

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования**

«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ

ИМЕНИ ПАТРИСА ЛУМУМБЫ»

(РУДН)

На правах рукописи

ЕГОРОВ АНТОН РОМАНОВИЧ

**ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СИНТЕЗА И ПОТЕНЦИАЛЬНОГО
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ХИТИНА И
ХИТОЗАНА**

специальность 1.5.15. Экология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

Доктор химических наук

А.С. Критченков

Москва – 2024

Оглавление

Глава 1. Введение и общая характеристика работы	5
1.1. Зеленая химия. Хитин и хитозан	5
1.2. Химия хитина в контексте зеленой химии	9
1.2.1. Система щёлочь/мочевина	9
1.2.2. Система хлорид кальция/метанол	10
1.2.3. Система диметилацетамид/LiCl	11
1.2.4. Ионные жидкости	11
1.3. Химия хитозана в контексте зеленой химии.....	14
1.4. Загрязнение окружающей среды антибиотиками и пути решения данной проблемы с использованием достижений хитинологии	19
1.5. Общая характеристика работы	27
Глава 2. Зеленый синтез новых водорастворимых селенсодержащих производных хитина и хитозана.....	34
2.1. Получение новых водорастворимых селенсодержащих производных хитозана.....	36
2.2. Получение новых водорастворимых селенсодержащих производных хитина	40
2.3. Антимикробные свойства селенсодержащих производных хитина и хитозана	47
2.4. Получение наночастиц на основе селенсодержащих производных хитина и хитозана и их антимикробные свойства	51
2.5. Токсичность селенсодержащих производных хитина и хитозана и наночастиц на их основе	54
2.6. Каталитические исследования селенсодержащих производных хитина и хитозана, а также наночастиц на их основе	56
2.7. Заключение к главе 2	61
Глава 3. Получение новых конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан и наночастиц на их основе	63

3.1. Синтез конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан, в которых ципрофлоксацин непосредственно присоединен к полимерной цепи (схема 9, система 1)	65
3.2. Синтез конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан, в которых ципрофлоксацин связан с полимерной цепью через рН-чувствительный спейсер (схема 9, система 5).....	71
3.3. Получение наночастиц загруженных ципрофлоксацином	77
3.3.1. Получение загруженных ципрофлоксацином наночастиц из NPs-C-CS-I-M, NPs-C-CS-II-M и NPs-C-CS-III-M (схема 9, система 3).....	77
3.3.2. Получение наночастиц, загруженных ципрофлоксацином, из других полимеров методом ионного гелеобразования (схема 9, система 4 и схема 9, система 6).....	79
3.3.3. Изучение высвобождения лекарственного средства.....	82
3.4. Антибактериальная активность наночастиц и конъюгатов <i>in vitro</i>	84
3.5. Антибактериальная активность загруженных самособирающихся наночастиц на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера <i>in vivo</i>	88
3.6. Токсичность загруженных самоорганизующихся наночастиц на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера	90
3.7. Заключение к главе 3	92
Глава 4. Экспериментальная часть	94
4.1. Материалы и методы	94
4.1.1. Материалы	94
4.1.2. Общие методы	94
4.2. Синтез селенсодержащих производных хитозана.....	95
4.3. Синтез селенсодержащих производных хитина	96
4.4. Получение наночастиц селенсодержащих производных хитозана и хитина	96
4.5. Модельная реакция ципрофлоксацина с н-бутиламином.....	97
4.6. Синтез конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан, в которых ципрофлоксацин непосредственно присоединен к полимерной цепи (без спейсера, схема 9, система 1; таблица 12).....	97

4.7. Синтез конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан, в которых ципрофлоксацин связан с полимерной цепью через рН-чувствительный спейсер (схема 9, система 5; таблица 15).....	98
4.7.1. Синтез гидразона 1 (схема 12, А).....	98
4.7.2. Синтез соединения 2 (схема 12, В)	98
4.7.3. Конъюгация соединения 2 с хитозаном (схема 12, С)	99
4.8. Приготовление незагруженных ципрофлоксацином наночастиц (схема 9, система 2; таблица 13 и таблица 16)	99
4.9. Приготовление загруженных ципрофлоксацином наночастиц (схема 9, система 3; таблица 17 и схема 9, системы 4, 6; таблица 18).....	100
4.10. Исследование кинетики высвобождения лекарств.....	101
4.11. Антибактериальная активность	101
4.12. Противогрибковая активность.....	101
4.13. МТТ-тест	102
4.14. Исследование токсичности	102
4.15. Статистический анализ.....	103
Основные результаты и выводы	104
Список использованной литературы.....	106

Глава 1. Введение и общая характеристика работы

1.1. Зеленая химия. Хитин и хитозан

В современной экологической химии одним из важнейших направлений является развитие методов зеленой химии, о чём напрямую указывает всемирно известный химик-эколог Стэнли Манахан в своих фундаментальных работах в области химии окружающей среды, ставшими классическими для подготовки высококвалифицированных химиков-экологов во многих странах мира [1, 2]. Зелёная химия представляет собой совокупность методов и подходов, цель которых заключается в усовершенствовании химических процессов, направленном на уменьшение отрицательного влияния на окружающую среду.

Зеленая химия возникла в период, предшествовавший 1990-м годам, в результате различных существующих к тому времени идей, направленных на бережное отношение к окружающей среде (таких как принцип экономии атомов, идея перехода от металлических и металлокомплексных катализаторов к органокатализаторам), особенно в контексте возрастающего внимания к проблемам химического загрязнения в сочетании с постепенным истощением природных ресурсов [3]. Первоначально эти идеи обобщались под названием «химия для устойчивого развития» или «чистая химия» (что несколько противоречило ИЮПАК). Совокупность концепций, обобществлено именуемых зеленой химией, объединилась в конце 1990-х годов благодаря трудам профессоров Пола Анастаса и Джона Уорнера. Эти исследователи в своей книге «Зеленая химия: теория и практика» впервые сформулировали двенадцать принципов зеленой химии, которые указывают на способы снижения воздействия химических производств на окружающую среду и здоровье населения, а также указывают на исследовательские приоритеты для разработки технологий зеленой химии.

Двенадцать принципов зеленой химии были сформулированы следующим образом:

1. Профилактика: предотвращение образования химических отходов должно находиться в приоритете в сравнении с их обработкой или очисткой после их появления. Иначе говоря, лучше предупредить образование химических отходов, нежели организовывать их очистку или переработку.
2. Атомная экономия: синтетические методы должны быть сфокусированы на максимальном включении всех атомов реагентов в продукт реакции. Разумеется, соблюдение этого принципа приводит к минимизации образования отходов. К классическим реакциям, соответствующим принципу атомной экономии, относятся азид-алкиновая клик-реакция и ряд иных реакций циклоприсоединения.
3. Минимизация экологической опасности химических синтезов: синтетические методы должны быть сфокусированы на избежание или хотя бы минимизации использования веществ, токсичных для человека и/или окружающей среды.
4. Разработка максимально безопасных целевых соединений: целевые продукты химического синтеза должны быть не только носителями желаемых свойств, но и быть минимально токсичными.
5. Использование наиболее безопасных растворителей и вспомогательных веществ: в идеале предполагается сфокусироваться на возможностях избежать использования вспомогательных веществ, а синтезы проводить в самом экологически чистом растворителе – воде или же вообще без растворителя.
6. Высокая энергетическая эффективность: энергетические требования к процессу химического синтеза должны быть сведены к минимуму, а синтетические процессы и операции должны проводиться при температуре и давлении окружающей среды, когда это возможно и не противоречит остальным принципам зеленой химии.
7. Использование возобновляемого сырья: возобновляемое сырье всегда должно быть предпочтительнее невозобновляемого.

8. Минимизация синтетических операций: необходимо сфокусировать внимание на сведениях по возможности к минимуму числа промежуточных стадий, таких как постановка и снятие защиты, поскольку каждая дополнительная стадия синтетического процесса требует не только дополнительных реагентов, но и может привести к образованию дополнительных отходов.
9. Максимальное использование каталитических процессов: каталитическим процессам, протекающим с высокой селективностью, всегда должно отдаваться предпочтение перед стехиометрическими реакциями. Также в рамках данного принципа при наличии выбора катализатора следует отдавать предпочтение органическим катализаторам, а не металлическим и металлокомплексным.
10. Биоразлагаемость: при планировании синтеза следует стремиться к тому, чтобы реагенты, катализаторы и целевые продукты химического синтеза по окончании работы с ними могли разлагаться естественным путем на экологически безопасные соединения.
11. Мониторинг в режиме реального времени для предотвращения загрязнения: следует разрабатывать методы аналитического контроля в режиме реального времени с целью обеспечения мониторинга, позволяющего мгновенно детектировать образование экологически опасных веществ.
12. Предотвращение несчастных случаев: следует прилагать все усилия по подбору таких реагентов, целевых продуктов, вспомогательных веществ и катализаторов, которые исключают возможность возгорания или взрыва в данном конкретном синтетическом процессе.

Хитин и хитозан представляют собой природные полисахариды, которые характеризуются биосовместимостью, биodeградируемостью и отсутствием токсичности. Такие биологические свойства указанных полисахаридов соответствуют третьему, четвертому и десятому принципам зеленой химии. Важным структурно-химическим преимуществом хитозана является наличие в его

молекуле свободной первичной аминогруппы, что открывает широкие пути для его химической модификации с целью получения производных хитозана с новыми привлекательными биологическими, фармакологическими, физико-химическими и механическими свойствами. Также следует отметить, что многие (если не большинство) описанных в литературе продуктов химической модификации хитозана, протестированных в том или ином виде на токсичность, являются малотоксичными или вовсе нетоксичными, что соответствует четвертому принципу зеленой химии. Хитин и хитозан занимают среди природных полимеров второе место по распространенности после целлюлозы; их источники возобновляемы практически неисчерпаемы, что соответствует седьмому принципу зеленой химии. Таким образом, ввиду вышеупомянутых преимуществ хитин и хитозан являются крайне привлекательными объектами для реализации целей, идей и принципов зеленой химии.

По своей химической природе хитин и хитозан являются сополимерами *N*-ацетилглюкозамина и глюкозамина (**рисунок 1**). Главным параметром, характеризующим структурно-химическое отличие между этими двумя полимерами является так называемая степень деацетилирования. Степень деацетилирования соответствует доле глюкозаминных звеньев в макромолекуле, в то время как степень ацетилирования соответствует доле *N*-ацетилглюкозаминных звеньев. В хитинологии принято считать хитозаном сополимеры *N*-ацетилглюкозамина и глюкозамина со степенью деацетилирования менее 50% (или 0.5), а хитином – со степенью деацетилирования более 50%.

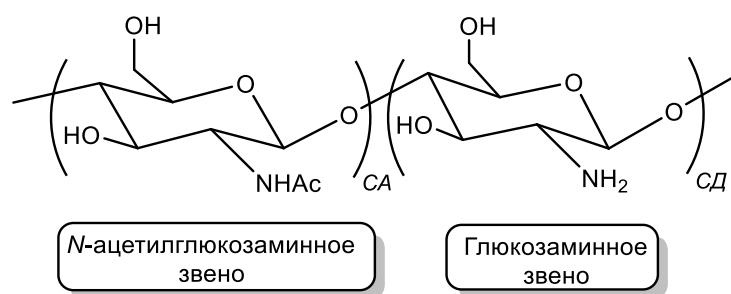


Рис. 1. Структура хитозана и хитина (СА – степень ацетилирования, СД – степень деацетилирования).

1.2. Химия хитина в контексте зеленой химии

Безусловно хитин является весьма привлекательным объектом с точки зрения его экологических характеристик и востребованным исходным полимером с точки зрения зеленой химии. Однако особенности растворимости хитина очень сильно ограничивают его использование в зеленой химии. Макромолекулы хитина связаны друг с другом прочной системой водородных связей, из-за чего хитин принято рассматривать как сшитый полимер. Эти сшивки приводят к значительному уплотнению структуры хитина и затрудняют его растворение в том числе и из-за сложностей проникновения растворителя. Хотя компактная структура хитина затрудняет его растворение, тем не менее существуют некоторые системы растворителей, которые способны вызвать разрушение межцепных водородных связей и привести в конечном итоге к растворению хитина.

1.2.1. Система щёлочь/мочевина

Водный раствор гидроксида натрия и мочевины в качестве растворителя впервые был использован для быстрого растворения целлюлозы при низкой температуре в группе профессора Занга [4]. Чуть позже Ху и сотрудники использовали водный раствор NaOH/мочевины для растворения хитина [5]. В их научной группе было установлено, что водный раствор, содержащий 8 мас.% NaOH и 4 мас.% способен эффективно растворять хитин при 20°C. Совершенно закономерно возникло мнение, что мочевина играет важную роль не только в разрушении системы водородных связей, но и в стабильности полученного раствора хитина. Однако полученный таким способом раствор оказался крайне чувствительным к температуре и при ее повышении превращался в гель. Впоследствии Ху и сотрудники использовали водный раствор NaOH/мочевины для растворения четырех видов природного хитина, полученного из крабов, креветок, куколок тутового шелкопряда и хитинового покрова мух, при этом исследуя поведение хитина в разбавленном растворе методами лазерного светорассеяния и вискозиметрии [6]. Результаты показали, что молекулы хитина существуют в

конформации статического макромолекулярного клубка, а гибкость цепи увеличивается от C1 до C4 в водной системе NaOH/мочевина. Позже Занг и ее коллеги приготовили прозрачный раствор хитина в водном растворе 8 мас.% NaOH/4 мас.% мочевины путем многократного повторения циклов замораживания/оттаивания [7]. Раствор хитина был непосредственно использован для приготовления гидрогеля, сохранившего структуру и свойства хитина. Каи и коллеги хитина использовали 1 М раствор NaOH и 0,3% раствор NaClO₂ для предварительной обработки порошка технического хитина. Затем очищенный порошок хитина диспергировали в смешанной системе NaOH:мочевина:H₂O в соотношении 11:4:85 по массе с образованием суспензии (3-8 мас.% хитина) . В дальнейшем получали прозрачный и вязкий раствор хитина путем замораживания суспензии при 20°C в течение ночи и последующего оттаивания при 5°C при интенсивном перемешивании [8]. Результаты показали, что наиболее важными факторами, непосредственно влияющими на растворимость хитина, являются концентрация NaOH и мочевины, а также температура растворения. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании водного раствора 11 мас.% NaOH и 4 мас.% мочевины. Механизм растворения хитина в водном растворе NaOH/мочевины при низкой температуре был изучен Зангом [9]. Результаты показали, что образование сети водородных связей между цепями хитина и NaOH играет ключевую роль в растворении хитина, тогда как мочевина важна для стабилизации системы. Итак, гидроксид-ионы постепенно разрушают систему водородных связей между макромолекулами. В это время другая часть гидроксид-ионов и аминогруппа мочевины образуют водородную связь, приводя к образованию кластеров гидрата мочевины, которые связываются с макромолекулами хитина водородными связями, что приводит к растворению хитина и стабилизации его раствора.

1.2.2. Система хлорид кальция/метанол

Раствор дигидрата хлорида кальция в метаноле неоднократно был использован в качестве растворителя хитина с образованием прозрачных вязких

растворов [10]. Важно отметить, что растворение протекает в мягких условиях при комнатной температуре без необходимости использования циклов заморозки и разморозки. В работах Токуры сообщается, что количество воды и количество ионов кальция оказывает решающее влияние на растворение хитина в метаноле, насыщенном дигидратом хлорида кальция. Кроме того, на растворимость хитина также оказывает выраженное влияние степень *N*-ацетилирования и молекулярная масса хитина [11]. При обсуждении механизма растворения хитина в данной системе растворителей было высказано предположение, что кальций атакует амидную связь в цепях хитина и разрушает тем самым систему межцепных водородных связей [12].

1.2.3. Система диметилацетамид/LiCl

В 1976 г. впервые было упомянуто о том, что смесь хлорида лития (LiCl) и *N,N*-диметилацетамида может быть использована в качестве растворителя хитина в мягких условиях [13]. Молекулярная масса хитина, безусловно, оказывает влияние на его растворимость в данной системе. При достаточно низких молекулярных массах (до 20 кДа) удастся получить раствор, содержащий до 15 мас.% хитина. Для выяснения механизма растворения хитина использовали его 1–3 мас.% раствор в *N,N*-диметилацетамиде, содержащем 5 мас.% хлорида лития [14]. По данным спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H , было выявлено сильное взаимодействие LiCl с гидроксильными и ацетамидными группами, которое, очевидно, позволяет разрушить межмолекулярные водородные связи и привести к растворению хитина. На данный момент система диметилацетамид/LiCl является самой используемой для осуществления полимераналогичных превращений хитина в гомогенном режиме.

1.2.4. Ионные жидкости

Как новые и перспективные среды, ионные жидкости обладают рядом преимуществ, практическое отсутствие давления насыщенного пара, высокая термическая стабильность, широкое электрохимическое окно, низкая

воспламеняемость. Эти свойства определяют их репутацию экологически чистых растворителей и катализаторов, и они широко используются в различных областях, таких как: катализаторы в синтезе органических соединений [15-17], полимеров [18-21]; использование в областях, связанных с биохимическими процессами [22-24], металлокомплексным катализом [25], электрохимией в целом и электрокатализом в частности [26-32], очистными технологиями [33], удалением CO₂ из газов [34], хранением и транспортировкой газов [15, 35], аналитической химией [36]. Zhang и соавторы впервые сообщили, что ионная жидкость хлорида 1-бутил-3-метилимидазолия ([Bmim][Cl]) обладает превосходными растворяющими характеристиками для хитина и хитозана, а прозрачный и вязкий раствор 10 мас. % хитина или хитозана легко было получен за 5 ч при перемешивании данных полисахаридов в [Bmim][Cl] при 110°C [37]. В **таблице 1** представлен ряд описанных в литературе ионных жидкостей, использованных для растворения хитина и максимальная массовая доля хитина в получаемых растворах.

Таблица 1. Растворимость хитина в ионных жидкостях [38].

Ионная жидкость	Масс.% хитина
Глицинат тетрабутилфосфония	3
Лизинат тетрабутилфосфония	2
Валинат тетрабутилфосфония	4
Пропионат тетрабутилфосфония	3
Глицинат 1-этил-3-метилимидазолия	6
Лизинат 1-этил-3-метилимидазолия	6
Фомиат 1-этил-3-метилимидазолий	5
Ацетат 1-этил-3-метилимидазолия	5
Пропионат 1-этил-3-метилимидазолия	14
Бутират 1-этил-3-метилимидазолия	15
Валерианат 1-этил-3-метилимидазолия	4
Каприлат 1-этил-3-метилимидазолия	2

Среди перечисленных систем растворителей весьма затруднительно отнести к зелёным первые три, поскольку щелочь является агрессивным и экологически опасным реагентом [39], метанол – яд, диметилацетамид – также токсичный растворитель (ПДК 3 мг/м³) [40], хлорид лития опасен для кожи и слизистых оболочек [41]. Достаточно экологически чистыми являются ионные жидкости, однако возникает ряд вопросов, связанных с их утилизацией с одной стороны и высокой стоимостью с другой стороны [42].

К сожалению, хитин не растворим в воде. Примеры химической модификации хитина с использованием воды в качестве реакционной среды (разумеется, в гетерогенном режиме) представлены в литературе весьма скудно и касаются главным образом деацетилирования хитина с образованием хитозана [43-53]. Тем не менее вода в случае хитина является идеальной реакционной средой с точки зрения зелёной химии и экологии. Важнейшим подходом к решению проблемы в подобных сложных случаях является поиск путей интенсификации химических превращений в гетерогенном режиме (воздействие микроволновым облучением, ультразвуком, повышенным гидростатическим давлением, активация исходного полимера переосаждением и проч., а также сочетание различных методов).

Недавно в нашей научной группе была показана возможность интенсификации ультразвуковым воздействием реакции алкилирования хитина простейшими алкилгалогенидами (1-азидо-3-хлорпропан-2-олом, **схема 1**) [52-54]. Нам удалось подобрать акустические условия, позволяющие не только осуществить интересующее нас полимераналогичное превращения в воде, но и сохранить целостность цепи исходного полимера.

