 -инкубаторах BINDER (Binder, Германия). Оптическую плотность в MTT-тесте измеряли с помощью прибора CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия).

Синтез диэтиламиноэтилхитозана-I (ДЭАЭ-ХЗ-I) в гетерогенных условиях. Хитозан (1.0 г) смешивали с 2 мл дистиллированной воды и 1.5 мл 35% раствора NaOH. Смесь перемешивали в течение 2 ч на магнитной мешалке. 2-Хлор-*N,N*-диэтилэтиламин гидрохлорид (5.35 г) растворяли в 21.5 мл 85% пропан-2-ола (изопропилового спирта, ИПС) и добавляли к щелочной суспензии хитозана. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при 80 °C в токе азота и затем нейтрализовали 10% HCl. Полученный продукт ДЭАЭ-ХЗ-I очищали диализом против дистиллированной воды, тестировали на отсутствие хлорид-ионов и сушили лиофильно.

Синтез диэтиламиноэтилхитозана-II (ДЭАЭ-ХЗ-II) в гомогенных условиях. Хитозан (1.0 г)

AIM OF THE RESEARCH

Chemical modification of chitosan with a diethylaminoethyl fragment and study of the antibacterial activity of the obtained chitosan derivatives in comparison with the initial chitosan and antibiotics (gentamicin and ampicillin) against Gram-positive and gram-negative bacteria (*S. aureus* and *E. coli*).

MATERIALS AND METHODS

In the present study, we used low molecular weight crab chitosan (Bioprogress, JSC) with an average molecular weight of 6.9×10^4 , a degree of acetylation of 0.22, a moisture content of 8.9 %, 2-chloro-*N,N*-diethylethylamine hydrochloride (diethylaminoethyl-chloride) (Aldrich); dialysis membranes (MWCO 12.000–14.000) were bought in Orange Scientific (Braine-l'Alleud, Belgium). Nuclear magnetic resonance (NMR) ^1H spectra were recorded on a "Bruker Avance" (Bruker) II+ 400 MHz instrument in a $\text{D}_2\text{O} / \text{CF}_3\text{COOH}$ 100/1 solution at 70°C. The integrated intensity of the H-1 signals of the glucosamine fragments of chitosan and its derivatives was taken as 1. HEK-293 cell cultures were incubated in BINDER CO_2 incubators ("Binder", Germany). Optical density in the MTT test was measured using a CLARIOstar instrument ("BMG LABTECH", Germany).

Synthesis of diethylaminoethylchitosan-I (DEAE-CS-I) under heterogeneous conditions. Chitosan (1.0 g) was mixed with 2 ml of distilled water and 1.5 ml of 35% NaOH solution. The mixture was stirred for 2 hours on a magnetic stirrer. 2-Chloro-*N,N*-diethylethylamine hydrochloride (5.35 g) was dissolved in 21.5 ml of 85% propan-2-ol (isopropyl alcohol, IPA) and added to the alkaline suspension of chitosan. The reaction mixture was stirred for 3 hours at 80°C in a stream of nitrogen and then neutralized with 10% HCl. The resulting product DEAE-CS-I was purified by dialysis against distilled water, tested for the absence of chloride ions and dried by cool dehumidification.

Synthesis of diethylaminoethylchitosan-II (DEAE-CS-II) under homogeneous conditions. Chitosan (1.0 g) was dissolved in 10 ml of 0.1 M HCl. Then a solution of 2-chloro-*N,N*-dimethylethylamine (5.35 g in 15 ml of distilled water) was added to the polymer solution and the pH was adjusted to 6.5 with sodium acetate. The reaction mixture was stirred at 80°C for 3 hours, followed by the addition of 5 ml of 10% HCl. The product was dialyzed against distilled water, tested for the absence of chloride ions, and lyophilized.

растворяли в 10 мл 0.1 М HCl. Затем к раствору полимера добавляли раствор 2-хлор-*N,N*-диметиламина (5.35 г в 15 мл дистиллированной воды) и pH доводили до 6.5 с помощью ацетата натрия. Реакционную смесь перемешивали при 80 °C в течение 3 ч с последующим добавлением 5 мл 10% HCl. Продукт подвергали диализу против дистиллированной воды, тестировали на отсутствие хлорид-ионов и лиофилизировали.