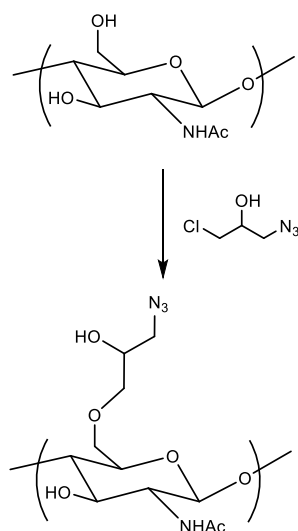


Схема 1. Алкилирование хитина.

Поскольку данная работа имеет «зеленую» направленность, в рамках диссертационного исследования было решено продолжить развитие данного направления и попытаться распространить его на более сложные алкилгалогениды с целью разработки удобных одностадийных методик получения в мягких условиях производных хитина с привлекательными биологическими свойствами в самом экологически чистом растворителе – воде.

1.3. Химия хитозана в контексте зеленой химии

Хитозан в отличие от хитина хорошо растворяется в воде при кислых значениях рН, самым классическим растворителем для хитозана является 1% водный раствор уксусной кислоты. Таким образом, отличие от хитина, в случае с хитозаном не возникает проблемы в поиске экологически чистого растворителя. Проблема в данном случае кроется в другом. Дело в том, что именно из-за того, что реакционной средой для проведения химической модификации хитозана является вода (к тому же при кислых значениях рН), возможны побочные конкурирующие взаимодействия реагента с водой, а также гидролиз продукта химической модификации хитозана. Так, например, при алкилировании хитозана алкилгалогенидами возможен побочный гидролиз алкилирующего реагента (конкурирующий процесс нуклеофильного замещения) или же

дегидрогалогенирование (конкурирующий процесс элиминирования). В случае же реакций нуклеофильного присоединения – отщепления, протекающих по Ad_N-E механизму при обработке хитозана ароматическими альдегидами образующиеся основания Шиффа гидролизуются в уксуснокислой среде по азометиновой группе с образованием исходного хитозана и карбонильного соединения. Все упомянутые синтетические сложности приводят к необходимости использования избытков (и подчас очень больших избытков) модифицирующих реагентов. Литература изобилует подобными примерами.

В частности, в работах [55-59] сообщается о синтезе сукцинильных и/или глутарильных производных хитозана путём его обработки янтарным и/или глутаровым ангидридом в воде. Во всех случаях для достижения желаемой степени замещения требуется использовать двух- и более кратный избыток реагента в сравнении с расчётом. Этот факт объясняется конкурирующей побочной реакцией гидролиза указанных ангидридов до соответствующих карбоновых кислот (**схема 2**).

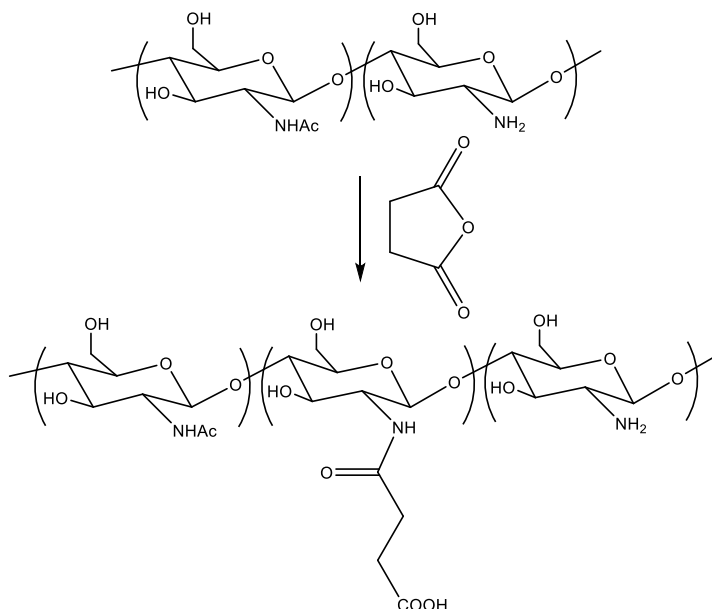


Схема 2. Получение сукцинильных производных хитозана и побочный процесс.

Для проведения реакций алкилирования хитозана алкилгалогенидами также используется алкилирующий реагент [60-66]. Причиной тому являются побочный гидролиз алкилирующих реагентов до соответствующих спиртов или же

конкурирующие реакции элиминирования галогеноводородов с образованием соответствующих олефинов (**схема 3**).

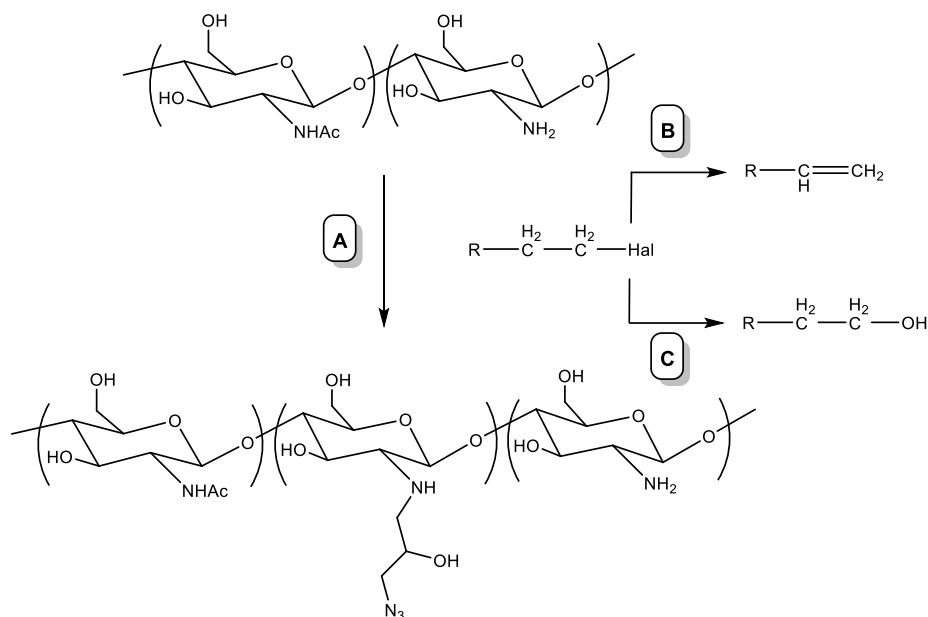


Схема 3. Алкилирование хитозана (**A**) и побочные реакции (**B** и **C**).

Подобные эффекты практически постоянно наблюдаются и при ацилировании хитозана карбоновыми кислотами с использованием классического карбодиимидного метода и его модификаций [67-70]. Например, даже для достижения низких степеней замещения при взаимодействии сукцинилхолестерина с хитозаном требуются кратные избытки ацилирующего реагента и карбодиимида [71]. Это обусловлено побочной реакцией гидролиза образующегося активированного эфира. Однако стоит отметить, что образующиеся холестериновые производные хитозана способны к самосборке в наночастицы, которые могут быть загружены дексаметазоном для его интравитриальной доставки в стекловидное тело глаза.

Несколько по иной причине требуются избытки и при синтезе оснований Шиффа из хитозана путем его обработки альдегидами [72-76]. Например, для получения замещенных салицилиденовых производных хитозана независимо от степени замещения требуется избыток ароматического альдегида, причем избыток возрастает с увеличением требуемой степени замещения в сравнении с расчетным количеством реагента [76]. Данный факт обусловлен гидролитическим

расщеплением основания Шиффа в кислой среде на исходные соединения (в щелочной же среде основания Шиффа устойчивы к гидролизу).

Вторым важным вопросом в химии хитозана является селективность реакций, особенно реакций замещения. Классическим примером в данном случае может служить получение диэтиламиноэтильных производных хитозана, которые интересны и перспективны в качестве сорбентов для удаления экологических загрязнителей из сточных вод [77]. Диэтиламиноэтильные производные хитозана получают путем его обработки диэтиламиноэтилхлоридом в качестве алкилирующего реагента, выступающего в качестве электрофила в данной реакции нуклеофильного замещения. Поскольку в молекуле хитозана имеется два типа нуклеофильных реакционных центра – гидроксильные группы и первичные аминогруппы, данная реакция может протекать как *O*-замещение и как *N*-замещение [78]. Обычно для достижения селективного замещения требуется использовать стадии постановки и снятия защитных групп, что совершенно не вписывается в принципы зеленой химии. В связи с этим актуальной задачей химии хитозана, лежащей в плоскости зеленой химии и экологии является поиск альтернативных подходов, позволяющих достичь селективности без использования дополнительных стадий синтеза.

Две указанные выше проблемы в химии хитозана (необходимость больших избытков реагентов для модификации и селективность реакций, например, алкилирования), имеющие непосредственное отношение к зеленой химии в некоторых случаях могут быть решены с использованием сонохимических решений. В качестве яркого примера можно привести следующий.

Производные хитозана с азидной функциональной группой крайне широко применяются в клик-химии [79, 80]. В литературе описан ряд способов получения азидных производных, но они не отличаются высокой селективностью [81-85]. Селективные же синтезы азидных производных многостадийны, включают стадии постановки и снятия защитных групп, требующие достаточно жестких для химии хитозана условий [86-88]. И то и другое не соответствует экологическим принципам зеленой химии. В связи с вышесказанным разработка методик синтеза

азидных производных хитина, соответствующих принципам зеленой химии, представляет собой актуальную задачу. В работе [89] был предложен синтез азидных производных хитина путем его алкилирования 1-азидо-3-хлорпропан-2-олом (схема 4), причем синтезы были приведены как в присутствии ультразвука, так и без ультразвукового воздействия.

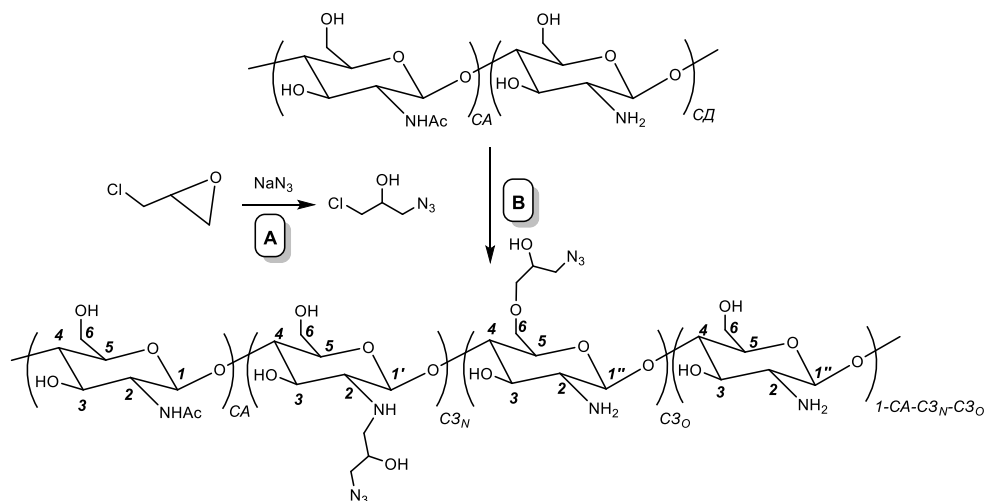


Схема 4. Получение (3-азидо-2-гидроксипропил)хитозана.

Алкилирование хитозана возможно как по гидроксильным группам (*O*-замещение), так и по аминогруппам (*N*-замещение). При сравнении выбранных оптимальных акустических условий (частота 80 кГц, мощность 250 Вт) с традиционными условиями синтеза (комнатная температура, pH = 6) были получены результаты, представленные в таблице 2.

Таблица 2. Сравнение традиционных и ультразвуковых синтезов.

Одинаковые условия			Условия синтезов без использования ультразвука				Условия синтезов под воздействием ультразвука			
I			II				III			
C3	T, °C	pH	C3 _N	C3 _O	АХП :ХЗ	Время	C3 _N	C3 _O	АХП :ХЗ	Время
0.15	25 °C	6	0.09	0.11	1:1	5 ч	0.15	0	0.5:1	15 мин
0.45	25 °C	6	0.22	0.23	8:1	5 ч	0.45	0	2:1	15 мин

При прочих равных условиях (таблица 2, столбец 1) действие ультразвукового облучения сказывается в выраженном уменьшении времени

протекания реакции, а также в снижении необходимого избытка алкилирующего реагента. Ультразвуковое воздействие позволяет получать при $pH = 6$, $T = 25\text{ }^{\circ}C$ селективно замещенные по аминогруппе производные со степенями замещения 0.15 и 0.45.

Таким образом, правильно подобранные акустические условия позволяют использовать ультразвук в химии хитозана как для уменьшения избытка алкилирующего реагента, так и для повышения селективности процесса алкилирования и уменьшения времени реакции, что соответствует принципам зеленой химии.

В рамках данного диссертационного исследования было решено продолжить развитие ультразвукового направления и попытаться распространить его на более сложные алкилгалогениды для получения новых редких в структурно-химическом отношении производных хитозана, при этом значительно уменьшив избыток алкилирующего реагента, достигая высокой селективности и сокращая время синтеза.

1.4. Загрязнение окружающей среды антибиотиками и пути решения данной проблемы с использованием достижений хитинологии

Нерациональная утилизация неиспользованных антибиотиков из промышленных фармацевтических предприятий, учреждений здравоохранения (главным образом, больниц) и жилых районов в значительной степени сказывается на постоянном поступлении антибиотиков в системы сточных вод. Антибиотики, поступившие в системы сточных вод, неизбежно попадают в почву, ухудшая качество поверхностных и грунтовых вод посредством механизмов стока, инфильтрации или фильтрации после осадков [90].

Сточные воды жилых массивов, фармацевтических заводов и иных предприятий, имеющих непосредственное отношение к работе с антибиотиками (биотехнологические и химические заводы), ферм и скотобоев, предприятий молочной промышленности, учреждений здравоохранения, содержащие антибиотики и смежные с ними соединения, попадают на очистные сооружения.

Антибиотики практически не разрушаются в современных системах очистных сооружений, а образующийся на них шлам, также неизбежно содержит антибиотики и вывозится на свалки или используется на сельскохозяйственных угодьях [91].

В широком контексте цикл загрязнения антибиотиками в окружающей среде включает взаимосвязанные процессы, включающие трофические цепи, биоаккумуляцию и биомагнификацию, связанные с орошением урожая обработанными сточными водами или загрязненной почвой, передачей по цепям питания в водных биогеоценозах (в частности, рыбам и ракообразным, которые затем потребляются человеком).

Постоянное накопление остатков антибиотиков в пищевых продуктах, водоемах и на сельскохозяйственных угодьях привело к нарушению экологического равновесия и представляет собой угрозу здоровью человека. Проблема заключается в растущей устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам. В итоге мутационного процесса бактерии, вирусы, грибы и иные микроорганизмы стали в результате генетических изменений приобрели устойчивость к действию лекарственных соединений. Результатом этого процесса явилась усложнение этиотропной антибиотикотерапии инфекционных заболеваний, а также появление тяжелых нозокомиальных (внутрибольничных) инфекций.

Более того, сельскохозяйственные растения оказались способными к сорбции и накоплению больших количеств антибиотиков, которые помимо аккумуляции в растительных клетках способны также нарушать физиологические процессы в тканях и органах растительных организмов, приводя к ряду ранее отсутствовавших экотоксикологических эффектов. Избыток антибиотиков на фермерских угодьях может затруднить прорастание семян и снизить растительную биомассу и урожай [92, 93].

Сточные воды являются самым значимым источником загрязнения окружающей среды антибиотиками. После обработки на очистных сооружениях

большинство антибиотиков не подвергаются трансформации и неизбежно остаются в стоках практически в изначальном количестве [92].

В работе [94] была проведена оценка содержания антибиотиков в сточных водах учреждений здравоохранения, и было выявлено, что концентрация антибиотиков фторхинолонового ряда достигает 125 мкг/л, а ампициллина – 80 мкг/л [95, 96].

В различных объектах окружающей среды постоянно обнаруживаются практически все используемые в клинической медицине антибиотики [97-99]. Например, высокое содержание сульфаметоксазола и триметоприма было выявлено даже в акватории бельгийских гаваней, высокое содержание ципрофлоксацина и иных фторхинолонов детектировано в водах озера Хейлинг, в акватории заливе Лайчжоу, а препараты сульфаниламидного ряда регулярно обнаруживают в сточных водах очистных сооружений [91]. Фторхинолоны, бета-лактамы, антибиотики группы макролидов, линкомицин также регулярно встречаются в сточных водах медицинских учреждений в концентрациях свыше 500 нг/л [91]. В летний период концентрация антибиотиков в сточных водах учреждений здравоохранения заметно увеличивается. Следует отметить, что фторхинолоны детектируются в наивысших количествах среди упомянутых антибиотиков.

С учетом накапливающихся данных становится очевидным серьезный экологический вопрос, связанный с всеобщим загрязнением антибиотиками. Подтверждая это, Европейская комиссия официально заявила, что «загрязнение фармацевтическими препаратами суши и водных экосистем является актуальной проблемой здоровья и насущным экологическим вызовом» [95].

Одной из важнейших и эффективных стратегий устранения упомянутой выше экологической проблемы является снижение уровня потребления антибиотиков. В этом контексте весьма важными выглядят достижения в соответствующих областях химии хитина и хитозана. Вклад хитинологии в решение данной экологической проблемы заключается в (i) получении новых экологически безопасных антибактериальных производных хитина и хитозана,

являющихся альтернативой традиционным антибиотикам, а также (ii) разработке систем адресной доставки и пролонгированного высвобождения антибиотиков, что позволяет значительно снизить частоту приёма и дозу препарата.

Рассмотрим первый подход, заключающийся в получении новых антибактериальных производных хитина и хитозана, представляющих собой потенциальную альтернативу традиционным антибиотикам.

Повышенная катионная плотность макромолекул хитозана и его производных приводит к сильному электростатическому взаимодействию с отрицательно заряженными участками бактериальной поверхности [100, 101]. Катионная плотность макромолекул хитозана определяется степенью его деацетилирования [102]. Наибольшая катионная плотность характерна для хитозанов с наибольшей степенью деацетилирования, поскольку именно деацетилированные свободные аминогруппы хитозана способны подвергаться эффективному протонированию с образованием положительно заряженных NH_3^+ -группировок [103]. По этой причине хитозаны с высокой степенью деацетилирования обладают значительно большей антибактериальной активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий по сравнению с хитозанами с низкой степенью деацетилирования [104].

Увеличение катионной плотности хитозана может быть достигнуто двумя путями: (1) увеличением степени деацетилирования, (2) введением в цепь хитозана заместителей, содержащих катионные фрагменты. Использование второй стратегии приводит к получению производных хитозана, которые обычно обладают значительно большей антибактериальной эффективностью, чем исходный хитозан [105, 106].

Основное преимущество хитозана перед другими полисахаридами (целлюлозой, крахмалом, каррагинаном, альгиновой и гиалуроновой кислотами и др.) заключается в значительно большей препаративной простоте его химической модификации [107]. Наличие аминогруппы наряду с первичной гидроксильной функцией позволяет получать *N*-замещенные производные хитозана, *O*-замещенные или *N,O*-замещенные производные. Химическую модификацию

хитозана проводят, прежде всего, с целью улучшения его физико-химических и биологических свойств. Например, *N*-кватернизованный хитозан обладает отличной растворимостью в воде и значительно большей антибактериальной активностью по сравнению с исходным хитозаном, *N*-замещенными тетразолльными [108], триазолльными [56], азидными [109], оксадиазолными [110] и многими другими производными. Действительно, в литературе описано значительно больше примеров *N*-замещенных антибактериальных производных хитозана, чем *O*-замещенных. Очевидно, это связано с большей реакционной способностью аминогруппы по сравнению с гидроксильной группой (например, нуклеофильные свойства аминогруппы значительно превосходят нуклеофильную способность ОН-группы).

На **рисунке 2** показаны примеры (согласно наиболее цитируемым публикациям) введения заместителей в основную цепь хитозана посредством *N*-замещения с целью создания исключительно мощных нетоксичных антибактериальных производных [111-128]. Приведенные примеры отчетливо иллюстрируют структурно-химическое разнообразие вводимых в полимерную цепь заместителей. Под формулой заместителя указан вид микроорганизма, в отношении которого обнаружена высокая антибактериальная активность данного конкретного производного.

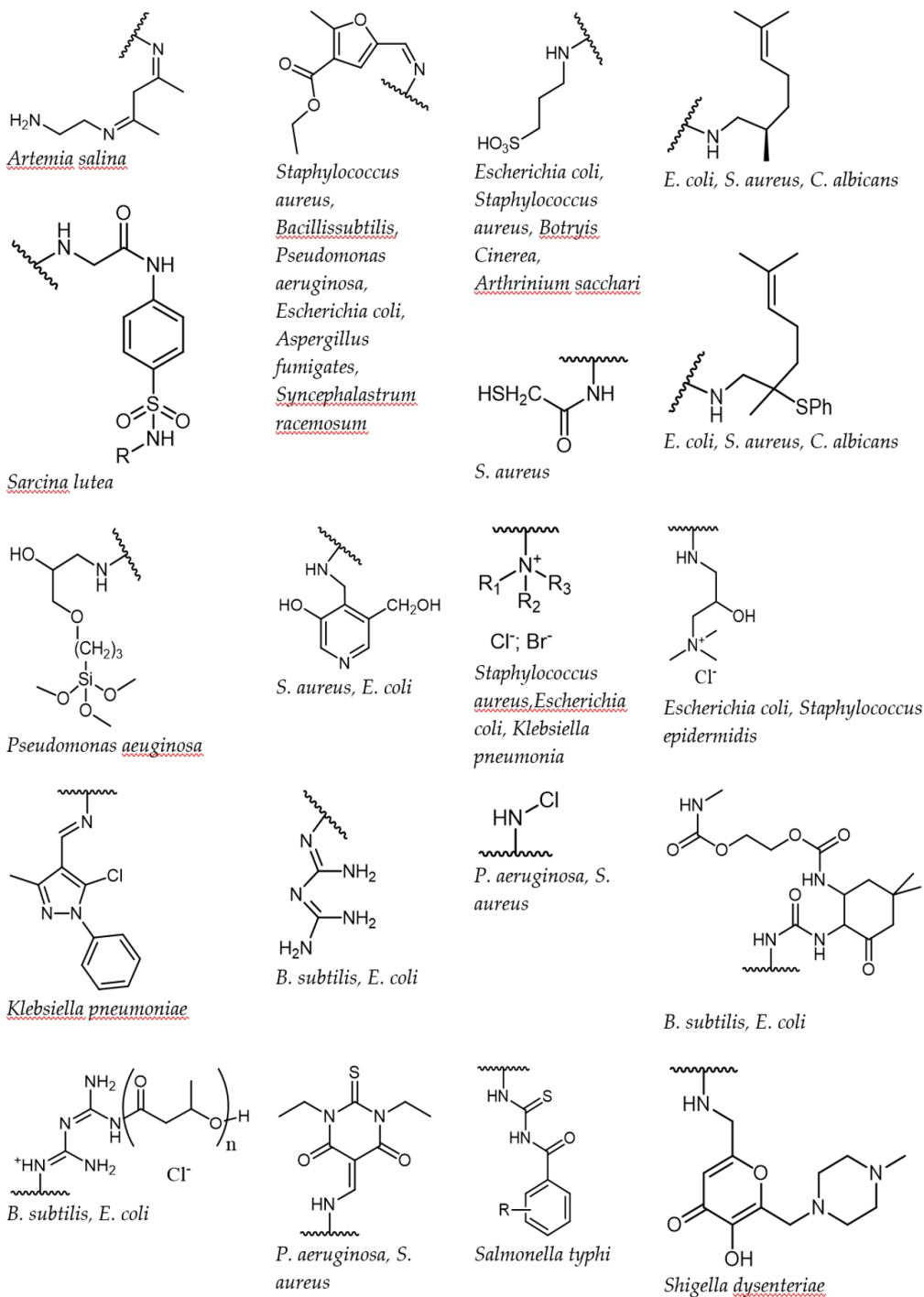


Рис. 2. Введенные в полимерную цепь заместители высокоактивных антибактериальных производных хитозана.

Как уже говорилось, второй подход к решению экологической проблемы антибиотиков, в котором напрямую задействованы разработки в области хитинологии, заключается в создании систем пролонгированного высвобождения антибиотиков.

Как правило, традиционные пероральные системы доставки лекарств характеризуются ограниченной биодоступностью, вызванной недлительным периодом нахождения препарата в желудке из-за низкой растворимости лекарства в среде с повышенным рН, ферментативного расщепления лекарства в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), абсорбции лекарства в верхней части ЖКТ или короткого периода полувыведения [129, 130]. С целью преодоления указанных ограничений, был разработан ряд систем доставки лекарств, в которых хитозан зачастую играет главную роль [130].

Механизм высвобождения лекарств из хитозановой матрицы включает набухание полимера, диффузию лекарств через поры полимерной матрицы, эрозию и деградацию полимера. Кроме того, высвобождение лекарственного вещества зависит от величины рН, поэтому в условиях кислотности желудочного сока (рН 1.6) высвобождение протекает скорее, чем в кишечной среде (рН 6.5). Возможен также эффект так называемого «начального взрывного высвобождения», что объясняется набуханием полимера и образованием пор в полимерной матрице, или же быстрой диффузией лекарственного средства, которое может находиться на поверхности полимера [131, 132]. Хитозановая матрица может быть подвергнута целенаправленной модификации поверхностных групп (NH_2 и OH), а так же полной химической модификации, приводящей к улучшению растворимости в кишечной среде, мукоадгезивности и эффективности инкапсуляции лекарственного средства [132]. Особую роль в создании систем контролируемого высвобождения антибиотиков играют также микро- и наночастицы, загруженные лекарственным препаратом. Во избежание многословности и для соблюдения регламента объема работы наиболее яркие на взгляд автора взгляд примеры описанных в литературе высокоэффективных систем высвобождения антибиотиков, позволяющих значительно снизить его дозу, представлены в **таблице 3**.

Таблица 3. Системы пролонгированного высвобождения антибиотиков на основе хитозана (НЧ – наночастицы).

Хитозан/лекарство	Система	Микроорганизм	Ссылка
-------------------	---------	---------------	--------

Хитозан/сульфаметоксазол	НЧ	<i>P. aeruginosa</i>	[133]
Хитозан/амоксициллин	НЧ	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	[134]
Хитозан/амикацин	НЧ	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Edwardsiella tarda</i> <i>Pasteurella piscicida</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Streptococcus faecium</i> <i>Streptococcus iniae</i> <i>Vibrio ordalli</i> <i>Yersinia ruckeri</i>	[135]
Хитозан/ципрофлоксацин	НЧ	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	[136]
Хитозан/азитромицин	НЧ	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	[137]
Хитозан/рифампицин	НЧ	<i>S. epidermidis</i>	[138]
Хитозан/кларитромицин	НЧ	<i>S. aureus</i>	[139]
Хитозан/ципрофлоксацин	Гель	<i>E. coli</i>	[140]
Хитозан/клиндамицин	Гель	<i>E. faecalis</i>	[141]
Хитозан/ципрофлоксацин	Гель	<i>C. albicans</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	[142]
Хитозан/миноциклин	Гель	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	[143]
Хитозан/тетрациклин	Гель	<i>S. aureus</i>	[144]
Хитозан/амикацин/даптомицин	Пленка	<i>S. aureus</i>	[145]
Хитозан/даптомицин	Пленка	<i>S. aureus</i>	[146]
Хитозан/клотримазол	Порошок	<i>Candida glabrata</i>	[147]
Хитозан/левофлоксацин	Гель	<i>Methicillin-resistant S. aureus</i>	[148]

Хитозан/метронидазол	Гель	<i>Candida species</i>	[149]
Хитозан/тетрациклин/хлоргексидин	Гель	<i>A. actinomycetem-comitans S. epidermidis</i>	[150]
Хитозан/гентамицин	Порошок	<i>S. aureus</i>	[151]

Эти примеры демонстрируют перспективность использования хитозана в качестве носителя лекарственных препаратов для создания систем пролонгированного высвобождения с целью решения важной экологической проблемы минимизации уровня использования антибиотиков. Наночастицы на основе хитозана привлекают особое внимание исследователей при разработке создания систем пролонгированного высвобождения лекарств. Однако в литературе не удалось обнаружить ни одного примера, когда бы в одном исследовании в одинаковых условиях проводилось сравнение эффективности различных, но родственных систем пролонгированного высвобождения антибиотика – например, (1) прямых конъюгатов ФС с хитозановой макромолекулой, (2) конъюгатов, в которых ФС соединена с хитозановой цепью через рН-чувствительный спейсер, (3) самособирающихся наночастиц, (4) наночастиц, полученных ионным гелированием с последующим изучением их активности как *in vitro*, так и *in vivo*. При этом стоит отметить, что подобные исследования имеют крайне важное фундаментальное значение, особенно для выявления общности и специфики так называемых отношений «структура–активность». В рамках данной диссертационной работы будет проведено первое такое исследование.

1.5. Общая характеристика работы

В современной экологической химии одним из важнейших направлений является развитие методов зеленой химии, о чём напрямую указывает всемирно известный химик-эколог Стэнли Манахан в своих фундаментальных работах в области химии окружающей среды, ставшими классическими для подготовки высококвалифицированных химиков-экологов [1, 2]. Зелёная химия представляет

собой совокупность методов и подходов, цель которых заключается в усовершенствовании химических процессов, направленном на уменьшение отрицательного влияния на окружающую среду. Согласно двенадцати принципам зелёной химии, сформулированными Полом Анастасом и Джоном Уорнером в 1998 году [152], к важнейшим химическим решениями для минимизации отрицательного влияния химических процессов на окружающую среду относят (i) использование экологически безопасных растворителей и экологически безопасных реагентов, и (ii) разработку методов и подходов для ощутимого снижения количеств реагентов, представляющих опасность для окружающей среды.

В рамках данной диссертационной работы получили развитие оба вышеупомянутых типа химических решений применительно к химии хитина и хитозана. Во-первых, в разработанных методиках химической модификации хитина и хитозана в качестве реакционной среды была использована вода как самый экологически чистый растворитель. Особенно это важно для химии хитина, поскольку исследования, сосредоточенные на использовании воды в качестве среды для химической модификации хитина представлены в литературе лишь единичными примерами. В подавляющем же большинстве работ в качестве растворителя используются токсичные и агрессивные системы: диметилацетамид/LiCl или же концентрированная щёлочь/мочевина. Во-вторых, в данной работе для интенсификации химических превращений используется ультразвуковое облучение, которое позволяет в разы уменьшить количества реагентов для химической модификации в сравнении с традиционными подходами. Кроме того, использование ультразвука позволяет существенно сократить и время протекания реакций (иногда в десятки раз).

Повышенный спрос на экологичные катализаторы в рамках развития зелёной химии значительно расширил использование хитозана и хитина в качестве органокатализаторов. Однако зачастую упомянуты природные полисахариды характеризуются недостаточной каталитической активностью, но их химическая модификация способна преодолеть имеющиеся недостатки. Следовательно,

химическая модификация хитозана и хитина является актуальным направлением в области поиска новых экологичных высокоэффективных катализаторов органических превращений. В данной диссертационной работе это направление также получило свое развитие: полученные в рамках диссертационного исследования производные хитозана были использованы как зеленые катализаторы селективного окисления спиртов в карбонильные соединения.

В 2018 году Европейской комиссией официально было озвучено, что загрязнение воды и почвы антибиотиками представляет собой «крайне серьезную проблему для здоровья населения и важную экологическую проблему» [153]. С этим утверждением согласились специалисты Индии, Китая, России, США, Японии и других стран [154].

Сточные воды учреждений здравоохранения, фармацевтических предприятий и животноводческих комплексов представляют собой важнейший источник поступления антибиотиков в окружающую среду. Это связано с тем, что антибиотики практически не подвергаются биохимической трансформации в очистных сооружениях [155]. Самое важное и тревожное негативное последствие попадания антибиотиков в окружающую среду заключается в формировании к ним резистентности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Кроме того, антибиотики приводят к нарушению функционирования очистных сооружений и систем компостирования, аккумулируются в сельскохозяйственных растениях и животных, а также в рыбе [154].

Одной из важнейших и эффективных стратегий устранения упомянутой выше экологической проблемы является снижение уровня потребления антибиотиков. Для достижения этой цели используется законодательное регулирование, медицинские и химические решения. Медицинские решения заключаются в разработке новых протоколов лечения, предполагающих использование меньших доз антибиотиков, в то время как химические решения включают (i) синтез новых экологически безопасных фармакологически активных соединений, являющихся альтернативой традиционным антибиотикам, а также (ii) разработку систем адресной доставки и пролонгированного высвобождения

антибиотиков, что позволяет значительно снизить частоту приёма и дозу препарата. В рамках данной работы получили своё развитие оба типа химических решений обозначенной экологической проблемы. В первой части работы были получены нетоксичные производные природных биосовместимых биodeградируемых полимеров – хитина и хитозана, которые по своей антибактериальной активности сопоставимы с традиционными антибиотиками. Во второй части работы были получены системы пролонгированного высвобождения антибиотиков, позволяющие в экспериментах *in vivo* достичь терапевтического эффекта при меньшей дозе препарата. В связи с вышесказанным **цель работы** состояла в развитии методов зеленой химии для химической модификации хитина и хитозана, а также в разработке новых малотоксичных высокоэффективных антибактериальных систем на основе хитозана. **Задачи работы** заключались в (i) выявлении акустических условий (частота и мощность ультразвукового облучения), позволяющих интенсифицировать синтез производных хитозана и хитина в воде; (ii) разработке методик синтеза производных хитозана и хитина под действием ультразвука в самом экологически чистом растворителе – воде; (iii) получении на основе производных данных полисахаридов систем с выраженной противомикробной, а также каталитической активностью в сочетании с минимальной токсичностью.

Научная новизна работы заключается в том, что (i) выявлены акустические условия, позволяющие интенсифицировать в взаимодействии в воде хитина и хитозана с бромидом 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия и ДЦК-опосредованное взаимодействие хитозана с ципрофлоксацином; (ii) в соответствии с принципами зеленой химии разработаны методики синтеза селенсодержащих производных хитина и хитозана; (iii) на основе хитозана впервые получен ряд систем пролонгированного высвобождения ципрофлоксацина: (a) конъюгаты ципрофлоксацин-хитозан без рН-чувствительного спейсера, (b) конъюгаты ципрофлоксацин-хитозан со спейсером, (c) загруженные ципрофлоксацином самособирающиеся наночастицы (на основе конъюгатов

ципрофлоксацин-хитозан без спейсера), (d) загруженные наночастицы на основе конъюгатов цiproфлоксацин-хитозан без спейсера, полученные методом ионотропного гелеобразования, (e) загруженные наночастицы на основе конъюгатов цiproфлоксацин-хитозан со спейсером, приготовленным методом ионного гелеобразования; (iv) выявлена высокая противомикробная активность в сочетании с низкой токсичностью у селенсодержащих производных хитина и хитозана (v) установлено, что загруженные цiproфлоксацином самоорганизующиеся наночастицы на основе конъюгатов без спейсера характеризуются (1) хорошим профилем высвобождения антибиотика, (2) высокой антибактериальной активностью и низкой токсичностью *in vivo* и требуют меньшей дозы антибиотика для достижения терапевтического эффекта; (vi) выявлена высокая каталитическая активность наночастиц селенсодержащих производных в реакции окисления 1-фенилэтилового спирта в ацетофенон бромом при комнатной температуре.

Практическая ценность работы состоит в том, что в результате работы (i) получили развитие методы зеленой химии в химической модификации хитина и хитозана, (ii) синтезированы новые высокоэффективные «зелёные» катализаторы, а также (iii) получены новые высокоактивные *in vivo* нетоксичные антибактериальные соединения.

Методология и методы. Для выполнения работы применялись современные физико-химические методы анализа, а также классические и современные методы синтетической химии.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на ряде всероссийских и международных конференций в виде устных и стендовых докладов.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов работы подтверждается исследованиями с помощью ряда физико-химических методов: ИК- спектроскопией, спектроскопией ЯМР, масс-спектрометрией высокого

разрешения, элементным анализом, рентгеноструктурным анализом, термогравиметрическим анализом и др.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в журналах, реферируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Также опубликован ряд тезисов докладов на конференциях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Возможность интенсификации ультразвуком в *самом экологически чистом растворителе (воде)* взаимодействия хитина и хитозана с бромидом 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия и ДЦК-опосредованного взаимодействия хитозана с ципрофлоксацином без деструкции полисахаридной цепи.
2. Методики *зеленого сонохимического синтеза* селенсодержащих и ципрофлоксациновых производных упомянутых полисахаридов и наночастиц на их основе.
3. Высокая каталитическая активность наночастиц селенсодержащих производных – *новых зеленых катализаторов* в реакции окисления 1-фенилэтилового спирта в ацетофенон бромом.
4. Высокая противомикробная активность в сочетании с *низкой токсичностью* селенсодержащих производных хитозана и наночастиц на их основе (потенциальная альтернатива традиционным антибиотикам).
5. Подход к получению наночастиц на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан с хорошим профилем высвобождения антибиотика, их высокая антибактериальная активность в сочетании с *низкой токсичностью* (в том числе *in vivo*).

Личный вклад соискателя. Автор выполнил все приведённые в работе химические эксперименты, принимал участие в биологических экспериментах, обработал полученные результаты, подготовил обзор литературных данных и

принял непосредственное участие в интерпретации и обобщении полученных экспериментальных данных, а также в подготовке статей для публикации.

Работа выполнена в рамках реализации следующих проектов (грантов):
РНФ 23-23-00021 (диссертант является **руководителем** данного гранта).
Результаты исследований автора, составившие основу данной диссертации, были отмечены Шорыгинской премией (2022 год, Москва).

Глава 2. Зеленый синтез новых водорастворимых селенсодержащих производных хитина и хитозана

Химическая модификация хитина и хитозана играет ключевую роль в создании новых функционализированных экологически чистых полимеров. В частности, производные хитозана с привитыми гетероциклическими заместителями в полимерной химии представляют интерес, поскольку сочетание эффектов полимерной цепи с эффектами гетероциклических заместителей зачастую приводит к образованию новых производных с привлекательными физико-химическими, механическими, биологическими и экологическими свойствами [156-159]. Например, триазольные производные хитозана обладают противомикробным [160], антиоксидантным [161] и каталитическим [162-164] действием. Пиридиновые, фурановые, тетразольные и оксадиазолиновые производные хитозана обладают выраженными антибактериальными свойствами [108, 165-167]. Имидазольные производные хитозана могут служить векторами доставки генов [168]. Особо следует отметить такое экологически важное свойство упомянутых производных, как их биосовместимость и отсутствие токсичности. На основе таких производных разработан ряд экологически чистых нетоксичных биodeградируемых материалов, как например пленки [56, 169-172]. К сожалению, химия хитина развита значительно слабее, чем химия хитозана. Среди гетероциклических производных хитина в литературе описаны только триазольные и тетразольные производные [52-54, 173].

С одной стороны, селенсодержащие гетероциклические производные не описаны ни в химии хитина, ни в химии хитозана. Тем не менее такие производные перспективны в качестве (i) зеленых катализаторов во многих синтетических превращениях [174] и (ii) фармакологически активных веществ [175-178], например, в качестве альтернативы антибиотикам (а это, как уже говорилось в главе 1, является одним из путей решения экологической проблемы, обусловленной загрязнением окружающей среды антибиотиками). Таким образом,

селенсодержащие гетероциклические производные хитозана весьма привлекательны с точки зрения экологии в целом и зеленой химии и в частности.

В связи с вышесказанным в рамках данной главы диссертации были получены первые селенсодержащие производные хитина и хитозана путем алкилирования полисахаридов бромидом 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия (схема 5 и 6). В качестве алкилирующего агента был выбран именно бромид 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия, благодаря его доступности через одностадийную клик-реакцию реакцию в мягких условиях [179], что соответствует второму, шестому и восьмому принципам зеленой химии.