MTT-тест (оценка токсичности). Растворы ДЭАЭ-ХЗ готовили серийным разведением в питательной среде alpha-MEM. Растворы объемом 0.1 мл добавляли к конфлюэнтному монослою клеток HEK-293, культивируемому в луночном планшете. Клетки инкубировались 24 ч при 37 °C в атмосфере с содержанием 5 % CO₂. После этого клетки промывали дважды фосфатным буферным раствором и добавляли 0.1 мл раствора 3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолий бромида в фосфатном буферном растворе (0.5 мкг/мл) и инкубировали 1 ч. Затем супернатант заменяли на 0.1 мл 96% этанола и измеряли оптическую плотность на при длине волны 535 нм.

Антибактериальная активность. Антибактериальную активность полученных производных хитозана изучали методом «диффузии в агар» в отношении штаммов *S. aureus* RCMB 010027 и *E. coli* RCMB 010051 (VSMU). В качестве коммерчески доступных антибиотиков для сравнения в случае *S. aureus* использовали ампициллин (Aldrich), а в случае *E. coli* — гентамицин (Aldrich). Активность определяли путем измерения диаметра зоны ингибирования (в миллиметрах). Каждую зону ингибирования измеряли после суточного выращивания в термостате при 37 °C. Опыты повторяли не менее трех раз. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) тестируемых образцов определяли путем подсчета колоний [5]. В качестве МИК принимали самую низкую концентрацию, которая полностью ингибирует инокуляты по сравнению с контролем.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ДЭАЭ-ХЗ получали с использованием двух разных подходов, включающих взаимодействие диэтиламиноэтилхлорида и хитозана. Первый способ заключался во взаимодействии между хитозаном и диэтиламиноэтилхлоридом в гетерогенных условиях в щелочной среде (ИПС-NaOH). Второй подход предполагал обработку хитозана диэтиламиноэтилхлоридом в ацетатном буферном растворе в гомогенных условиях при

MTT assay (toxicity assessment). DEAE-CS solutions were prepared by serial dilution in a nutrient medium alpha-MEM. 0.1 ml solutions were added to a confluent monolayer of HEK-293 cells cultured in a well plate. Cells were incubated for 24 hours at 37°C in an atmosphere with 5 % CO₂. After that, the cells were washed twice with a phosphate buffer solution and 0.1 ml of a solution of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide in a phosphate buffer solution (0.5 µg / ml) was added and incubated for 1 hour. Then the supernatant was replaced with 0.1 ml of 96% ethanol and measured optical density at a wavelength of 535 nm.

Antibacterial activity. The antibacterial activity of the obtained chitosan derivatives was studied by the “diffusion into agar” method with respect to the strains of *S. aureus* RCMB 010027 and *E. coli* RCMB 010051 (VSMU). Ampicillin (Aldrich) was used as commercially available antibiotics in the case of *S. aureus*, and gentamicin (Aldrich) — in the case of *E. coli*. Activity was determined by measuring the diameter of the zone of inhibition (in millimetres). Each zone of inhibition was measured after daily growth in a thermostat at 37°C. The experiments were repeated at least three times. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the tested samples was determined by counting colonies [5]. As the MIC, the lowest concentration was taken, which completely inhibited inocula compared to the control.

RESULTS AND DISCUSSION

DEAE-CS was obtained using two different approaches, including the interaction of diethylaminoethylchloride and chitosan. The first method consisted in the interaction between chitosan and diethylaminoethylchloride in heterogeneous conditions in an alkaline medium (IPA-NaOH). The second approach suggested treating chitosan with diethylaminoethylchloride in the acetate buffer solution in homogeneous conditions at pH = 6.5. In both cases, water-soluble chitosan derivatives (DEAE-CS-I and DEAE-CS-II respectively) were obtained, which were then characterized using ¹H NMR spectroscopy.