С другой стороны, как уже подчеркивалось в литобзоре, при алкилировании хитозана остро стоят вопросы (i) селективности алкилирования и (ii) необходимости использования больших избытков алкилирующего реагента. В химии же хитина важной является задача изучения возможности использования воды в качестве реакционной среды. Решение этих вопросов находится в плоскости зеленой химии и имеет немаловажное значение для развития экологического подхода в синтетической химии. В недавних исследованиях нашей научной группой была разработана простая и удобная методика алкилирования хитина и хитозана простыми алкилгалогенидами под действием ультразвука [180]. В рамках данной главы диссертации был поставлен вопрос о способности ультразвука способствовать алкилированию хитина и хитозана бромидом 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия с селективным образованием новых селенсодержащих производных в воде. Было сделано предположение, что эти новые производные хитина и хитозана будут иметь низкую токсичность и обладать антимикробной и активностью благодаря своей поликатионной природе, как указывалось в главе 1. Кроме того, селенсодержащий гетероциклический заместитель может придавать целевым селенсодержащим производным способность к каталитической активности в реакции окисления спиртов в соответствующие карбонильные соединения, являясь, благодаря низкой токсичности, зелеными катализаторами. Это предположение основано на том, что структурно родственные гетероциклы (например, изоселеназолонь)

характеризуются выраженной каталитической активностью в данном типе органических превращений. Таким образом, в рамках данной главы диссертации было решено (*i*) соблюдая принципы зеленой химии получить первые селенсодержащие производные хитина и хитозана и разработать методики их зеленого ультразвукового синтеза (*ii*) оценить потенциал полученных производных как потенциальной альтернативы традиционным антибиотикам, изучив их противомикробные свойства и токсичность, а также (*iii*) оценить их потенциал как зеленых катализаторов в классической реакции окисления 1-фенилэтилового спирта в ацетофенон.

2.1. Получение новых водорастворимых селенсодержащих производных хитозана

В предыдущих работах нашей научной группы было показано, что алкилирование хитозана алкилгалогенидами под действием ультразвукового облучения (80 кГц, 250 Вт) позволяет значительно сократить время реакции и уменьшить избыток необходимого количества алкилгалогенида по сравнению с традиционными (без использования ультразвука) условиями. Кроме того, указанные акустические условия не вызывают ультразвуковой деполимеризации хитозановой цепи [108, 109, 160, 180-182]. В данном же разделе диссертации были сравнены результаты обработки хитозана (*i*) бромидом 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия (**схема 5**) под действием ультразвукового облучения (80 кГц, 250 Вт) и (*ii*) в традиционных условиях (нагревание 60 °С).

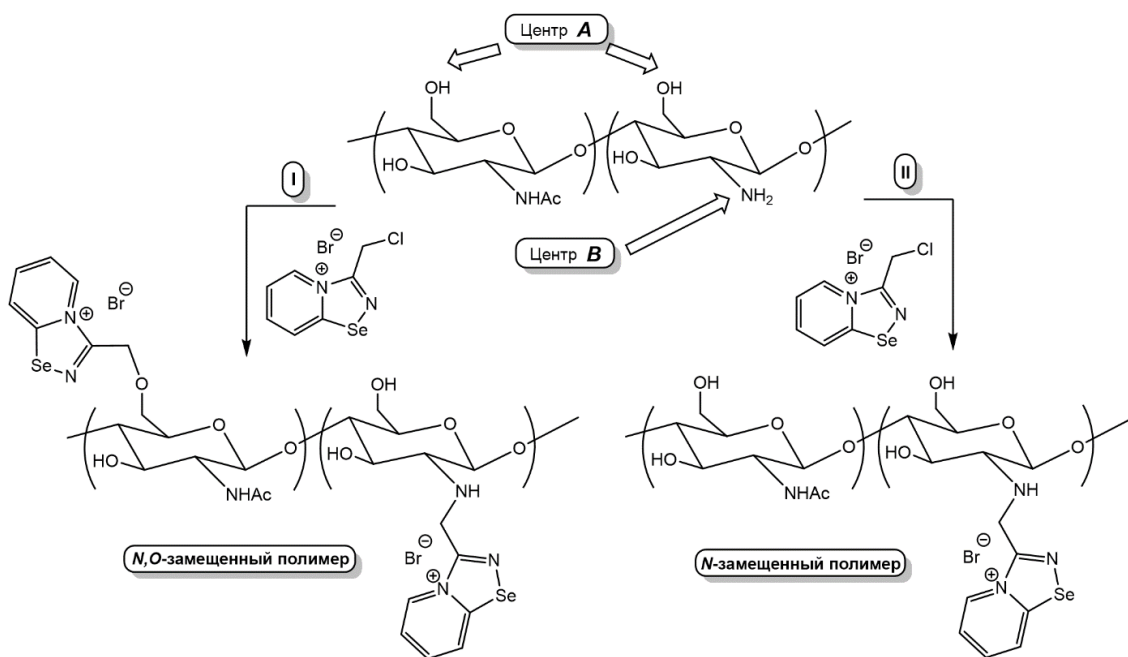


Схема 5. Получение селеносодержащих производных хитозана.

Во-первых, было изучено влияние необходимого количества 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромида и времени реакции для достижения такой же степени замещения (0.15, 0.40 и 0.65) с ультразвуковым облучением и без него. На основании данных из **таблицы 4** можно утверждать, что ультразвуковая обработка сокращает время реакции и избыток реагента для достижения одной и той же степени замещения. Так, для достижения степени замещения 0.15 в традиционных условиях время реакции и необходимое количество алкилирующего реагента составляют 7 часов и 2.2 эквивалента соответственно. При ультразвуковом облучении для реакции требуется всего лишь 12 мин и 0.5 эквивалентов бромида 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия для получения производных хитозана с той же степенью замещения (0.15).

Во-вторых, была оценена селективность исследуемого нуклеофильного замещения при ультразвуковом облучении и в традиционных условиях. Взаимодействие 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромида с хитозаном может происходить по двум нуклеофильным центрам последнего, т.е. **А** (группа *ОН*) и центр **В** (группа *NH₂*) (**схема 5**). В случае, когда реакция протекает в традиционных условиях (нагрев 60 °С), происходит образование селективно *N*-

замещенных производных хитозана при мольном соотношении хитозан:3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромид 1:2.2 или 1:6 (**схема 5, путь II**). Когда мольное соотношение реагентов увеличивается до 1:13.5, реакция приводит к образованию неселективно *N,O*-замещенных полимеров, как показано на **схеме 5, путь I** (общая степень замещения 0.65, где степень *N*-замещения составляет 0.15, а *O*-замещения 0.50) (**таблица 4**). Ультразвуковая обработка (80 кГц, 250 Вт) приводит к селективному *N*-замещению, причем даже в случае образования высокозамещенных продуктов (**схема 5, путь II, таблица 4**).

Таблица 4. Влияние ультразвукового облучения на время реакции и селективность в синтезе селенсодержащих производных хитозана.

Параметры, идентичные как для традиционного, так и для ультразвукового режима			Традиционные условия				Ультразвуковые условия			
СЗ	Т, °С	pH	СЗ _N	СЗ _O	Мольное соотноше ние	Врем я реак ции	СЗ _N	СЗ _O	Мольное соотноше ние	Время реакци и
0.15	60 °С	3	0.15	0	1:2.2	7 ч	0.15	0	1:0.5	12 мин
0.45	60 °С	3	0.45	0	1:6	7 ч	0.45	0	1:1	12 мин
0.65	60 °С	3	0.50	0.15	1:13.5	7 ч	0.65	0	1:1.7	12 мин

Строение полученных полимеров подтверждено данными спектроскопии ЯМР ¹H. Типичный спектр ЯМР ¹H с отнесением сигналов представлен на **рисунке 3**. Все полученные новые производные хитозана хорошо растворимы в воде.

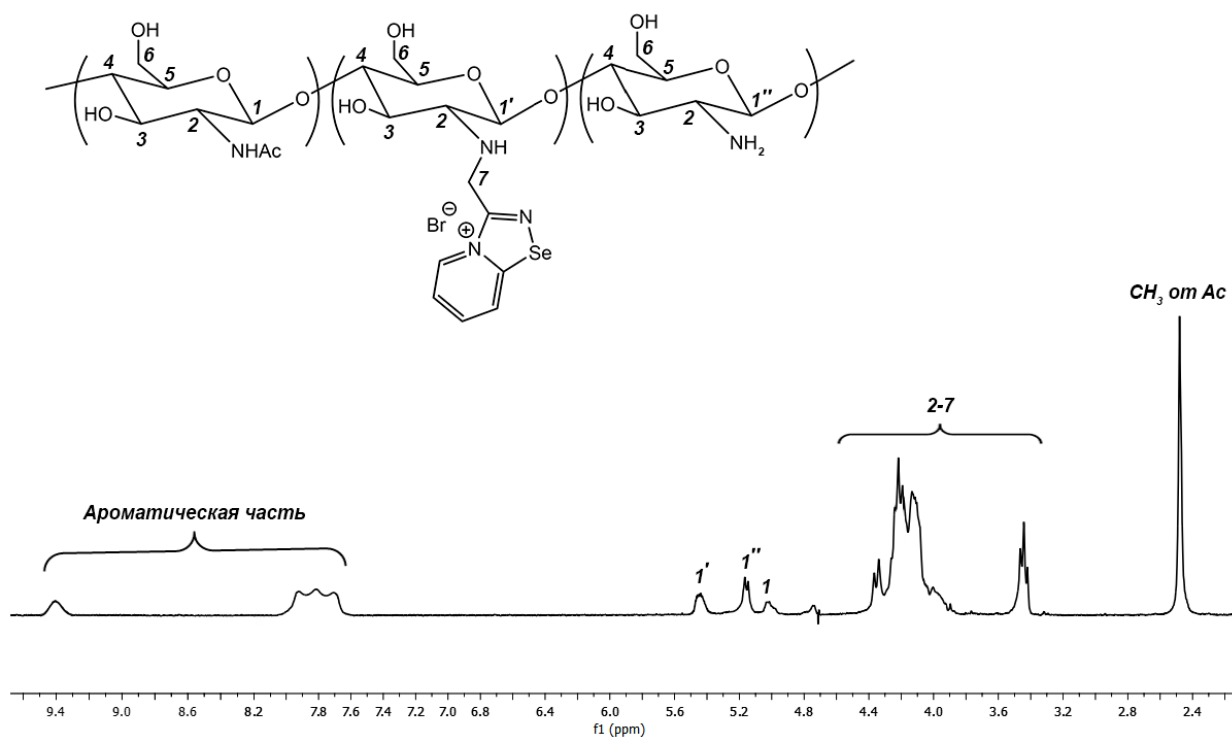


Рис. 3. Спектр ЯМР ^1H селенсодержащего производного хитозана.

Сокращенные наименования и степени замещения полученных производных хитозана представлены в **таблице 5**. Кодовые названия продуктов (**таблица 5**) следует расшифровывать следующим образом: **S-CS-I-L**: **S** – селенсодержащее производное, **CS** – хитозан, **I** – низкая степень замещения, **L** – использован хитозан низкой молекулярной массы; или **S-CS-III-M**: **S** – селенсодержащее производное, **CS** – хитозан, **III** – высокая степень замещения, **M** – умеренная молекулярная масса исходного хитозана; или **S-CS-II-H**: **S** – селенсодержащее производное, **CS** – хитозан, **II** – средняя степень замещения, **H** – высокомолекулярный исходный хитозан.

Таблица 5. Степени замещения полученных селенсодержащих производных хитозана и молекулярные массы исходных хитозанов.

Селенсодержащее производное хитозана	Молекулярная масса исходного хитозана, Да	Степень замещения полученного производного
S-CS-I-L	3.7×10^4	0.14
S-CS-I-M	6.9×10^4	0.15

S-CS-I-H	17.8×10^4	0.14
S-CS-II-L	3.7×10^4	0.45
S-CS-II-M	6.9×10^4	0.44
S-CS-II-H	17.8×10^4	0.43
S-CS-III-L	3.7×10^4	0.67
S-CS-III-M	6.9×10^4	0.64
S-CS-III-H	17.8×10^4	0.65

2.2. Получение новых водорастворимых селенсодержащих производных хитина

Хитин нерастворим в воде при любом значении pH. Следовательно, реакции алкилирования хитина алкилгалогенидами в водной среде могут протекать только в гетерогенном режиме. Однако в гетерогенных реакционных условиях хитин характеризуется крайне низкой реакционной способностью. По этой причине в литературе представлены лишь немногочисленные примеры гетерогенного *O*-алкилирования полностью ацетилированного хитина в воде [183-186]. В приведенных литературных примерах реакции протекают в жестких условиях (концентрированный раствор NaOH, нагревание) и сопровождаются частичным деацетилированием и деполимеризацией хитина. Предыдущие исследования нашей научной группы показали, что в ряде случаев ультразвуковая обработка хитина повышает его реакционную способность в гетерогенных реакциях [52, 53, 170, 173]. В рамках данной главы диссертации была проведена обработка хитина бромидом 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия (**схема 6**) в водной среде как в традиционных, так и в ультразвуковых условиях.

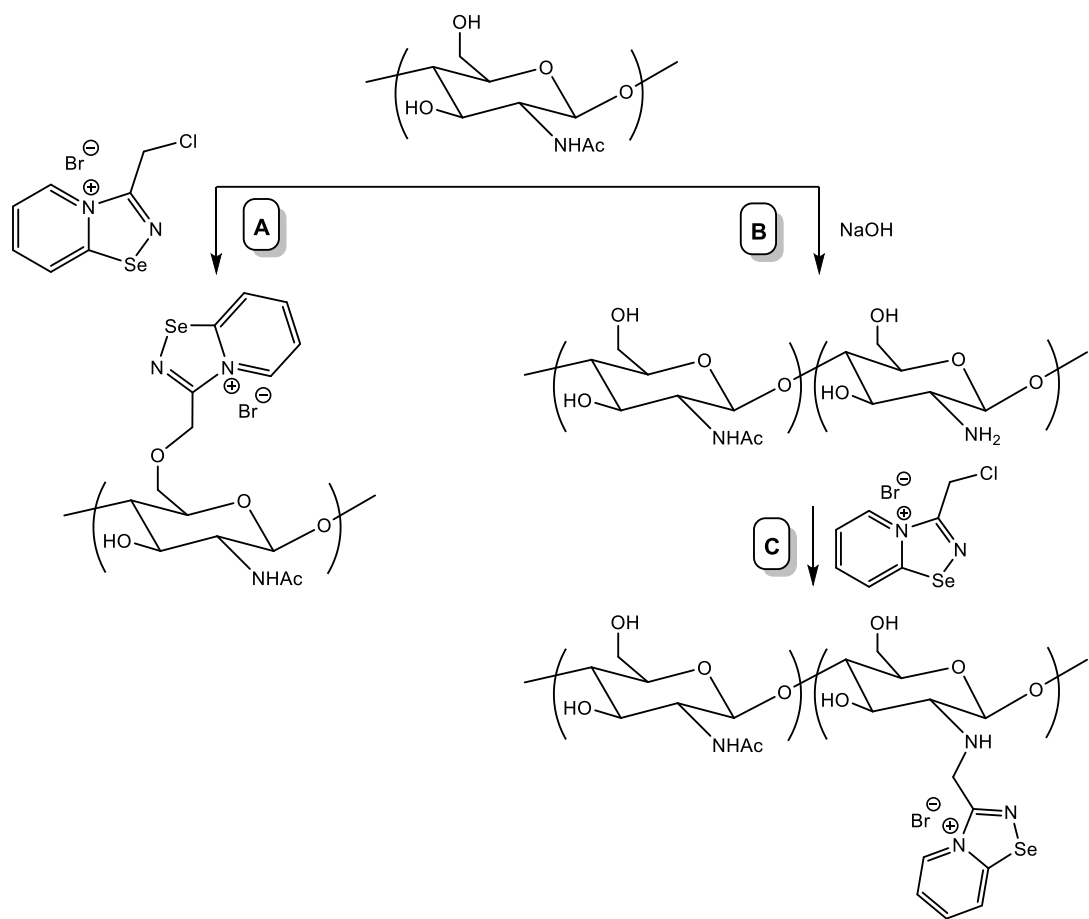


Схема 6. Получение селенсодержащих производных хитина.

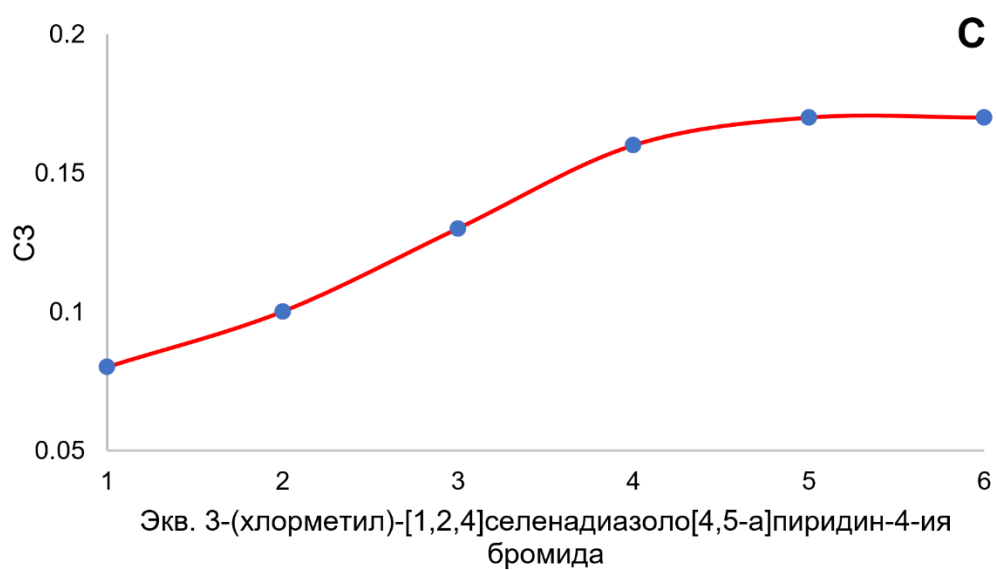
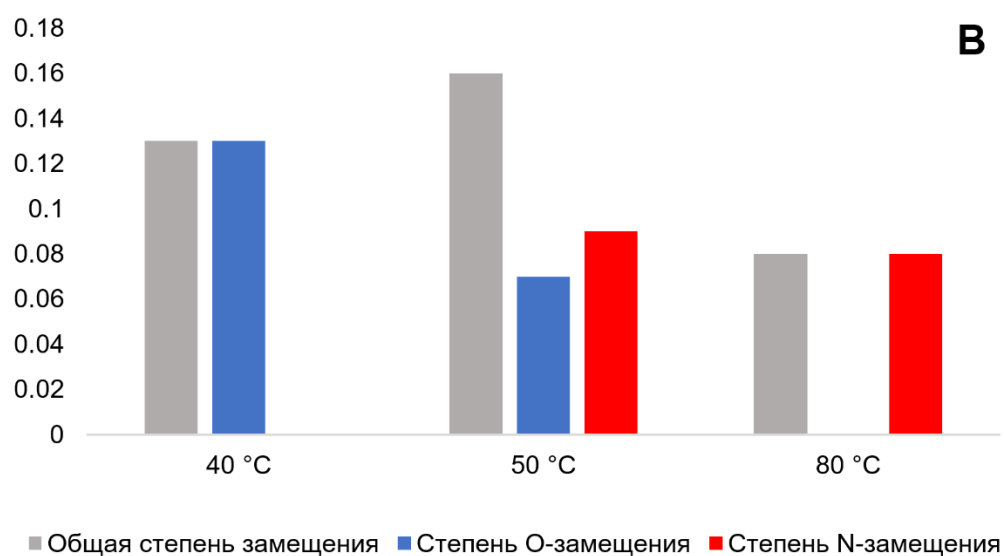
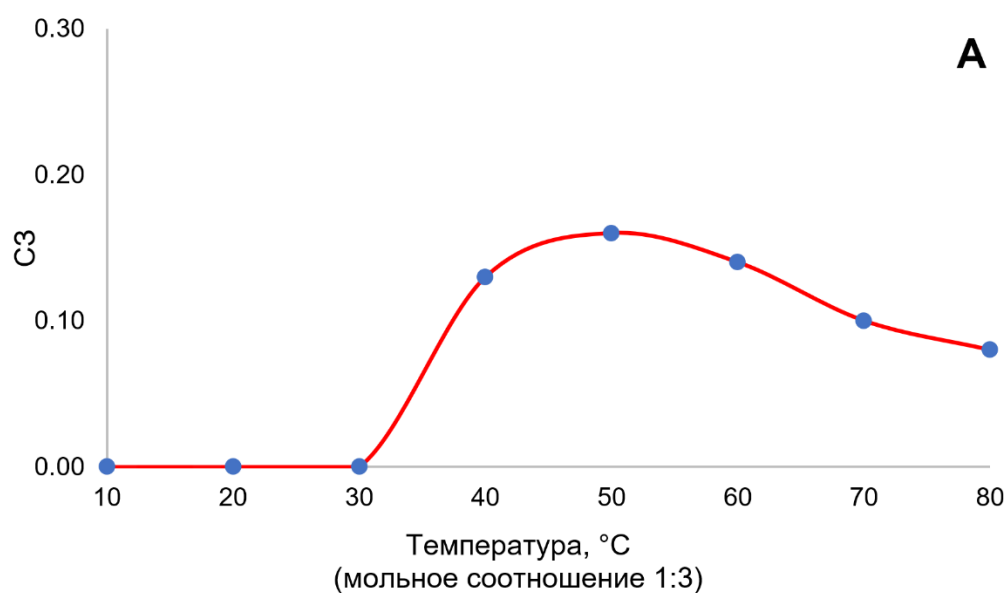


Рис. 4. Влияние различных факторов на степень замещения образующихся полимеров: температуры (**A** и **B**), мольного соотношения реагентов (**C**).

Хитин и 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромид (соотношение 1:3) перемешивались в воде в течение 5 часов в интервале температур от 20 до 80 °С. Во всех случаях обработка не приводила к какой-либо трансформации хитина.

Для активации нуклеофильных свойств хитина в реакциях с алкилгалогенидами обычно используют обработку хитина гидроксидом натрия или калия [41]. Мы пытались использовать данный подход, для чего хитин был обработан бромидом 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия в мольном соотношении 1:3 в 25 % растворе NaOH в интервале температур от 20 до 80 °С (рисунок 4, А). Обработка хитина бромидом 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия в условиях активации NaOH не приводила к образованию каких-либо производных хитина при температуре 20–30 °С. При температуре 40 и 50 °С реакция протекает с образованием низкозамещенных производных хитина (степень замещения 0.13 и 0.16 соответственно). Дальнейшее повышение температуры до 80 °С не вызывало увеличения степени замещения, а наоборот – приводило к образованию менее замещенных полимеров (степень замещения около 0.10). Причина этого факта заключается в резком увеличении скорости побочных реакций при повышении температуры. Мониторинг реакционных смесей методом ЭСИ-МС (масс-спектрометрии высокого разрешения, способ ионизации – электроспрей) выявил образование при 70 и 80 °С широкой смеси селенсодержащих соединений, среди которых был обнаружен катион 3-(гидроксиметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия ($m/z = 214.9716$, $[M]^+$, продукт щелочного гидролиза (хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия).

Обработка хитина 25 % водным раствором NaOH может привести к частичному деацетилированию хитина. Продукт частичного деацетилирования хитина содержит первичные аминогруппы, которые гораздо более реакционноспособны, чем гидроксильные группы. Следовательно, при взаимодействии бромида 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия с хитином в 25 % водном растворе NaOH должны образовываться смешанные *N,O*-

замещенные полимеры. (схема 6, С). Полученные результаты (рисунок 4, В) свидетельствуют о том, что обработка хитина бромидом 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия (3 эквивалента) в 25 % водном растворе NaOH при 40 °С не сопровождается побочным деацетилированием и протекает с образованием только *O*-замещенного производного хитина (степень замещения 0.10). Повышение температуры с 50 до 80 °С приводит к частичному деацетилированию хитина и образованию смешанных *N,O*-замещенных полимеров с увеличением доли *N*-замещения. Степень *N*-замещения и общую степень замещения полученных производных хитина рассчитывали по спектрам ЯМР ¹H. Была проведена серия экспериментов в менее концентрированном NaOH (20 % и 10 %). Однако уменьшение количества NaOH приводит лишь к уменьшению степени замещения образующихся производных хитина.

Также была проведена попытка увеличить степень замещения образующихся производных хитина, используя бóльший избыток бромида 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия (рисунок 4, С). Увеличение мольного соотношения реагентов с 1:1 до 1:5 привело лишь к незначительному увеличению степени замещения с 0.10 до 0.17. Дальнейшее увеличение избытка мольного соотношения не приводило к заметному увеличению степени замещения образующихся полимеров. Таким образом, обработка хитина бромидом 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия в водном растворе гидроксида натрия в традиционных условиях при температуре 40 °С, позволяющая избежать частичного деацетилирования хитина, приводит лишь к образованию низкозамещенных производных.

Хорошо изученное в сонохимии алкилирование спиртов с образованием эфиров является классикой; ультразвуковые условия для этого органического превращения обычно требуют ультразвукового воздействия с частотой 15–150 кГц и мощностью 80–350 Вт [187]. В рамках данной главы диссертации была проведена обработка ультразвуком реакционной смеси хитина с 3 эквивалентами 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромида в воде и обнаружено, что оптимальные акустические условия — 90–100 кГц и 250–300 Вт.

В этих условиях реакция протекает приблизительно за 25 минут с образованием производных хитина со степенью замещения 0.17. Дальнейшее увеличение времени реакции до 35 минут не приводит к заметному увеличению степени замещения.

В литературе имеются лишь единичные примеры, посвященные акустической обработке хитина ультразвуковыми колебаниями. В частности, литературные данные свидетельствуют о том, что ультразвуковая обработка хитина приводит к его частичной деполимеризации и деацетилированию [188, 189]. Однако известны и случаи, когда воздействие ультразвука на суспензию хитина не вызывает деацетилирования или снижения степени полимеризации [52]. Некоторые кажущиеся противоречия в данных об ультразвуковой трансформации хитина свидетельствуют о том, что скорость и исход ультразвуковой трансформации хитина — очень сложный и дискуссионный вопрос, который зависит от многих факторов и должен изучаться в каждом случае индивидуально.

Для оценки возможности ультразвуковой деполимеризации и деацетилирования хитина водную суспензию хитина обрабатывали ультразвуком (90 кГц, 250 Вт, 30 минут). Средневязкостная молекулярная масса хитина, обработанного ультразвуком, была такой же, как у исходного (в пределах погрешности). Кроме того, спектры ЯМР ^1H синтезированных новых производных хитина показали, что степень ацетилирования составляет около 100 %, что указывает на отсутствие деацетилирования хитина в указанных акустических условиях.

Для получения производных хитина с большей степенью замещения был использован избыток бромида 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазола[4,5-а]пиридин-4-ия – 3, 5 и 8 эквивалентов. Таким образом, применяя акустические условия 90 кГц 250 Вт, были синтезированы новые водорастворимые производные хитина с низкой (около 0.17), средней (около 0.40) и высокой (около 0.65) степенью замещения, исходя из хитина низкой, средней и высокой молекулярной массы. Важно отметить, что предложенные протоколы ультразвукового синтеза удачно

вписываются в концепцию «зеленой» химии, поскольку в качестве растворителя был использован самый экологически чистый растворитель – вода.

Сокращенные наименования и степени замещения полученных производных хитина представлены в **таблице 6**. Кодовые названия полученных новых полимеров следует расшифровывать так: **S-CH-I-L**: **S** – селенсодержащее производное, **CH** – хитин, **I** – низкая степень замещения, **L** – используемый хитин низкой молекулярной массы, или **S-CH-III-M**: **S** – селенсодержащее производное, **CH** – хитин, **III** – высокая степень замещения, **M** – умеренная молекулярная масса исходного хитина.

Таблица 6. Степени замещения полученных селенсодержащих производных хитина и молекулярные массы исходных хитинов.

Селенсодержащее производное хитина	Молекулярная масса исходного хитина, Да	Степень замещения производного
S-CH-I-L	3.5×10^4	0.16
S-CH-I-M	7.1×10^4	0.17
S-CH-I-H	17.2×10^4	0.17
S-CH-II-L	3.5×10^4	0.42
S-CH-II-M	7.1×10^4	0.41
S-CH-II-H	17.2×10^4	0.40
S-CH-III-L	3.5×10^4	0.65
S-CH-III-M	7.1×10^4	0.65
S-CH-III-H	17.2×10^4	0.64

Полученные новые производные хитина охарактеризованы методом ЯМР ^1H . Типичный спектр ЯМР ^1H с отнесением сигналов представлен на **рисунке 5**.

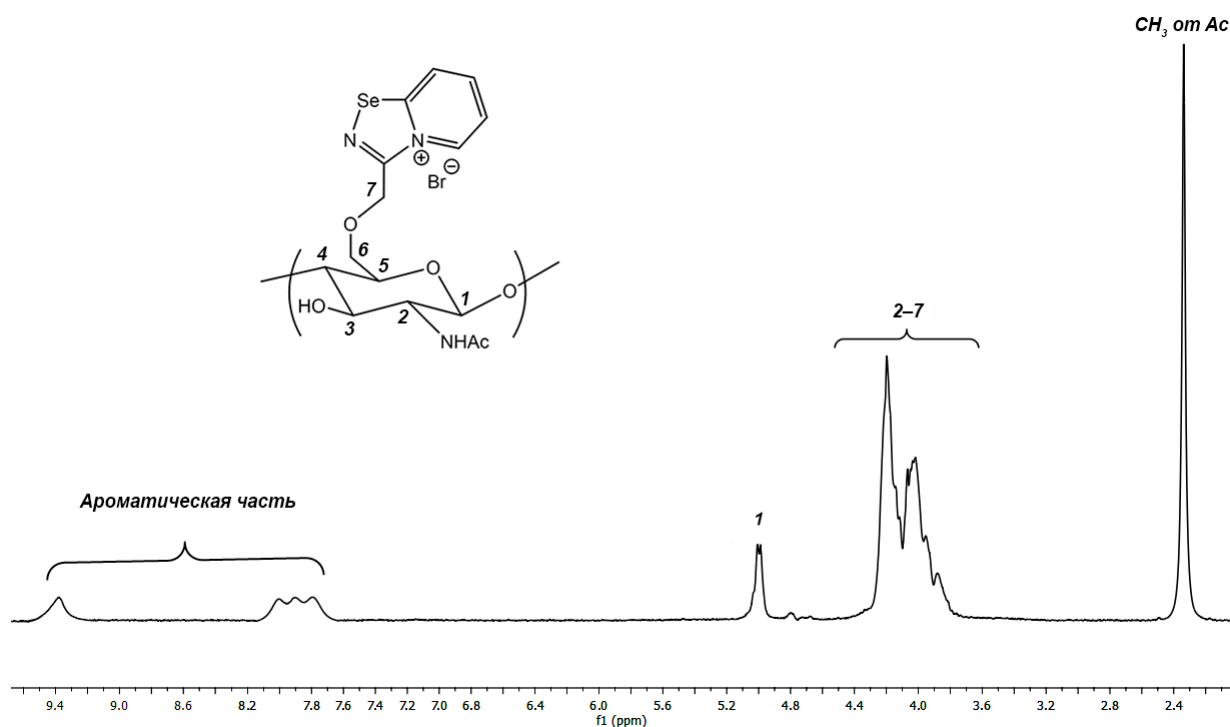


Рис. 5. Спектр ЯМР ^1H селенсодержащего производного хитина.

Особенно стоит отметить, что полученные производные хитина растворимы в воде. До недавнего времени в литературе было описано лишь несколько примеров водорастворимых производных полностью *N*-ацетилированного хитина (тозилхитин (с содержанием тозиллированных звеньев менее 30 %) [190], диэтиламиноэтилхитин [191], гидроксипропилированный хитин [192], 6-дезоксид-6-аминохитин [193], хитинфосфат [194], хитин пропилтриметиламмония [195, 196], сукцинилированный хитин [197], 1-азидо-3-хитинпропан-2-ол [170] и др. [52, 53]).

2.3. Антимикробные свойства селенсодержащих производных хитина и хитозана

Антимикробный эффект хитозана в основном обусловлен его поликатионной природой [198]. Однако противомикробная активность хитозана умеренно выражена, поскольку она ограничена нерастворимостью в воде и низкой катионной плотностью хитозана. Хитин, в свою очередь, обладает существенно меньшей антимикробной активностью, чем хитозан [156, 199]. Эти обстоятельства можно преодолеть химической модификацией хитина и хитозана, особенно путем

получения катионных производных данных полисахаридов. Полученные в рамках данной главы диссертации катионные производные хитозана были протестированы на антимикробную (антибактериальную и противогрибковую) активность *in vitro* (таблица 7). Таблица 7 показывает, что как противогрибковые, так и антибактериальные эффекты характеризуются сходными закономерностями.

Таблица 7. Антимикробная активность селенсодержащих производных хитина и хитозана.

Кодовое наименование испытуемого образца	Бактерии		Грибы	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>G. candidum</i>
	Зона ингибирования, мм*		Зона ингибирования, мм*	
CS-L	13.6±0.2	10.5±0.2	10.8±0.2	8.8±0.1
CS-M	14.3±0.1	11.4±0.3	11.3±0.1	9.7±0.1
CS-H	13.3±0.2	10.1±0.3	10.4±0.2	8.6±0.2
Ампициллин	30.3±0.1	—	—	—
Гентамицин	—	22.2±0.3	—	—
Амфотерицин В	—	—	28.7±0.4	26.4±0.3
В	30.8±0.3	21.4 ± 0.3	28.5±0.3	26.2±0.1
С	30.4 ± 0.1	21.6 ± 0.2	28.8±0.3	26.2±0.2
S-CH-I-L	18.3±0.1	10.3±0.1	16.4±0.2	16.1±0.1
S-CH-I-M	20.4±0.3	12.3±0.2	28.1±0.2	18.2±0.2
S-CH-I-H	17.5±0.4	10.2±0.2	16.5±0.2	15.3±0.2
S-CH-II-L	24.3±0.2	15.6±0.3	19.4±0.4	18.2±0.2
S-CH-II-M	26.7±0.2	17.5±0.1	23.1±0.1	23.2±0.1
S-CH-II-H	27.6±0.1	15.2±0.4	18.1±0.1	17.6±0.4
S-CH-III-L	33.3±0.3	24.2±0.1	23.1±0.3	22.7±0.1
S-CH-III-M	34.2±0.5	26.3±0.1	29.1±0.3	27.3±0.1
S-CH-III-H	32.1±0.2	23.1±0.1	22.8±0.1	21.9±0.3

S-CS-I-L	18.2±0.1	10.1±0.3	16.2±0.3	16.0±0.2
S-CS-I-M	20.6±0.1	12.4±0.3	28.1±0.1	18.2±0.1
S-CS-I-H	17.4±0.2	10.3±0.1	16.5±0.3	15.5±0.4
S-CS-II-L	24.3±0.3	15.2±0.3	19.5±0.1	18.4±0.3
S-CS-II-M	26.8±0.3	17.6±0.2	23.1±0.2	23.2±0.1
S-CS-II-H	27.4±0.2	15.0±0.1	18.1±0.3	17.4±0.1
S-CS-III-L	33.2±0.2	24.3±0.2	23.3±0.1	22.5±0.2
S-CS-III-M	34.4±0.2	26.3±0.2	29.3±0.1	27.4±0.3
S-CS-III-H	32.3±0.3	23.3±0.1	22.8±0.1	21.7±0.2
NP-CS-1	39.4±0.1	31.5±0.2	32.2±0.2	31.8±0.1
NP-CS-2	37.1±0.3	29.3±0.1	30.9±0.1	30.6±0.2
NP-CS-3	34.8±0.2	26.9±0.4	28.9±0.3	27.7±0.3
NP-CS-4	35.3±0.1	27.8±0.1	29.4±0.1	28.5±0.2
NP-CS-5	36.2±0.3	28.6±0.2	30.3±0.2	29.8±0.1
NP-CH-1	39.8±0.2	31.4±0.1	32.1±0.4	31.5±0.2
NP-CH-2	36.7±0.1	29.1±0.3	31.2±0.3	30.6±0.3
NP-CH-3	34.9±0.1	26.2±0.2	28.9±0.1	27.4±0.3
NP-CH-4	35.1±0.2	27.5±0.2	29.6±0.2	28.3±0.1
NP-CH-5	36.3±0.2	28.3±0.1	30.2±0.1	29.6±0.1

* Среднее значение ± стандартное отклонение, n=3

Антибактериальная активность селенсодержащих производных как хитина, так и хитозана выражено зависит от степени замещения полимеров. Активность производных возрастает с увеличением степени их замещения. Этот факт можно объяснить увеличением катионной плотности полимеров с ростом степени замещения. Полимеры с более высокой катионной плотностью в большей степени способны повреждать мембраны микробных клеток, провоцируя гибель микроорганизмов [200].

Антимикробная активность производных хитозана практически не отличается от антимикробного действия соответствующих производных хитина.

Вероятно антибактериальное действие исследуемых полимеров определяется [1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-иевым заместителем **A**, введенным в основную цепь полимера. В связи с этим было проведено сравнение антимикробного эффекта двух органических соединений **B** и **C**, которым соответствует введенный в полисахаридную цепь [1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ий фрагмент (**рисунок 6**). Активность **B** и **C** высока и сравнима с активностью антибиотиков ампициллина, гентамицина и амфотерицина В. Однако активность высокозамещенных полимеров несколько превосходит действие **B** и **C**. Следовательно, полимерная цепь также вносит свой вклад в эффективность антимикробного действия. По-видимому, это связано с тем, что полимер способен принимать конформацию, обеспечивающую его более сильное связывание с мембраной микробной клетки по сравнению с низкомолекулярным соединением и, следовательно, приводящее к более выраженной дисфункции клеточной мембраны клетки.

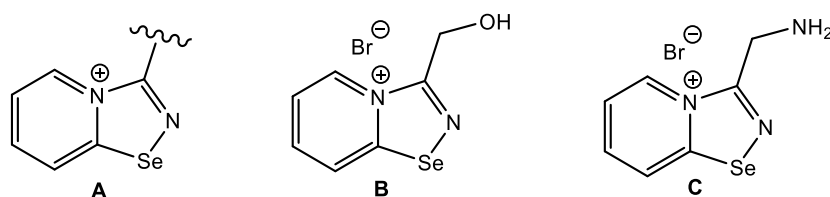


Рис. 6. [1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-иевый фрагмент (**A**) и его синтетические аналоги (**B** и **C**).

В этом контексте особо важной представляется экологическая составляющая полученных результатов. С фармакологической точки зрения полученные антибактериальные системы на основе хитина и на основе хитозана представляются одинаковыми, т.к. абсолютно в равной степени характеризуются высоким антибактериальным эффектом в сочетании с низкой токсичностью. Однако с экологической точки зрения системы на основе хитина обладают несопоставимо большим преимуществом. Это связано с тем, что получение хитозана включает стадию деацетилирования хитина, которая проводится под действием экологически опасных реагентов – щелочей (как правило, гидроксида

натрия) [201]. Прямое использование хитина для получения высокоактивных нетоксичных антибактериальных систем позволяет избежать стадии деацетилирования, что значительно снижает экологическую нагрузку и соответствует принципам зеленой химии.

Антимикробная активность тестируемых производных слабо зависит от их молекулярной массы, хотя производные средней молекулярной массы характеризуются несколько более высокой активностью по сравнению с другими, что согласуется с данными, полученными нашей научной группой [110, 170, 202, 203].

Таким образом, наиболее эффективными антимикробными полимерами оказались **S-CH-III-M** и **S-CS-III-M**. Зоны ингибирования и минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для наиболее эффективных полимеров и эталонных антибиотиков следующие. Для **S-CH-III-M**: 34.2±0.5 мм и 0.14 мкг/мл (*S. aureus*), 26.3±0.1 мм и 0.19 мкг/мл (*E. coli*), 29.1±0.3 мм и 0.50 мкг/мл (*A. fumigatus*) 27.3±0.1 мм и 0.11 мкг/мл (*G. candidum*), для **S-CS-III-M** эти значения составили 34.4±0.2 мм и 0.15 мкг/мл (*S. aureus*), 26.3±0.2 мм и 0.20 мкг/мл (*E. coli*), 29.3±0.1 мм и 0.50 мкг/мл (*A. fumigatus*), 27.4±0.3 мм и 0.10 мкг/мл (*G. candidum*). Для референтных антибиотиков: ампициллин – 30.3±0.1 мм и 0.18 мкг/мл (*S. aureus*), гентамицин – 22.2±0.3 мм и 0.23 мкг/мл (*E. coli*), амфотерицин В – 28.7±0.4 мм 0.53 (*A. fumigatus*), 26.4±0.3 мм и 0.10 (*G. candidum*).