The nucleophilic substitution reaction between the diethylaminoethylchloride acting as an electrophile and chitosan as a nucleophile can pass through two nucleophilic reaction centres — the amino group (*N*-substitution) and the primary alcohol group of the chitosan glucosamine link (*O*-sub-

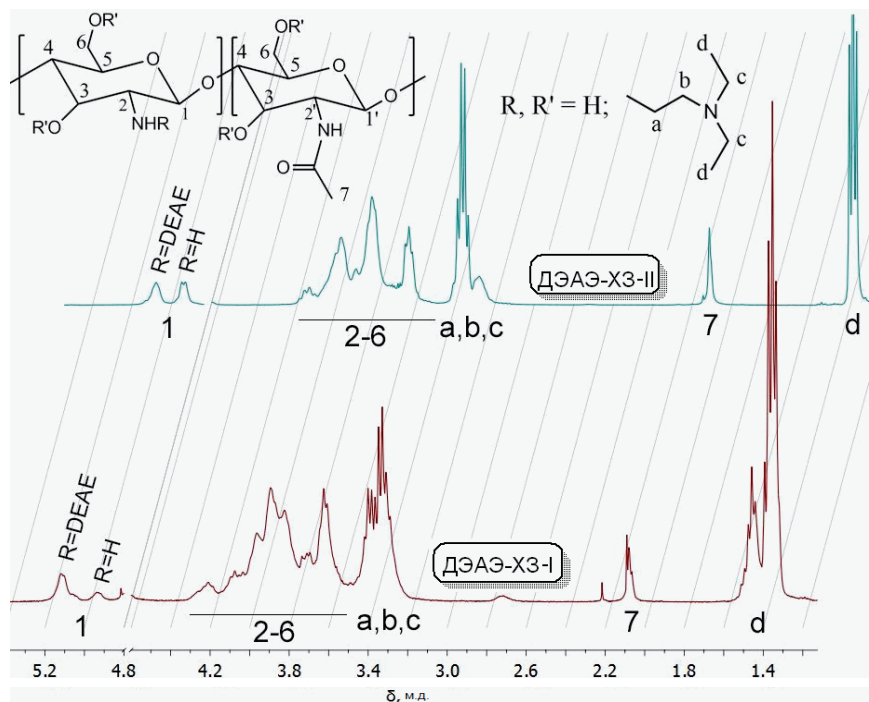


Рис. 1. Спектр ЯМР ^1H ДЭАЭ-ХЗ (323 К, 400 МГц, $\text{D}_2\text{O} + \text{CF}_3\text{COOH}$)
Fig. 1. NMR spectrum ^1H DEAE-CS (323 K, 400 MHz, $\text{D}_2\text{O} + \text{CF}_3\text{COOH}$)

pH = 6.5. В обоих случаях получили водорастворимые производные хитозана (ДЭАЭ-ХЗ-I и ДЭАЭ-ХЗ-II соответственно), которые затем были охарактеризованы с помощью спектроскопии ЯМР ^1H .

Реакция нуклеофильного замещения между выступающим в роли электрофила диэтиламиноэтилхлоридом и хитозаном как нуклеофилом может проходить по двум нуклеофильным реакционным центрам — аминогруппе (N-замещение) и первичной спиртовой группе глюкозаминного звена хитозана (O-замещение). В спектре ЯМР ^1H ДЭАЭ-ХЗ-II (рис. 1) имеется три сигнала, которые предоставляют информацию о степени и типе замещения. Триплет при 1.33 миллионной доли (м. д.) соответствует протонам метильной группы этильного фрагмента $\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—}$. N-замещение подтверждается смещением сигнала аномерного протона в слабое поле (4.77 м. д.). Метиленовые протоны фрагмента $\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—}$ представлены интенсивным сигналом при 3.25 м. д. и соседствующим с ним слабым сигналом метиленовой группы, связанной с депротонированной аминогруппой хитозана. Эти сигналы перекрываются с сигналом Н-2 блока GlcN + H_3 . Степень замещения (C3) рассчитывали согласно следующему уравнению:

$$\text{C3} = \text{I}(\text{d}) / (6 + 2\text{I}(\text{7})).$$

stitution). In the ^1H NMR spectrum of DEAE-CS-II (Fig. 1), there are three signals that provide information about the degree and type of substitution. A triplet at 1.33 ppm corresponds to the protons of the methyl group of the ethyl fragment $\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—}$. N-substitution is confirmed by the displacement of the signal of the anomeric proton in a weak field (4.77 ppm). Methylene protons of the $\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—}$ fragment are represented by an intense signal at 3.25 ppm and the weak signal of the methylene group adjacent to it, which is associated with the deprotonated amino group of chitosan. These signals overlap with the H-2 signal of the GlcN + H_3 block. The degree of substitution (DS) was calculated according to the following equation:

$$\text{DS} = \text{I}(\text{d}) / (6 + 2\text{I}(\text{7})).$$

The ^1H NMR spectrum of DEAE-CS-I, synthesized in a mixture of IPA-NaOH (see Fig. 1), indicates the formation of highly substituted products. The integral intensity of the anomeric proton signal shifted in a weak field in the DEAE-CS-I spectrum shows that about 75 % of the amino groups are replaced. Methyl protons of the diethylaminoethyl substituent are represented by three superimposed triplets, which can be explained by the presence of both O- and N-types of substitution.

Спектр ЯМР ^1H ДЭАЭ-ХЗ-I, синтезированного в смеси ИПС-NaOH (см. рис. 1), указывает на образование высокозамещенных продуктов. Интегральная интенсивность смещенного в слабое поле сигнала аномерного протона в спектре ДЭАЭ-ХЗ-I показывает, что около 75 % аминогрупп замещены. Метильные протоны диэтиламиноэтильного заместителя представлены тремя наложенными триплетами, которые можно объяснить наличием как *O*-, так и *N*-типов замещения.

Таким образом, обработка хитозана пятикратным избытком диэтиламиноэтилхлорида в щелочной среде при комнатной температуре приводила к образованию ДЭАЭ-ХЗ-I со степенью замещения 1.2 с образованием *N,O*-замещенных производных. Взаимодействие же хитозана с диэтиламиноэтилхлоридом в ацетатном буферном растворе при $\text{pH} = 5-6$ с той же концентрацией реагентов при такой же температуре в течение такого же времени привела к образованию селективно *N*-замещенного ДЭАЭ-ХЗ-II со степенью замещения 0.57. Селективное *N*-замещение подтверждается корреляцией между интегральными интенсивностями сигналов протонов метильной группы и смещенным в слабое поле сигналом аномерного протона.

При проведении реакций хитозана в водной среде в присутствии кислот или щелочей может наблюдаться частичное деацетилирование хитозана. Интегрирование сигнала ацетамидных протонов (2.08 м. д.) указывает на то, что ни в ацетатном буферном растворе, ни в среде ИПС-NaOH деацетилирования не происходит.

Антибактериальную активность полученных диэтиламиноэтильных производных хитозана в отношении *S. aureus* и *E. coli* изучали методом «диффузии в агар» в сравнении с исходным хитозаном, ампициллином и гентамицином. Результаты испытаний представлены в табл. 1.

Антибактериальная активность диэтиламиноэтильных производных хитозана выше, чем со-

Thus, treatment of chitosan with a fivefold excess of diethylaminoethylchloride in an alkaline medium at room temperature led to the formation of DEAE-CS-I with a degree of substitution of 1.2 to form *N,O*-substituted derivatives. The interaction of chitosan with diethylaminoethylchloride in an acetate buffer solution at $\text{pH} = 5-6$ with the same concentration of reagents at the same temperature during the same time led to the formation of selectively *N*-substituted DEAE-CS-II with a degree of substitution of 0.57. Selective *N*-substitution is confirmed by the correlation between the integral intensities of the signals of the protons of the methyl group and the anomeric proton signal shifted in a weak field.

When carrying out chitosan reactions in an aqueous medium in the presence of acids or alkalis, partial deacetylation of chitosan can be observed. The integration of the acetamide proton signal (2.08 ppm) indicates that deacetylation does not occur in either an acetate buffer solution or in an IPA-NaOH medium.

The antibacterial activity of the obtained diethylaminoethyl derivatives of chitosan against *S. aureus* and *E. coli* was studied by the method of “diffusion into agar” in comparison with the initial chitosan, ampicillin and gentamicin. The test results are presented in Table 1.

The antibacterial activity of diethylaminoethyl derivatives of chitosan is higher than the corresponding activity of the starting chemically unmodified chitosan. The antibacterial activity of the derivatives obtained is characterized by a pronounced growth with an increase in the degree of substitution. This trend is obviously associated with an increase in the cationic density of the polymer compared to chitosan. Chitosan contains primary amino groups, which are capable of protonation with the formation of cationic $-\text{NH}_3^+$ groups. The

Таблица 1. Антибактериальная активность диэтиламиноэтильных производных хитозана *in vitro*, зона ингибирования (мм)

Table 1. The antibacterial activity of diethylaminoethyl chitosan derivatives *in vitro*, the zone of inhibition (mm)

Образец / Sample	Микроорганизм / Microorganism	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
ХЗ / Chitosan	13.5 ± 0.30	10.4 ± 0.11
ДЭАЭ-ХЗ-I / DEAE-CS-I	22.8 ± 0.23	18.1 ± 0.31
ДЭАЭ-ХЗ-II / DEAE-CS-II	17.9 ± 0.15	13.3 ± 0.24
Ампициллин / Ampicillin	30.2 ± 0.19	—
Гентамицин / Gentamicin	—	22.1 ± 0.24

ответствующая активность исходного химически не модифицированного хитозана. Антибактериальная активность полученных производных характеризуется выраженным ростом с увеличением степени замещения. Такая тенденция связана, очевидно, с ростом катионной плотности полимера по сравнению с хитозаном. Хитозан содержит в своем составе первичные аминогруппы, которые способны к протонированию с образованием катионных группировок $-\text{NH}_3^+$. Макромолекулы же диэтиламиноэтильных производных хитозана, кроме первичных аминных групп, содержат также вторичные и третичные аминогруппы, обладающие большей основностью. Такая структурная особенность полученных производных приводит к появлению большего числа катионных сайтов по сравнению с исходным хитозаном при одинаковых условиях. Именно катионные сайты ответственны за взаимодействие с анионными сайтами поверхности бактериальной клетки, что в конечном итоге обеспечивает антибактериальное действие. Число катионных сайтов возрастает при увеличении степени замещения диэтиламиноэтильных производных, что является причиной более выраженной антибактериальной активности высокозамещенного производного ДЭАЭ-ХЗ-I по сравнению с умеренно замещенным производным ДЭАЭ-ХЗ-II. Особо следует отметить сопоставимый с гентамицином высокий антибактериальный эффект ДЭАЭ-ХЗ-I в отношении *E. coli*. Данный эффект можно объяснить высоким сродством положительно заряженного в водной среде заместителя к отрицательно заряженным остаткам тейхоевых кислот с одной стороны и высокими хелатирующими способностями ДЭАЭ-ХЗ — с другой [6]. Ярко выраженные хелаторные свойства ДЭАЭ-ХЗ обуславливают захват двухзарядных катионов металлов, которые способствуют устойчивости слоя липополисахаридов (ЛПС) посредством электростатических взаимодействий. Удаление этих катионов диэтиламиноэтильными производными хитозана из внешней мембраны бактерии приводит к дестабилизации мембраны посредством освобождения молекул ЛПС [7, 8].

Для полученных производных была измерена МИК (мкг/мл) в сравнении с ампициллином и гентамицином, которая составила 0.87 мкг/мл (для *S. aureus*) и 2.50 мкг/мл (для *E. coli*). Значение МИК ампициллина составляло 0.15 мкг/мл (*S. aureus*), а гентамицина — 0.22 мкг/мл (*E. coli*).

Основным преимуществом хитозана по сравнению с другими катионными полимерами является низкая токсичность. Не вполне верным бу-

макромолемolecules of the same diethylaminoethyl derivatives of chitosan, in addition to the primary amine groups, also contain secondary and tertiary amino groups, which have greater basicity. Such a structural feature of the derivatives obtained leads to the appearance of a larger number of cationic sites as compared to the initial chitosan under the same conditions. It is the cationic sites that are responsible for interaction with the anionic sites of the surface of the bacterial cell, which ultimately provides an antibacterial effect. The number of cationic sites grows with an increase in the degree of substitution of diethylaminoethyl derivatives, which is the reason for the more pronounced antibacterial activity of the highly-substituted DEAE-CS-I derivative compared to the moderately substituted DEAE-CS-II derivative. Of particular note is the high antibacterial effect of DEAE-CS-I against *E. coli* comparable to gentamicin. This effect can be explained by the high affinity of a positively charged in aqueous medium substituent for negatively charged residues of teichoic acids on the one hand and high chelating abilities of DEAE-CS on the other [6]. The pronounced chelator properties of DEAE-CS cause the capture of doubly charged metal cations, which contribute to the stability of the layer of lipopolysaccharides (LPS) through electrostatic interactions. The removal of these cations by diethylaminoethyl chitosan derivatives from the bacterial outer membrane leads to membrane destabilization by the release of LPS molecules [7, 8].