2.4. Получение наночастиц на основе селенсодержащих производных хитина и хитозана и их антимикробные свойства

Во многих случаях наночастицы на основе производных хитозана и других полимеров характеризуются более выраженными биологическими свойствами по сравнению с исходными полимерами в нативной форме [204]. Более того, на биологические свойства наночастиц сильно влияет их морфология, ζ-потенциал и размер [205]. Таким образом, в рамках данной главы диссертации были получены наночастицы на основе наиболее активных синтезированных селенсодержащих

производных хитина и хитозана (**S-CS-III-M** и **S-CH-III-M**) с различными гидродинамическим диаметром и величиной ζ -потенциала. Наночастицы получали с использованием классического метода ионного гелеобразования триполифосфатом натрия [206]. Характеристики полученных наночастиц представлены в **таблице 8**. Объем используемого раствора триполифосфата натрия также представлен в **таблице 8**.

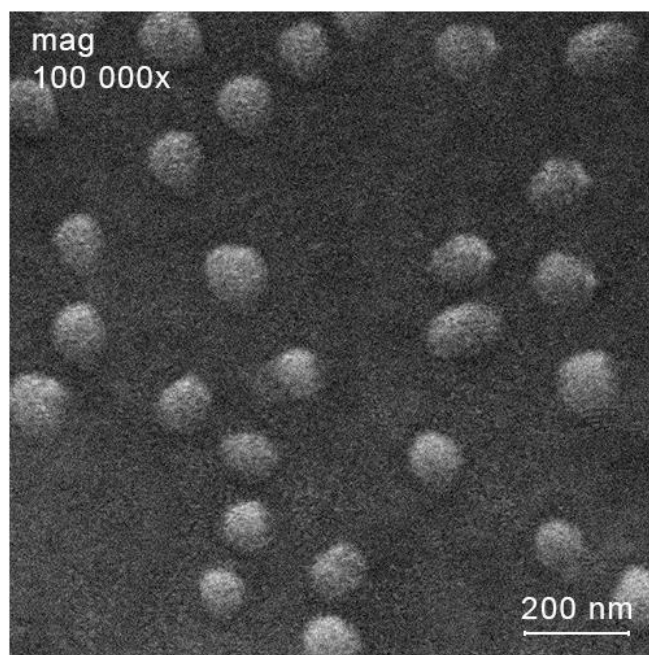
Таблица 8. Характеристики наночастиц.

Тип наночастиц*	Гидродинамический диаметр, нм**	V(TPP), мл	Индекс полидисперсности**	ζ -потенциал, мВ**
NP-CS-1	101±5	1.00	0.19±0.03	62.4±0.1
NP-CS-2	202±3	1.35	0.15±0.03	55.1±0.1
NP-CS-3	315±3	1.60	0.18±0.05	35.2±0.3
NP-CS-4	512±2	1.95	0.17±0.03	51.2±0.3
NP-CS-5	804±7	2.85	0.26±0.04	60.7±0.1
NP-CH-1	108±4	1.00	0.11±0.03	63.2±0.4
NP-CH-2	212±2	1.35	0.12±0.02	54.5±0.2
NP-CH-3	303±3	1.60	0.14±0.05	36.1±0.1
NP-CH-4	511±8	1.95	0.25±0.02	52.5±0.1
NP-CH-5	806±2	2.85	0.17±0.02	61.4±0.5

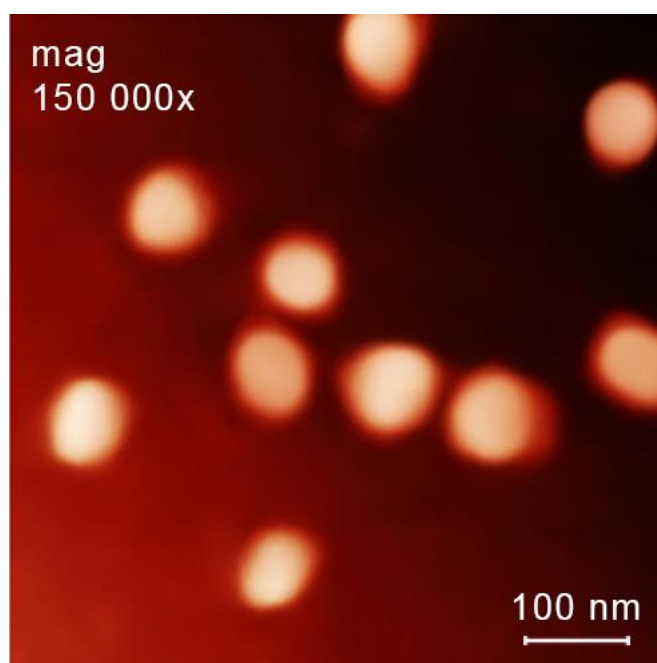
* **NP-CS** – наночастицы, полученные из хитозана; **NP-CH** – наночастицы на основе хитина.

** Среднее значение ± стандартное отклонение, n=3

При использовании раствора триполифосфата натрия объемом менее 1 мл или более 2.85 мл не удалось получить удовлетворительные наночастицы с унимодальным распределением по размерам. Примеры изображений СЭМ и АСМ полученных наночастиц представлены на **рисунке 7**.



A



B

Рис. 7. СЭМ (A) и АСМ (B) изображения наночастиц **NP-CS-1**.

Приготовленные наночастицы тестировали на противомикробный эффект с использованием того же экспериментального протокола, что и для соответствующих полимеров **S-CH-III-M** и **S-CS-III-M**. Антимикробная активность испытанных наночастиц в целом превышает активность исходных полимеров и характеризуется ярко выраженной зависимостью как от

гидродинамического диаметра, так и от ξ -потенциала (**таблицу 7 и 8**). Наиболее активные наночастицы имеют наименьший гидродинамический диаметр (около 100 нм) и высокий положительный ξ -потенциал (около +60 мВ). Этот факт можно интерпретировать, предполагая, что наночастицы наименьшего размера могут легко проникать в бактериальную клетку и благодаря своему высокому положительному ξ -потенциалу более эффективно связываться с ДНК [180]. Наименьший антимикробный эффект выявлен у наночастиц с наименьшим значением ξ -потенциала. Более того, в соответствии с данными в **таблице 7** – антимикробная активность полученных наночастиц не зависит от природы исходного полимера (производное хитина или хитозана). Таким образом, ключевыми факторами, влияющими на антимикробный эффект наночастиц, являются гидродинамический диаметр, ξ -потенциал и наличие селенсодержащего гетероциклического антимикробного фармакофора.

В целом антибактериальная активность полученных производных хитина и хитозана, а также наночастиц на их основе чрезвычайно высока по сравнению с ранее описанными в литературе (подробно обсуждающиеся в недавних обзорах [101, 207, 208]).

2.5. Токсичность селенсодержащих производных хитина и хитозана и наночастиц на их основе

Неоспоримым преимуществом природных полисахаридов, таких как хитин и хитозан, является низкая токсичность. Однако токсичность химически модифицированных хитина и хитозана в ряде случаев может быть выше, чем у исходных природных полисахаридов [209]. В текущем исследовании была проведена оценка токсичности *in vitro* синтезированных производных хитина и хитозана, а также наночастиц на их основе с помощью МТТ-теста (**таблица 9**).

Таблица 9. Токсичность полученных полимеров и наночастиц на их основе.

Образец	Жизнеспособность клеток (%) при	Жизнеспособность клеток (%) при	Жизнеспособность клеток (%) при

	концентрации образца 10 мкг/мл	концентрации образца 300 мкг/мл	концентрации образца 1000 мкг/мл
В	43	28	16
С	43	29	15
Хитозан	100	96	65
S-CH-I-L	98	94	62
S-CH-I-M	99	91	63
S-CH-I-H	99	93	62
S-CH-II-L	97	92	63
S-CH-II-M	99	92	63
S-CH-II-H	98	93	61
S-CH-III-L	99	93	64
S-CH-III-M	98	91	63
S-CH-III-H	99	93	62
S-CS-I-L	100	96	64
S-CS-I-M	97	93	64
S-CS-I-H	99	93	63
S-CS-II-L	97	91	62
S-CS-II-M	98	93	63
S-CS-II-H	98	93	64
S-CS-III-L	97	92	62
S-CS-III-M	98	92	62
S-CS-III-H	96	93	63
NP-CS-1	97	92	61
NP-CS-2	98	92	62
NP-CS-3	98	92	62
NP-CS-4	98	93	63
NP-CS-5	98	93	62

NP-CH-1	97	92	63
NP-CH-2	98	93	62
NP-CH-3	97	93	63
NP-CH-4	98	93	63
NP-CH-5	99	93	62

Обнаружено, что при концентрациях менее 300 мкг/мл полученные полимеры, также как и исходный хитозан характеризовались практическим отсутствием токсичности (жизнеспособность клеток во всех случаях составляла около 100 %). При дальнейшем увеличении концентрации высокозамещенные производные проявляли более высокую токсичность, чем низкозамещенные. Токсичность *in vitro* полученных наночастиц практически не отличается от токсичности соответствующих полимеров. Также важно отметить, что соединения **В** и **С**, соответствующие введенному в полимерную цепь фармакофору, характеризуются достаточно высокой токсичностью (жизнеспособность клеток составляет около 40 % и около 30 % при концентрациях 100 мкг/мл и 300 мкг/мл, соответственно). Следовательно, конъюгация селенсодержащего гетероциклического антибактериального фармакофора с хитозановой матрицей резко снижает его токсичность без снижения антибактериального эффекта.

2.6. Каталитические исследования селенсодержащих производных хитина и хитозана, а также наночастиц на их основе

В литературе представлены сведения об окислении вторичных спиртов до соответствующих карбонильных соединений (т.е. кетонов) различными окислителями (кислород, *N*-бромсукцинимид, трихлоризоциануровая кислота, оксон и т.д.) с использованием различных катализаторов, таких как йодозобензол и его многочисленные производные, 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксиданил, тиомочевина, 2-йодоксибензолсульфокислота и др. [210]. Без подходящего катализатора эти реакции характеризуются низкой скоростью или даже невозможны. Однако йодозобензол, производные пиридина, сульфокислоты

являются токсичными катализаторами, что вступает в противоречие с экологическими принципами зеленой химии.

Хотя галогены и являются достаточно сильными окислителями для окисления вторичных спиртов до соответствующих кетонов, эти реакции окисления обычно неселективны и сопровождаются образованием многочисленных побочных продуктов [211]. Например, 1-фенилэтиловый спирт не окисляется бромом при комнатной температуре. Однако добавление катализатора делает эту реакцию не только возможной, но и быстрой. В частности, недавно сообщалось о первом и пока единственном селенсодержащем органическом катализаторе (изоселеназолоне), катализирующем окисление вторичных спиртов в кетоны [212]. Добавление 10 мол. % изоселеназолонa приводило к селективному окислению 1-фенилэтилового спирта до ацетофенона при комнатной температуре.

В рамках данного раздела диссертации была проведена оценка каталитической активности свободного [1,2,4]селенадиазола[4,5-а]пиридин-4-ия бромида, его нетоксичных (что важно для экологии) производных хитина и хитозана, а также наночастиц на их основе в модельной реакции окисления 1-фенилэтилового спирта в ацетофенон бромом при комнатной температуре (схема 7).

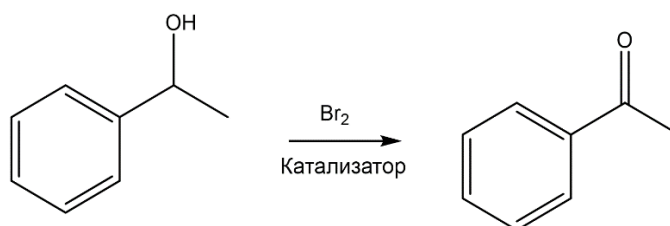


Схема 7. Модельная реакция окисления.

Таблица 10. Результаты каталитических экспериментов.

Эксперимент	Катализатор	Растворитель	Отделенный выход, %
1	В	H ₂ O	0
2	С	H ₂ O	0

3	В	MeCN	17
4	С	MeCN	15
5	В	Me ₂ CO	84
6	С	Me ₂ CO	93
7	Хитозан или Хитин	H ₂ O	0
8	Хитозан или Хитин	MeCN	0
9	Хитозан или Хитин	Me ₂ CO	0
10	S-CS-III-M	H ₂ O	0
11	S-CS-III-M	MeCN	0
12	S-CS-III-M	Me ₂ CO	10
13	S-CH-III-M	H ₂ O	0
14	S-CH-III-M	MeCN	0
15	S-CH-III-M	Me ₂ CO	3
16	NP-CS-1	H ₂ O	0
17	NP-CS-1	MeCN	23
18	NP-CS-1	Me ₂ CO	96
19	NP-CS-2	Me ₂ CO	95
20	NP-CS-3	Me ₂ CO	75
21	NP-CS-4	Me ₂ CO	53
22	NP-CS-5	Me ₂ CO	22
23	NP-CH-1	Me ₂ CO	50
24	NP-CH-2	Me ₂ CO	53
25	NP-CH-3	Me ₂ CO	33
26	NP-CH-4	Me ₂ CO	28
27	NP-CH-5	Me ₂ CO	15

Результаты каталитических экспериментов представлены в **таблице 10**. [1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-иевые гетероциклы **В** и **С** характеризуются высокой каталитической активностью в модельной реакции, когда последние протекают в ацетоне как растворителе (**таблица 10, эксперименты 5, 6**). Ацетонитрил и особенно вода оказались неподходящими растворителями для каталитической реакции (**таблица 10, эксперименты 1–4**). Исходные хитозан или хитин не проявляли каталитической активности в изучаемой реакции ни в одном из использованных растворителей (**таблица 10, эксперименты 7–9**). Интересно отметить, что селенсодержащее производное хитозана **S-CS-III-M** продемонстрировало хотя и низкий, но значительно больший каталитический эффект, чем соответствующее производное хитина **S-CH-III-M** (**таблица 10, эксперименты 12, 15**). Более того, наночастицы, полученные из хитозана, также продемонстрировали значительно более высокую каталитическую активность (**таблица 10, эксперименты 18–22**) по сравнению с соответствующими производными хитина (**таблица 10, эксперименты 23–27**).

В целом каталитический эффект тестируемых наночастиц сильно зависит от их гидродинамического диаметра. Наиболее эффективные наночастицы имеют малый размер (около 100–200 нм), а по мере увеличения гидродинамического диаметра наночастиц их каталитическая активность резко снижается. Повышенная каталитическая активность малых наночастиц объясняется увеличением их суммарной площади поверхности по сравнению с более крупными наночастицами (в данном случае это важно, поскольку катализ наночастицами является частным случаем гетерогенного катализа). Так, наилучший каталитический эффект проявили наночастицы на основе производных хитозана **NP-CS-1** и **NP-CS-2**. Эти наночастицы обладают каталитической активностью, аналогичной [1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-иевым гетероциклам **В** и **С**. Однако использование наночастиц гораздо удобнее в препаративном плане, так как (i) они удаляются из реакционной смеси простым центрифугированием; (ii) выделение продукта не требует хроматографии; (iii) после промывки ацетоном наночастицы

можно использовать повторно не менее 10 раз без потери каталитической активности.

При катализе исследуемой каталитической реакции [1,2,4]селенадiazоло[4,5-а]пиридин-4-ий гетероциклом **C** под контролем ЭСИ-МС удалось обнаружить аддукт брома к **C** ($m/z = 373.8221$, $[M]^+$). На основании этого вывода и литературных данных [212] был предположен вероятный механизм каталитического цикла (схема 8).

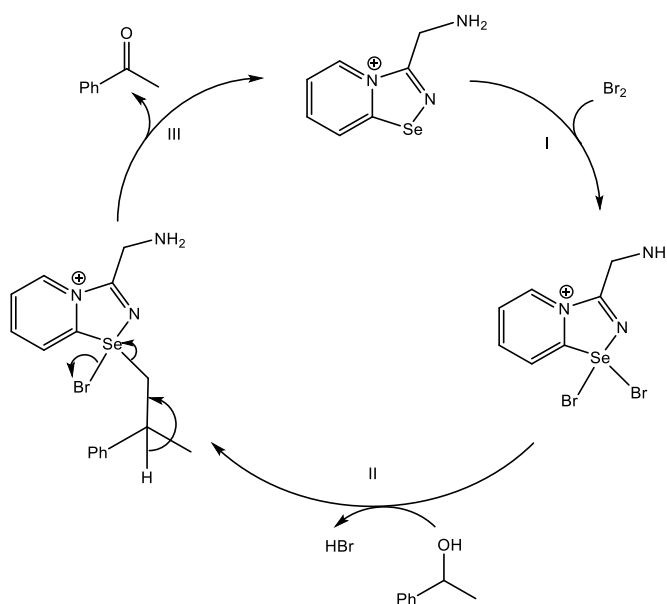


Схема 8. Вероятный механизм катализируемого окисления.

Предлагаемый механизм также согласуется с данными о том, что **C** и производные хитозана являются более эффективными катализаторами, чем **B** и соответствующие производные хитина (таблица 10). По-видимому, это связано с тем, что соединения **B** и хитозаны благодаря своим аминогруппам могут действовать как акцепторы протонов на стадии II (схема 8), тем самым ускоряя протекание стадии II.

Важный экологический аспект полученных результатов заключается в следующем. Полученные высокоэффективные селенохитозановые каталитические системы **NP-CS-1** и **NP-CS-2** характеризуются высоким каталитическим эффектом в ацетоне, в то время как подобные им описанные в литературе изоселеназолоновые гетероциклы проявляют высокую каталитическую активность

в дихлорметане [213], в ацетоне же их активность низка. Получение **NP-CS-1** и **NP-CS-2** позволило заменить токсичный хлорорганический растворитель дихлорметан (ПДК 50 мг/м³) на значительно менее токсичный ацетон (ПДК 200 мг/м³). Возможность многократного использования полученных высокоактивных катализаторов, удобство работы с ними и их нетоксичность позволяет рассматривать их как зеленые катализаторы.

2.7. Заключение к главе 2

Результаты, полученные в рамках данной главы диссертации, можно суммировать следующим образом.

Во-первых, были найдены оптимальные акустические условия (80–90 кГц, 250 Вт) для ультразвукового синтеза селенсодержащих производных хитина и хитозана при их обработке 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромидом. Реакция протекает в самом экологически чистом растворителе – в воде в мягких условиях без побочной деполимеризации, селективно по *N*-нуклеофильному реакционному центру. Эти результаты позволили разработать методики зеленого ультразвукового синтеза нетоксичных селенсодержащих производных хитина и хитозана, реализующие экологические принципы зеленой химии (в частности, четвертый, пятый, шестой и восьмой). Полученные селенсодержащие полимеры являются водорастворимыми.

Во-вторых, обнаружена высокая антибактериальная и противогрибковая активность полученных селенсодержащих производных хитина и хитозана, а также наночастиц на их основе. Противомикробная активность полученных селенсодержащих систем превосходит действие классических антибиотиков (ампициллина и гентамицина) и противогрибкового препарата амфотерицина В. Кроме того, разработанные противомикробные системы на основе хитина и хитозана практически нетоксичны. Полученные результаты являются одними из лучших в литературе и имеют потенциал для дальнейших исследований *in vivo*, как альтернативы антибиотикам. Этот результат является крайне важным в свете экологической проблемы загрязнения окружающей среды антибиотиками.

В-третьих, наночастицы селенсодержащих производных хитозана оказались высокоэффективными катализаторами окисления 1-фенилэтилового спирта в ацетофенон бромом при комнатной температуре. В связи с этим полученные в рамках данной главы диссертации селенсодержащие производные хитозана представляют несомненный интерес для дальнейших исследований в качестве органокатализаторов. Низкая токсичность разработанных каталитических систем, их рециклизуемость и удобство работы с ними позволяет отнести их к зеленым катализаторам. Особо следует отметить, что полученные катализаторы активны в ацетоне, в то время как подобные им описанные в литературе изоселеназолонны практически не функционируют в ацетоне и проявляют каталитическую активность в дихлорметане. Получение описанных в данной главе зеленых катализаторов позволило заменить токсичный дихлорметан (ПДК 50 мг/м³) на значительно менее токсичный ацетон (ПДК 200 мг/м³), что, несомненно, актуально для экологии и зеленой химии.

Глава 3. Получение новых конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан и наночастиц на их основе

В главе 1 был сделан акцент на важную экологическую проблему, обусловленную загрязнением окружающей среды антибиотиками. Данная проблема требует детальнейшей и срочной проработки решений, поскольку человечеству никуда не убежать от антибиотиков. Почему? Дело в том, что согласно данным ВОЗ, инфекционные заболевания являются одной из лидирующих причин смертности населения [214]. Этиотропная терапия бактериальных инфекционных заболеваний направлена главным образом на уничтожение инфекционных агентов. Среди большого разнообразия антибактериальных препаратов чрезвычайно эффективны фторхинолоновые антибиотики, которые зачастую являются единственным лекарственным средством, способным спасти жизнь больного [215]. Важной проблемой при применении фторхинолонов, как и других антибиотиков, является их системная токсичность [216] и достаточно быстрое выведение [217, 218]. Кроме того, именно фторхинолоны представляют наибольшую экологическую опасность, именно они обнаруживаются в сточных водах медицинских учреждениях в наибольших количествах. Эти проблемы могут быть решены конъюгацией лекарственного средства с полимерной матрицей или инкапсуляцией в наночастицы, поскольку данные подходы позволяют значительно снизить дозировку фторхинолонов и иных антибиотиков [219-221].

В главе 1 подчеркивалась перспективность химических решений обозначенной экологической проблема путем использования хитозана в качестве носителя лекарственных препаратов для создания систем пролонгированного высвобождения. Наночастицы на основе хитозана привлекают внимание исследователей при разработке создания систем пролонгированного высвобождения лекарств. Однако нам не удалось в литературе обнаружить ни одного примера, когда бы в одном исследовании в одинаковых условиях проводилось сравнение эффективности различных, но родственных систем

продолженного высвобождения фторхинолонов – например, (1) *прямых конъюгатов фторхинолонов с хитозановой макромолекулой*, (2) *конъюгатов, в которых фторхинолон соединен с хитозановой цепью через рН-чувствительный спейсер*, (3) *самособирающихся наночастиц*, (4) *наночастиц, полученных ионным гелированием* с последующим изучением их активности как *in vitro*, так и *in vivo*. Тем не менее, что подобные исследования имеют крайне важное фундаментальное значение, особенно для выявления общности и специфики так называемых отношений «структура–активность».

В литературе по данной теме описаны лишь наночастицы хитозана или его производных, содержащие фторхинолоны, полученные методом ионного гелеобразования [222-224]. Конъюгаты фторхинолонов с хитозаном не описаны. Кроме того, в литературе не описаны амфифильные самособирающиеся наночастицы, загруженные фторхинолоном, а такие системы также представляют высокий интерес в качестве систем адресной доставки и контролируемого высвобождения.

В рамках данной главы диссертации (см. **схему 9**) были сделаны предположения, что введение в полимерную цепь хитозана достаточно гидрофобного фторхинолона (т.е. ципрофлоксацина) может приводить к образованию конъюгатов фторхинолона (1), способных к самосборке в амфифильные наночастицы (2); и эти наночастицы 2 могут быть дополнительно загружены фторхинолоном (3). Конъюгаты типа (1), не способные к самосборке, могут быть преобразованы в наночастицы, загруженные фторхинолоном (4), путем ионного гелеобразования. Кроме того, были проведены попытки получить конъюгаты фторхинолонов, в которых фторхинолон связан с хитозаном через рН-чувствительный спейсер (5), предполагая, что такие системы способны высвобождать фторхинолон при слегка подкисленных значениях рН, характерных для воспалительного процесса бактериальной этиологии [225]. Кроме того, конъюгаты со спейсером (5) также могут быть дополнительно преобразованы в загруженные фторхинолонами наночастицы путем ионотропного гелеобразования (6).

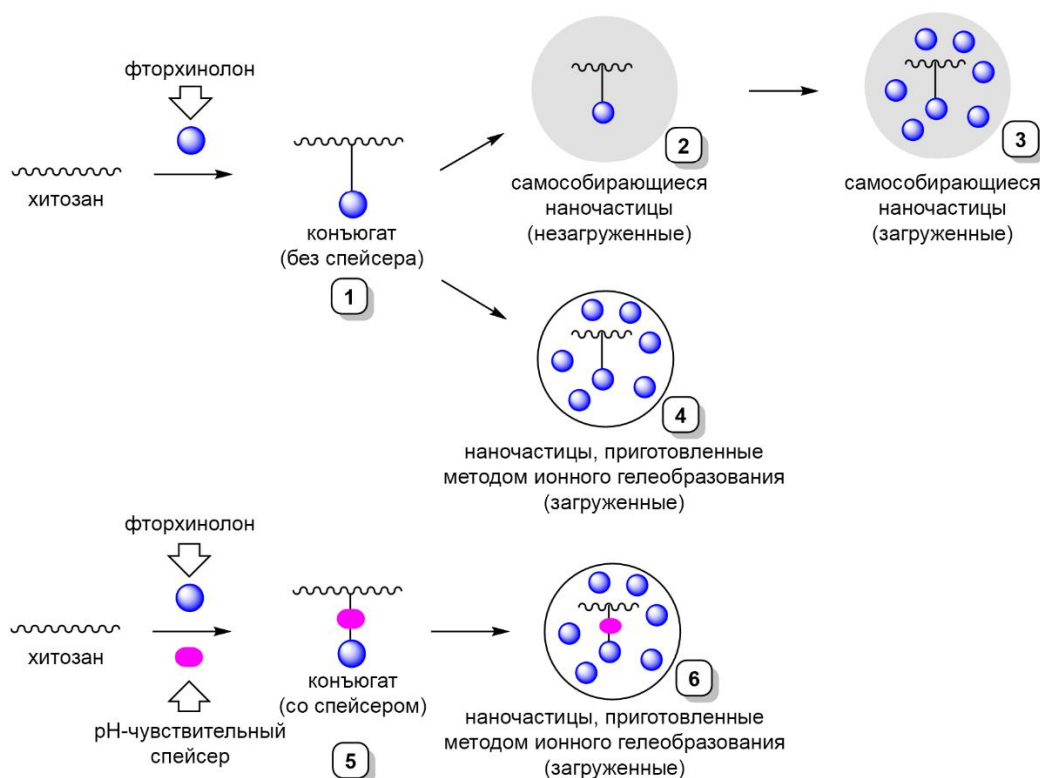


Схема 9. Общий план приготовления антибактериальных систем на основе фторхинолонов.

На основании профиля высвобождения приготовленных систем была поставлена задача определить ведущую систему на основе фторхинолонов и изучить ее антибактериальный эффект как *in vitro*, так и *in vivo*. Следует отметить, что описанные в литературе системы на основе фторхинолонов и хитозана исследовались только *in vitro*. Результаты разработки предложенной гипотезы представлены в следующих ниже разделах.

3.1. Синтез конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан, в которых ципрофлоксацин непосредственно присоединен к полимерной цепи (схема 9, система 1)

Молекула ципрофлоксацина благодаря своей карбоксильной группе $COOH$ может быть конъюгирована с первичной аминогруппой хитозана NH_2 . Для образования амидной связи путем взаимодействия карбоксильных и первичных аминогрупп успешно применяется традиционный карбодимидный метод [226]. В этом методе используется доступный и дешевый карбодимид ДЦК (N,N' -

дициклогексилкарбодиимид). Однако нерастворимость ДЦК в водной среде сильно ограничивает его применение в химии хитозана. Поскольку основным растворителем для хитозана является вода (причём в области кислых значений pH), при конъюгации хитозана с карбоновыми кислотами отдаётся предпочтение водорастворимому карбодиимиду 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (ЭДК) [226]. Применение ЭДК приводит к значительно более высокой конверсии аминогрупп в соответствующие амидные связи, поскольку реакция протекает в гомогенном режиме. Однако следует отметить, что ЭДК намного дороже, чем ДЦК.

В предыдущих главах неоднократно упоминалось о том, что ультразвуковое облучение способно интенсифицировать ряд гетерогенных органических превращений хитина и хитозана: ультразвуковое воздействие приводит к резкому сокращению времени реакции и необходимого количества реагента, а также к увеличению степени конверсии (по сравнению с традиционными условиями протекания реакций, т.е. без действия ультразвука) [110, 160, 181, 227]. Также выше неоднократно подчеркивалось, что в ряде случаев возможно выявить такие акустические условия, которые способствуют желаемой реакции, не вызывая ультразвуковой деградации хитозановой цепи [170, 180, 182]. В рамках данной главы диссертации была проведена попытка интенсифицировать ДЦК-опосредованную конъюгацию ципрофлоксацина с хитозаном под действием ультразвука.

На первом этапе была проведена оптимизация акустических условий для модельной ДЦК-опосредованной реакции ципрофлоксацина с *n*-бутиламином в воде (схема 10).

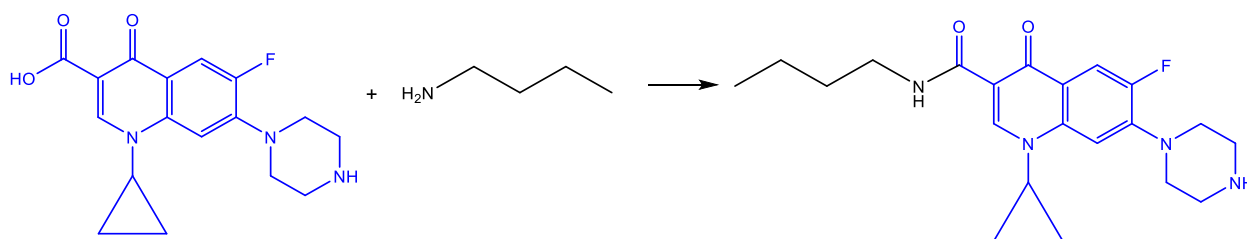


Схема 10. Модель ДЦК-опосредованной реакции.

Установлено, что оптимальные условия для протекания модельной реакции находятся в диапазоне частот 90–110 кГц и выходной мощности 270–290 Вт. В этих условиях реакция завершается за 20 минут (контроль ТСХ) с образованием амида с препаративным выходом 90 %. Применение более жестких акустических условий делает реакцию неселективной (9 новых пятен на ТСХ). При более низких значениях частоты и мощности реакция протекает медленно, сопровождаясь меньшим выходом продукта.

В ходе экспериментов было установлено, что ультразвуковая обработка хитозана (частота 80–100 кГц, а мощность 250–300 Вт) в течение 15–20 минут не вызывает деполимеризации хитозановой цепи. Таким образом, перенося условия модельной реакции на реакцию с участием хитозана, было решено использовать в качестве акустических параметров частоту 100 кГц и мощность 280 Вт. Опосредованную ДЦК реакцию хитозана с ципрофлоксацином (**схема 11**) изучали как в традиционном, так и в ультразвуковом режиме.

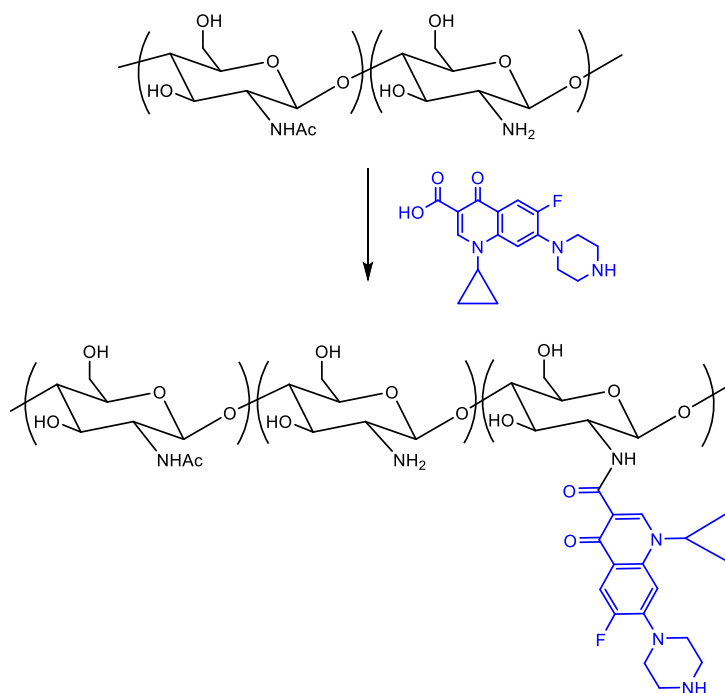


Схема 11. Конъюгация ципрофлоксацина с хитозаном.

Далее было определено необходимое количество ципрофлоксацина для достижения одинаковой степени замещения (0.05, 0.10 и 0.20) под действием ультразвукового облучения и без него. Реакционные смеси ципрофлоксацина и

хитозана выдерживали при pH = 3, T = 50 °C в течение 5 часов (без ультразвука) или 20 минут (с ультразвуковым облучением 100 кГц, 280 Вт). Реакция без ультразвука при мольном соотношении хитозан:ципрофлоксацин 1:0.5 или 1:1.5 приводит к образованию *N*-замещенных конъюгатов со степенью замещения 0.05 или 0.10 соответственно. При повышении мольного соотношения хитозан:ципрофлоксацин до 1:4 образуются более высокозамещенные продукты (степень замещения 0.20). Использование ультразвукового облучения резко сокращает как время реакции, так и требуемое количество ципрофлоксацина при условии достижения одной и той же степени замещения. Результаты представлены в **таблице 11**.

Таблица 11. Влияние ультразвукового облучения на синтез конъюгата ципрофлоксацин/хитозан без спейсера (схема 9, система 1).

Параметры, идентичные как для обычного, так и для ультразвукового режима			Традиционные условия		Ультразвуковые условия	
СЗ	T, °C	pH	Мольное соотношение	Время реакции	Мольное соотношение	Время реакции
0.05	50 °C	3	0.5	5 ч	0.2	20 мин
0.10	50 °C	3	1.5	5 ч	0.5	20 мин
0.20	50 °C	3	4	5 ч	1.6	20 мин

Полученные конъюгаты ципрофлоксацин/хитозан были охарактеризованы с помощью спектроскопии ЯМР на ядрах ¹H. Типичный спектр ЯМР ¹H с оценкой сигнала представлен на **рисунке 8**. Степень замещения (СЗ) конъюгатов рассчитывали по формуле: $СЗ = I(1')$, а $I(1) + I(1') + I(1'') = 1$. Кодовые названия синтезированных полимеров, степень их замещения и молекулярные массы исходных хитозанов представлены в **таблице 9**. Сокращенные наименования продуктов (**таблица 9**) следует расшифровывать следующим образом: **C-CS-I-L**: **C** – производное, конъюгированное с ципрофлоксацином, **CS** – хитозан, **I** – степень замещения 0.05, **L** – низкомолекулярный хитозан (3.5×10^4 Да).

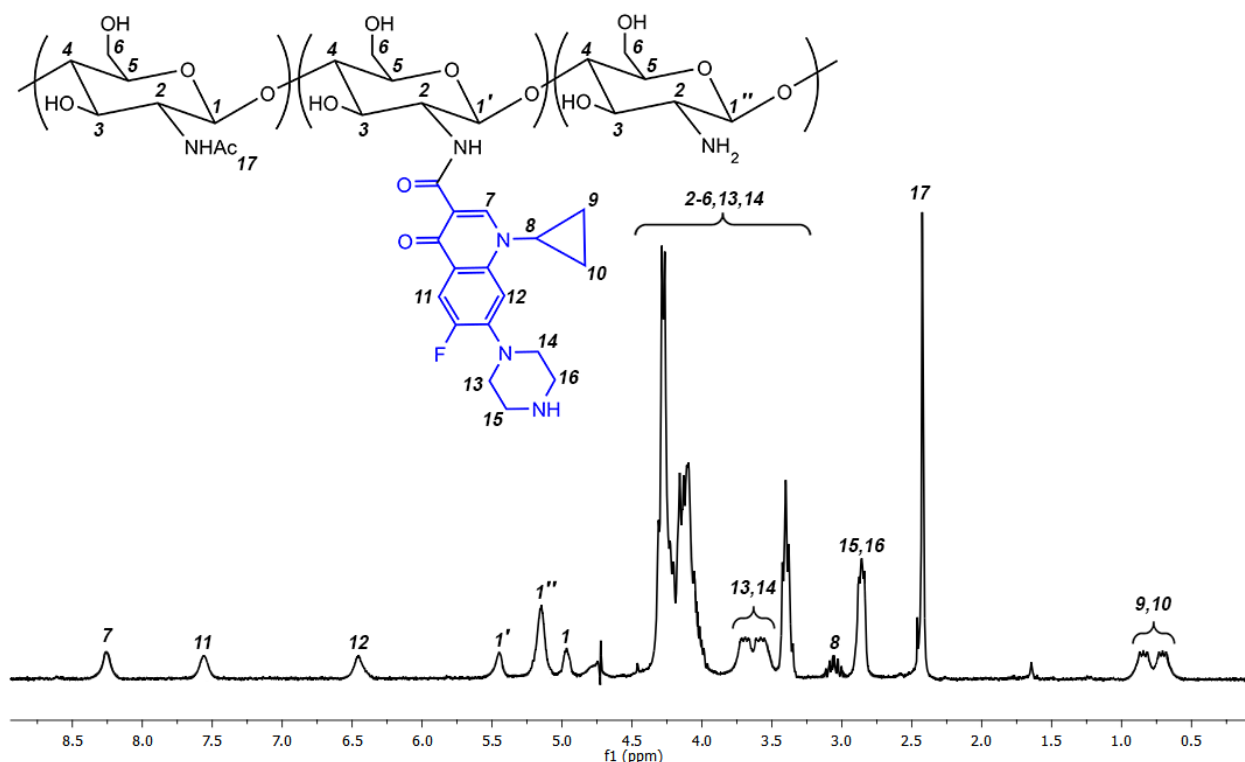


Рис. 8. Типичный спектр ЯМР ^1H конъюгата ципрофлоксацин/хитозан.

Таблица 12. Степени замещения полученных производных хитозана, конъюгированных с ципрофлоксацином, без спейсера (схема 9, система 1) и молекулярные массы исходных хитозанов.

Ципрофлоксацин/хитозановый конъюгат	Молекулярная масса исходного хитозана, Да	Степень замещения хитозанового производного
C-CS-I-L	3.5×10^4	0.05
C-CS-I-M	7.1×10^4	0.05
C-CS-I-H	17.2×10^4	0.05
C-CS-II-L	3.5×10^4	0.10
C-CS-II-M	7.1×10^4	0.10
C-CS-II-H	17.2×10^4	0.09
C-CS-III-L	3.5×10^4	0.20
C-CS-III-M	7.1×10^4	0.20
C-CS-III-H	17.2×10^4	0.20

Полученные полимеры нерастворимы в воде, но растворимы в 1 % уксусной кислоте или 1 % растворе HCl. Кроме того, будучи растворенными в 1 % уксусной кислоте или 1 % HCl, полимеры не выпадают в осадок из раствора, при доведении pH до 7.0 добавлением гидрокарбоната натрия.

При pH = 7.0 **C-CS-I-M**, **C-CS-II-M** и **C-CS-III-M** самоорганизуются в соответствующие наночастицы унимодального распределения по размеру после обработки ультразвуком. Оптимизация акустических параметров показала, что при 5 минутной ультразвуковой обработке с частотой 30 кГц и выходной мощностью 300 Вт сформированные наночастицы характеризуются наиболее равномерным распределением по размерам. Характеристики полученных наночастиц (**схема 9, система 2**) представлены в **таблице 13**. Гидродинамический диаметр самоорганизующихся наночастиц сильно зависит от степени замещения исходного конъюгата хитозан/ципрофлоксацин. Более замещенные полимеры самоорганизуются в наночастицы с большим гидродинамическим диаметром. ζ -потенциал образующихся наночастиц также увеличивается с увеличением степени замещения исходных конъюгатов, но в значительно меньшей степени. Все наночастицы редиспергируются после лиофилизации. Сканирующая электронная микроскопия подтверждает значения размеров полученных наночастиц, а также их сферическую форму (**рисунке 9**).

Таблица 13. Характеристики самоорганизующихся наночастиц (**схема 9, система 2**).