For the derivatives obtained, the MIC ($\mu\text{g/ml}$) was measured in comparison with ampicillin and gentamicin, which amounted to 0.87 $\mu\text{g/ml}$ (for *S. aureus*) and 2.50 $\mu\text{g/ml}$ (for *E. coli*). The MIC value of ampicillin was 0.15 $\mu\text{g/ml}$ (*S. aureus*), and gentamicin — 0.22 $\mu\text{g/ml}$ (*E. coli*).

The main advantage of chitosan compared with other cationic polymers is low toxicity. It is not entirely correct to apply this judgment to chitosan derivatives unreasonably. In this work, the MTT assay, a colourimetric method for estimating the number of viable cells in culture, was used to assess toxicity. The colourimetric method was based on the fact that NADPH-dependent dehydrogenases of living cells reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to purple formazan. Thus, the colour intensity is proportional to the viability of the culture. The work compared the toxicity of the initial chitosan in the form of hydrochloride with diethylaminoethyl derivatives. The results of the experiment are shown in Fig. 2.

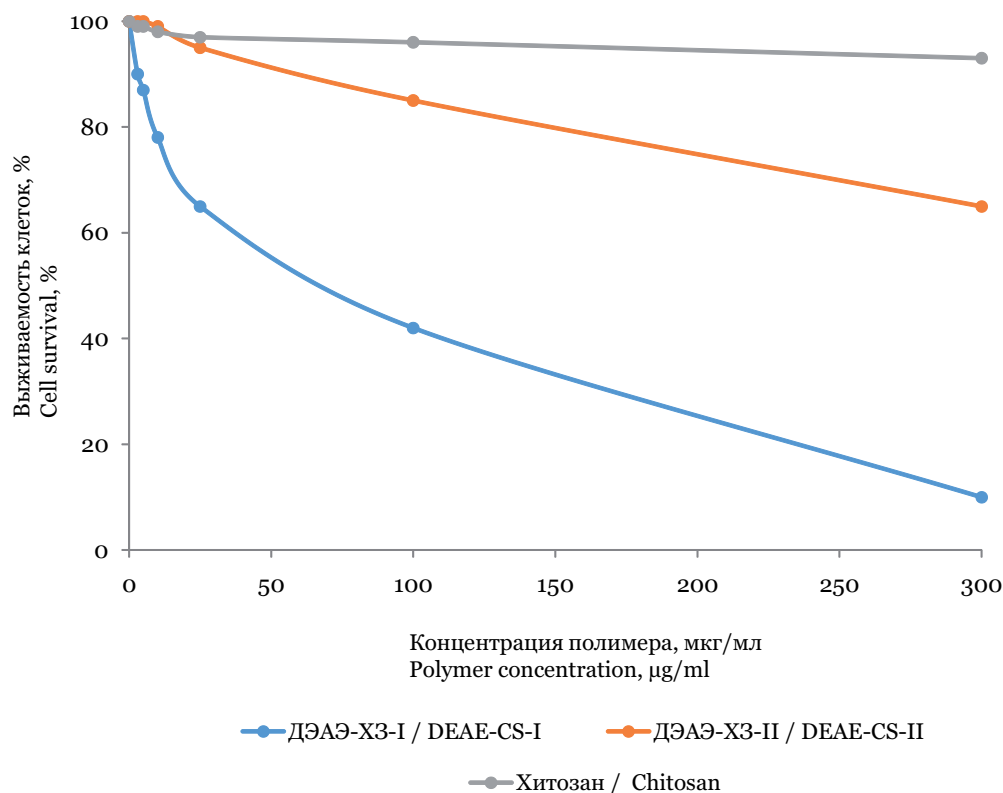


Рис. 2. Оценка токсичности диэтиламиноэтильных производных хитозана
Fig. 2. Evaluation of the toxicity of diethylaminoethyl chitosan derivatives

дет безосновательно применять данное суждение к производным хитозана. В данной работе для оценки токсичности применяли МТТ-тест, колориметрический метод оценки количества жизнеспособных клеток в культуре, основанный на том, что НАДФН-зависимые дегидрогеназы живых клеток восстанавливают 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид (МТТ) в формазан, окрашенный в пурпурный цвет. Таким образом, интенсивность окраски пропорциональна жизнеспособности культуры. В работе сравнивали токсичность исходного хитозана в форме гидрохлорида с диэтиламиноэтильными производными. Результаты эксперимента представлены на рис. 2.

Было установлено, что токсичность полученных производных имеет выраженную зависимость от степени замещения. Умеренно замещенное производное ДЭАЭ-ХЗ-II характеризуется низкой токсичностью, близкой к токсичности исходного хитозана. Высокозамещенное производное ДЭАЭ-ХЗ-I обладает значительно большей токсичностью, имеющей выраженную зависимость от концентрации. Однако в концентрациях, близких к МИК, токсичность обоих производных сопоставима с токсичностью исходного хитозана.

It was found that the toxicity of the derivatives obtained has a pronounced dependence on the degree of substitution. A moderately substituted derivative of DEAE-CS-II is characterized by low toxicity, close to the toxicity of the original chitosan. The highly substituted derivative of DEAE-CS-I has significantly greater toxicity, which has a pronounced dependence on concentration. However, at concentrations close to the MIC, the toxicity of both derivatives is comparable to the toxicity of the initial chitosan.

Thus, as follows from the presented data, the interaction of diethylaminoethylchloride with chitosan at pH = 5–6 leads to the selective formation of *N*-substituted DEAE-CS-II with a moderate degree of substitution, while in an alkaline medium this reaction proceeds as non-selective *N,O*-substitution and product is highly substituted DEAE-CS-I.

The introduction of the diethylaminoethyl fragment into the polymer matrix enhances the antibacterial activity of chitosan. The antibacterial activity of diethylaminoethyl derivatives increases with a rise of the degree of substitution. The highest antibacterial activity is characterized by highly substituted chitosan derivatives. The toxicity of the

Таким образом, как следует из представленных данных, взаимодействие диэтиламиноэтилхлорида с хитозаном при pH = 5–6 приводит к селективному образованию *N*-замещенного ДЭАЭ-ХЗ-II с умеренной степенью замещения, в то время как в щелочной среде данная реакция протекает как неселективное *N,O*-замещение и продуктом является высокозамещенный ДЭАЭ-ХЗ-I.

Введение диэтиламиноэтильного фрагмента в полимерную матрицу усиливает антибактериальную активность хитозана. Антибактериальная активность диэтиламиноэтильных производных возрастает с увеличением степени замещения. Наибольшей антибактериальной активностью характеризуются высокозамещенные производные хитозана. Токсичность полученных производных также возрастает с увеличением степени замещения и для высокозамещенного производного имеет выраженную зависимость от концентрации, однако в концентрациях, близких к МИК, токсичность обоих производных сопоставима с токсичностью исходного хитозана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Появление диэтиламиноэтильного фрагмента в полимерной матрице усиливает антибактериальную активность хитозана, при этом антибактериальная активность диэтиламиноэтильных производных возрастает с увеличением степени замещения. Наибольшая антибактериаль-

ная активность наблюдается у высокозамещенных производных хитозана. Полученные данные представляют интерес для дальнейших доклинических исследований *in vivo*.

CONCLUSION

The diethylaminoethyl fragment in the polymer matrix enhances the antibacterial activity of chitosan, while the antibacterial activity of the diethylaminoethyl derivatives increases with a rise of the degree of substitution. The highest antibacterial activity is observed in highly substituted chitosan derivatives. The data obtained are of interest for further preclinical studies *in vivo*.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

ная активность наблюдается у высокозамещенных производных хитозана. Полученные данные представляют интерес для дальнейших доклинических исследований *in vivo*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Li B., Shan C.L., Ge M.Y. et al. Antibacterial mechanism of chitosan and its applications in protection of plant from bacterial disease: mini review // *Asian J. Chem.* 2013. Vol. 25 (18). P. 10033–10036.
- Verlee A., Mincke S., Stevens C.V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives // *Carbohydrate Polymers*. 2017. Vol. 164. P. 268–283.
- Goy R.C., Assis O.B.G., De Britto D. A review of the antimicrobial activity of chitosan // *Polimeros*. 2009. Vol. 19 (3). P. 241–247.
- Ravi Kumar M.N.V., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb A.J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives // *Chem. Rev.* 2004. Vol. 104 (12). P. 6017–6084.
- Rahman A., Choudhary M.I., Thompson W.J. *Bioassay Techniques for Drug Development*. Netherlands: Harwood Academic Publishers, 2001. Vol. 16. 2024 p.
- Kim J.H., Lee Y.M. Synthesis and properties of diethylaminoethyl chitosan // *Polymer*. 1993. Vol. 34 (9). P. 1952–1957.
- Helander I.M., Nurmiäho-Lassila E.L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria // *Int. J. Food Microbiol.* 2001. Vol. 71 (2–3). P. 235–244.

REFERENCES

- Li B., Shan C.L., Ge M.Y. et al. (2013). Antibacterial mechanism of chitosan and its applications in the protection of plant from bacterial disease: a mini review. *Asian J. Chem.*, 25, 18, 10033–10036.
- Verlee A., Mincke S., Stevens C.V. (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164, 268–283.
- Goy R.C., Assis O.B.G., De Britto D. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polimeros*, 19, 3, 241–247.
- Ravi Kumar M.N.V., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb A.J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev.*, 104, 12, 6017–6084.
- Rahman A., Choudhary M.I., Thompson W.J. (2001). *Bioassay Techniques for Drug Development*. Netherlands: Harwood Academic Publishers, 16, 2024 p.
- Kim J.H., Lee Y.M. (1993). Synthesis and properties of diethylaminoethyl chitosan. *Polymer*, 34, 9, 1952–1957.
- Helander I.M., Nurmiäho-Lassila E.L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 2–3, 235–244.

8. Kong M., Chen X.G., Liu C.S. et al. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli* // *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*. 2008. Vol. 65 (2). P. 197–202.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Критченков Андрей Сергеевич — канд. хим. наук, ассистент кафедры неорганической химии, Российский университет дружбы народов (Москва); доцент, факультет пищевых биотехнологий, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» (Российская Федерация).

Курлюк Олег Валерьевич — канд. мед. наук, доцент кафедры фармакологии, Витебский государственный медицинский университет (Республика Беларусь).

Шаколо Татьяна Владимировна — старший преподаватель кафедры промышленной технологии лекарств, Витебский государственный медицинский университет (Республика Беларусь).

Егоров Антон Романович — магистрант, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» (Российская Федерация).

Федотова Юлия Олеговна — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нейроэндокринологии, Институт физиологии им. Павлова РАН (Санкт-Петербург, Российская Федерация).

Образец цитирования: Критченков А.С., Курлюк О.В., Шаколо Т.В., Егоров А.Р., Федотова Ю.О. Диэтиламиноэтилхитозан: синтез и антибактериальная активность // *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2019. № 2. С. 51–60.

8. Kong M., Chen X.G., Liu C.S. et al. (2008). Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*, 65, 2, 197–202.

ABOUT THE AUTHORS

Kritchenkov Andrey Sergeevich — Cand. Sci. (Chem.), Teaching Assistant of the Department of Inorganic Chemistry, Peoples' Friendship University of Russia (Moscow); Associate Professor, Faculty of Food Biotechnology, St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics (the Russian Federation).

Kurlyuk Oleg Valerievich — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Pharmacology, Vitebsk State Medical University (the Republic of Belarus).

Shakolo Tatiana Vladimirovna — Senior Lecturer of the Department of Industrial Technology of Drugs, Vitebsk State Medical University (the Republic of Belarus).

Egorov Anton Romanovich — Post-graduate Student, St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics (the Russian Federation).

Fedotova Yulia Olegovna — Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher of the Laboratory of Neuroendocrinology, Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences (St. Petersburg, the Russian Federation).

Citation example: Kritchenkov A.S., Kurlyuk O.V., Shakolo T.V., Egorov A.R., Fedotova Yu.O. (2019). Diethylaminoethylchitosan: synthesis and antibacterial activity. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 2, 51–60.