Образец	$2R_h$, нм *	Индекс полидисперсности *	ζ -потенциал, мВ *
NPs-C-CS-I-M	35 ± 5	0.18 ± 0.03	32.4 ± 0.3
NPs-C-CS-II-M	59 ± 3	0.16 ± 0.02	35.2 ± 0.1
NPs-C-CS-III-M	97 ± 3	0.18 ± 0.02	39.7 ± 0.3

* Среднее значение \pm стандартное отклонение, n=3

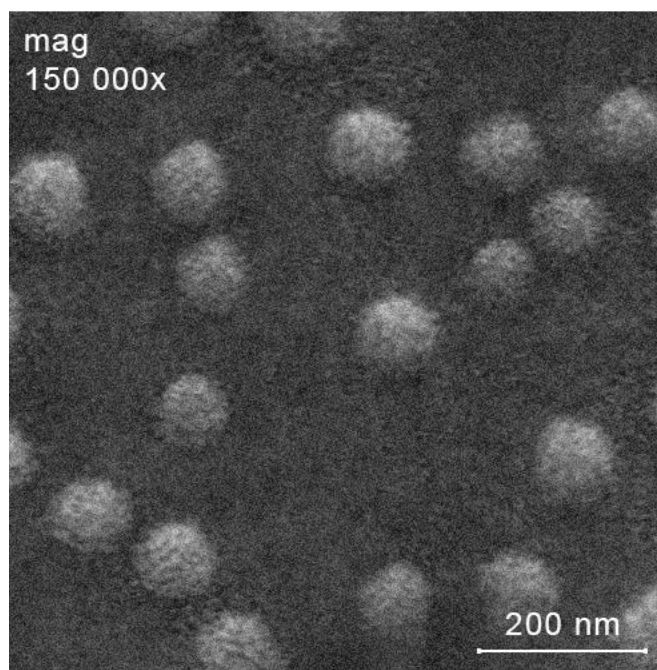


Рис. 9. СЭМ-изображение самоорганизующихся наночастиц.

3.2. Синтез конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан, в которых ципрофлоксацин связан с полимерной цепью через рН-чувствительный спейсер (схема 9, система 5)

Во многих случаях конъюгация фармакологически активного соединения с полимерной матрицей через рН-чувствительный спейсер приводит к значительному улучшению профиля высвобождения лекарственного средства. В этом исследовании были получены ципрофлоксациновые производные хитозана, в которых ципрофлоксацин конъюгирован с полисахаридной цепью через рН-чувствительный гидразоновый спейсер на основе глиоксаля. Стратегия конъюгации через спейсер представлена на **схеме 12**. Ципрофлоксацин участвует в реакции $AdN-E$ с гидразином с образованием соответствующего гидразона **1** (**схема 12, А**). При взаимодействии гидразона **1** с глиоксалем образуется соединение **2** (**схема 12, В**). Вещество **2**, содержащее альдегидную группу, реагирует со свободными аминогруппами хитозана с образованием соответствующего основания Шиффа (**схема 12, С**).

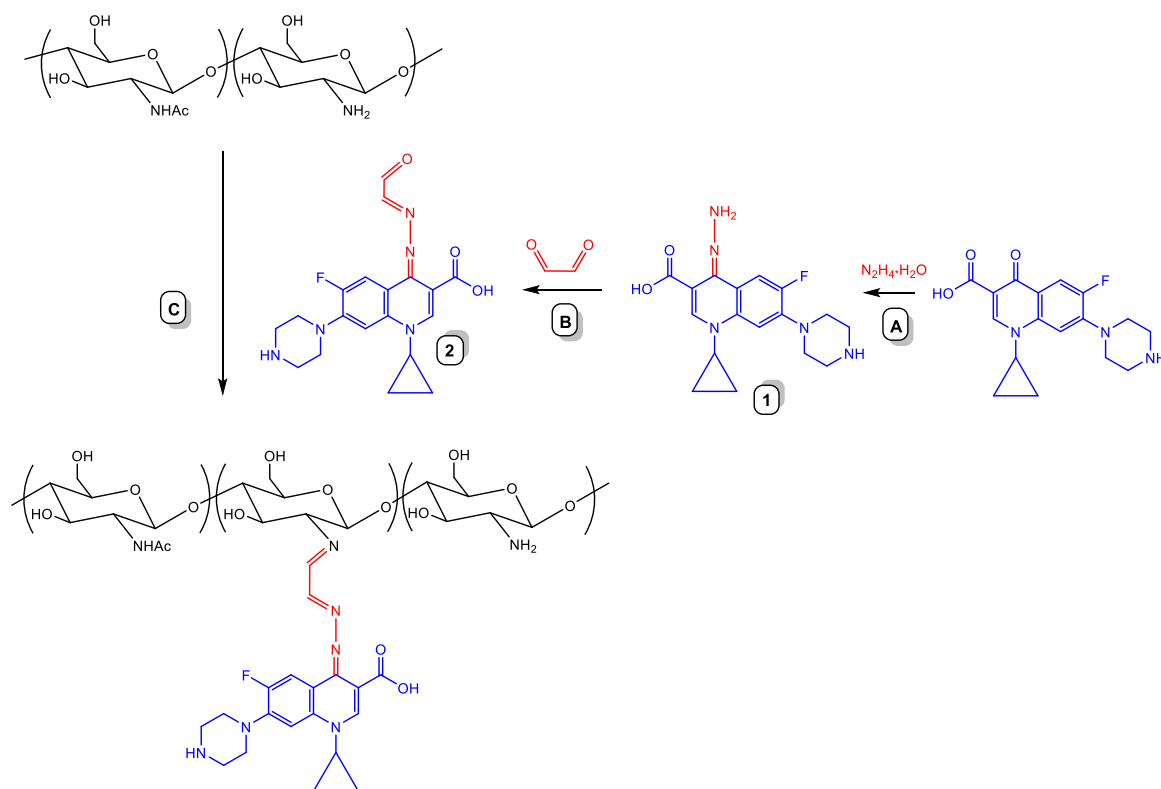


Схема 12. Конъюгация ципрофлоксацина через рН-чувствительный спейсер с хитозаном.

Соединение **1** легко образуется практически с количественным выходом. В то же время синтез соединения **2** связан с некоторыми препаративными трудностями. После оптимизации условий синтеза было обнаружено, что самый высокий препаративный выход (около 70 %) продукта **2** наблюдался при использовании 3.5-кратного глиоксаля. Для очистки продукта **2** требуется колоночная хроматография.

Взаимодействие **2** с хитозаном протекает значительно медленнее, чем с обычными альдегидами, такими как, например, бензальдегид. По-видимому, этот факт можно объяснить влиянием открытой гетероцепной системы сопряженных двойных связей в молекуле соединения **2**, охватывающей более 10 атомов, включая атомы альдегидной группы. Взаимодействие с хитозаном на первой стадии реакции приводит к разрушению сопряженной системы в районе карбонильной группы. Частичная деструкция полисопряженной системы невыгодна, что приводит к снижению реакционной способности соединения **2**.

В предыдущих работах нашей научной группы было установлено, что ультразвуковое облучение способствует образованию оснований Шиффа при взаимодействии ароматических или алифатических альдегидов с хитозаном [181, 182]. Акустические условия для промотирования образования оснований Шиффа чрезвычайно широки, однако условия, которые позволяют промотировать эту реакцию без разрыва полимерной цепи хитозана, находятся в области 80 кГц 250 Вт. В рамках данной главы диссертации были использованы именно эти условия для промотирования реакции хитозана с соединением **2**, а также было оценено влияние ультразвука по сравнению с традиционными условиями (**таблица 14**). Была проведена оптимизация как ультразвуковых, так и традиционных условий. Данные, представленные в **таблице 14**, демонстрируют, что ультразвуковая обработка реакционных смесей приводит к значительному снижению как избытка соединения **2**, так и времени реакции необходимого для достижения той же степени замещения, что и в традиционных условиях.

Таблица 14. Влияние ультразвукового облучения на синтез конъюгата ципрофлоксацина с хитозаном, содержащего рН-чувствительный спейсер.

Параметры, идентичные как для традиционного, так и для ультразвукового режима			Традиционные условия		Ультразвуковое облучение	
СЗ	Т, °С	рН	Мольное соотношение	Время реакции	Мольное соотношение	Время реакции
0.05	25 °С	3	0.9	3 ч	0.5	20 мин
0.10	25 °С	3	1.7	3 ч	0.9	20 мин
0.20	25 °С	3	3.5	3 ч	1.6	20 мин

Кодовые названия полученных полимеров (**схема 9, система 5**), их степени замещения и молекулярные массы исходных хитозанов представлены в **таблице 15**.

Таблица 15. Степени замещения полученных производных хитозана, конъюгированных с ципрофлоксацином через рН-чувствительный спейсер (**схема 9, система 5**) и молекулярные массы исходных хитозанов.

Ципрофлоксацин/хитозановый конъюгат	Молекулярная масса исходного хитозана, Да	Степень замещения хитозанового производного
C-SP-CS-I-L	3.5×10^4	0.06
C-SP-CS-I-M	7.1×10^4	0.05
C-SP-CS-I-H	17.2×10^4	0.04
C-SP-CS-II-L	3.5×10^4	0.11
C-SP-CS-II-M	7.1×10^4	0.10
C-SP-CS-II-H	17.2×10^4	0.09
C-SP-CS-III-L	3.5×10^4	0.22
C-SP-CS-III-M	7.1×10^4	0.20
C-SP-CS-III-H	17.2×10^4	0.20

Полимеры со степенью замещения 0.11 и 0.22 (**C-SP-CS-II-L** и **C-SP-CS-III-L**), полученные из низкомолекулярного хитозана (3.5×10^4 Да), растворимы в воде, в то время как другие конъюгаты нерастворимы в воде. Все конъюгаты растворимы в 1 % уксусной или 1 % соляной кислоте. Однако, если значение рН кислого раствора доводят до 7.0 добавлением гидрокарбоната натрия, конъюгаты выпадают в осадок (кроме водорастворимых **C-SP-CS-II-L** и **C-SP-CS-III-L**). Все полученные ципрофлоксацин-конъюгированные производные хитозана с рН-чувствительным спейсером не самоорганизуются в наночастицы.

Полученные производные хитозана охарактеризованы методом спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H . Типичный спектр ЯМР ^1H с отнесением сигналов представлен на **рисунке 10**.

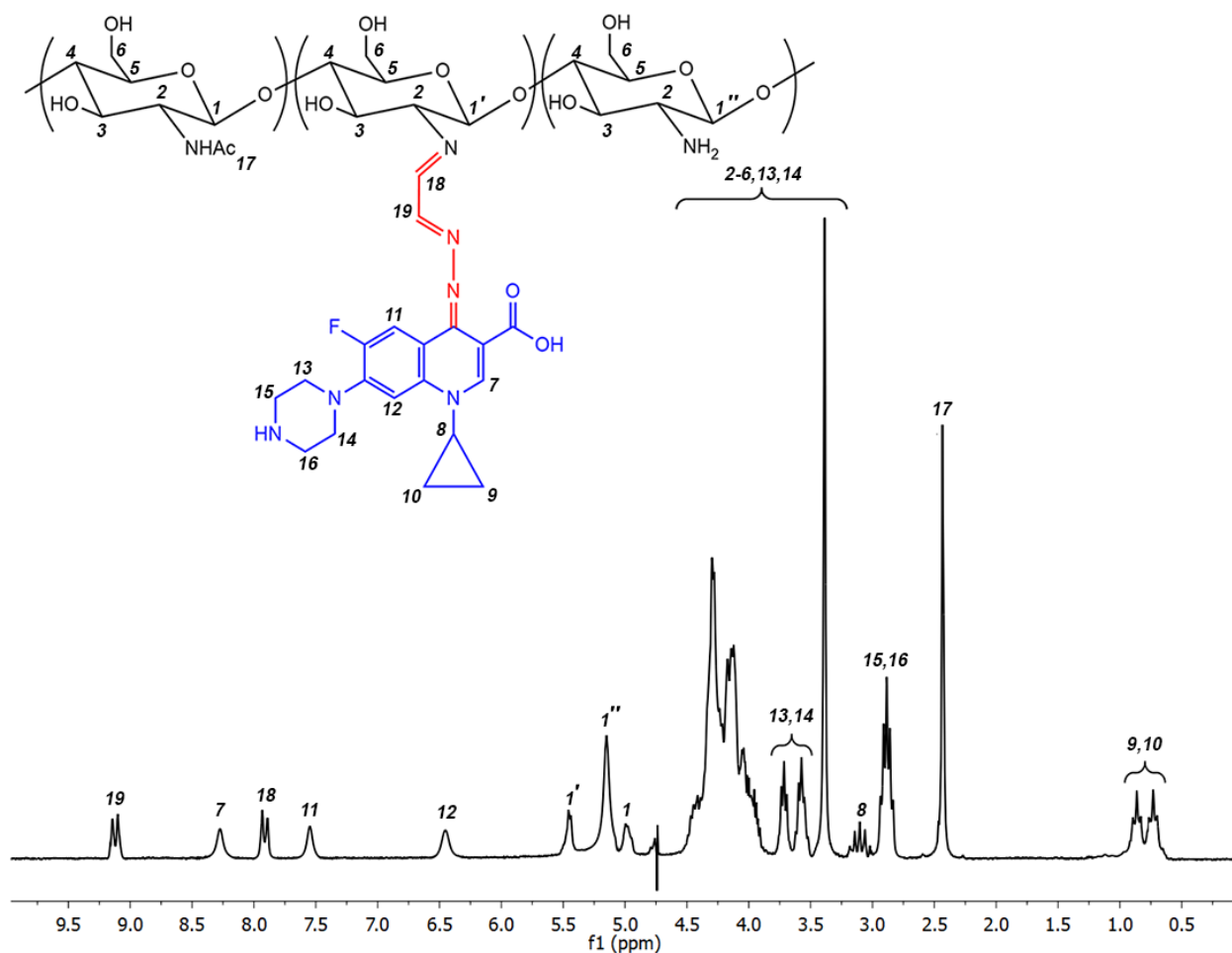


Рис. 10. Спектр ЯМР ^1H C-SP-CS-III-M.

В предыдущем разделе был описан синтез самособирающихся наночастиц конъюгатов цiproфлоксацина без спейсера, полученных из хитозана средней молекулярной массы (7.1×10^4 Да). В текущем разделе продемонстрировано, что содержащие спейсер конъюгаты цiproфлоксацина с хитозаном средней молекулярной массы (7.1×10^4 Да) наночастиц не образуют. Ввиду пришлось получить соответствующие наночастицы используя традиционный метод ионотропного гелеобразования. Оптимизируя условия, удалось синтезировать наночастицы **C-SP-CS-I-M**, **C-SP-CS-II-M** и **C-SP-CS-III-M**, близкие по размеру и ζ -потенциалу к полученным из **C-CS-I-M**, **C-CS-II-M** и **C-CS-III-M** в предыдущем разделе. В качестве гелеобразователя использовали триполифосфат натрия. Характеристики (гидродинамический диаметр и ζ -потенциал) полученных наночастиц представлены в **таблице 16**.

Таблица 16. Характеристики наночастиц, полученных методом ионного гелеобразования.

Образец	$2R_h$, нм *	Индекс полидисперсности *	ζ -потенциал, мВ *
NPs-C-SP-CS-I-M	39 ± 5	0.11 ± 0.02	31.0 ± 0.4
NPs-C-SP-CS-II-M	67 ± 3	0.14 ± 0.03	37.9 ± 0.3
NPs-C-SP-CS-III-M	110 ± 4	0.15 ± 0.03	40.3 ± 0.2

* Среднее значение \pm стандартное отклонение, $n=3$

Полученные наночастицы редиспергируются после лиофилизации. Сканирующая электронная микроскопия синтезированных наночастиц подтверждает значения их гидродинамического диаметра, полученные методом динамического светорассеяния, а также показывает, что наночастицы имеют сферическую форму (рисунке 11).

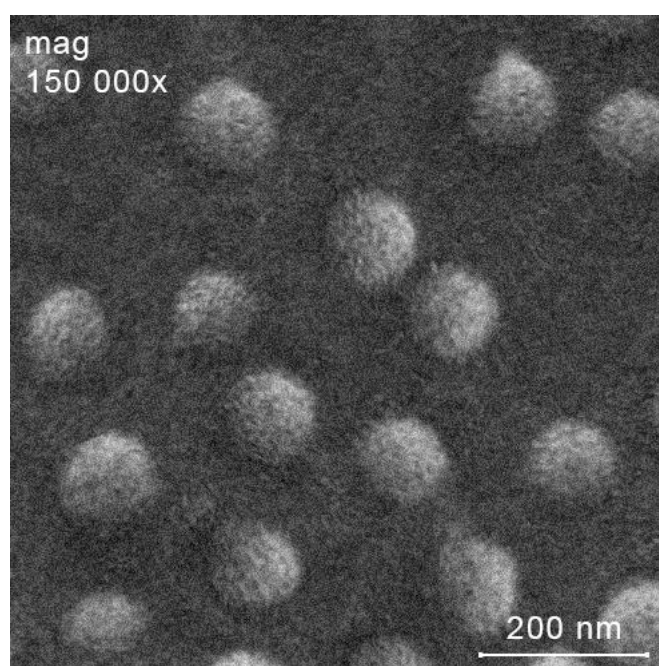


Рис. 11. СЭМ-изображение наночастиц, полученных методом ионного гелеобразования.

3.3. Получение наночастиц загруженных ципрофлоксацином

Загруженные ципрофлоксацином наночастицы получали одним из двух подходящих способов (*i*) загрузкой самособирающихся наночастиц (**NPs-C-CS-I-M**, **NPs-C-CS-II-M** и **NPs-C-CS-III-M**), полученных из соответствующих полимеров **C-CS-I-M**, **C-CS-II-M** и **C-CS-III-M**, или (*ii*) методом ионотропного гелеобразования для всех других полимеров, поскольку другие полимеры не самоорганизуются в наночастицы.

3.3.1. Получение загруженных ципрофлоксацином наночастиц из **NPs-C-CS-I-M**, **NPs-C-CS-II-M** и **NPs-C-CS-III-M** (схема 9, система 3)

Загруженные ципрофлоксацином наночастицы **C-L-NPs-C-CS-I-M**, **C-L-NPs-C-CS-II-M** и **C-L-NPs-C-CS-III-M** были получены из соответствующих полимеров **NPs-C-CS-I-M**, **NPs-C-CS-II-M** и **NPs-C-CS-III-M** путем их загрузки ципрофлоксацином под действием ультразвука. 1 мг ципрофлоксацина, растворенного в этаноле, добавляли к 5 мг **NPs-C-CS-I-M**, **NPs-C-CS-II-M** или **NPs-C-CS-III-M**, суспендированных в воде. Долю загруженного ципрофлоксацина оценивали по концентрации ципрофлоксацина в супернатанте после загрузки и удаления загруженных наночастиц центрифугированием. Таким образом, была проведена оценка эффективности загрузки, и эти значения были использованы для расчета эффективности инкапсуляции (т.е. массы инкапсулированного ципрофлоксацина в мкг на 1 мг загруженных наночастиц **C-L-NPs-C-CS-I-M**, **C-L-NPs-C-CS-II-M** или **C-L-NPs-C-CS-III-M**). Характеристики загруженных наночастиц представлены в **таблице 17**. Загруженные наночастицы редуспергируются после лиофилизации и стабильны в виде суспензии не менее 48 часов.

Загруженные наночастицы не сильно отличаются по размеру от исходных (незагруженных) наночастиц. Однако видно, что разница в размерах загруженных и исходных наночастиц увеличивается с увеличением степени замещения используемого полимера. Например, разница в гидродинамическом диаметре для

исходных и загруженных наночастиц, полученных из **C-CS-I-M** (степень замещения 0.05), составляет около 9 нм, в то время как эта разница между наночастицами, полученными из **C-CS-III-M** (степень замещения 0.20), составляет около 27 нм. Результаты сканирующей электронной микроскопии (**рисунке 12**) подтверждают образование сферических наночастиц и значения гидродинамического диаметра, полученные методом динамического светорассеяния. ζ -потенциал загруженных наночастиц положителен и его значение в мВ близко к таковому для исходных (незагруженных) наночастиц. Содержание загруженного ципрофлоксацина в наночастицах находилось в диапазоне 264–317 мкг/мг и резко возрастает с увеличением степени замещения исходного полимера.

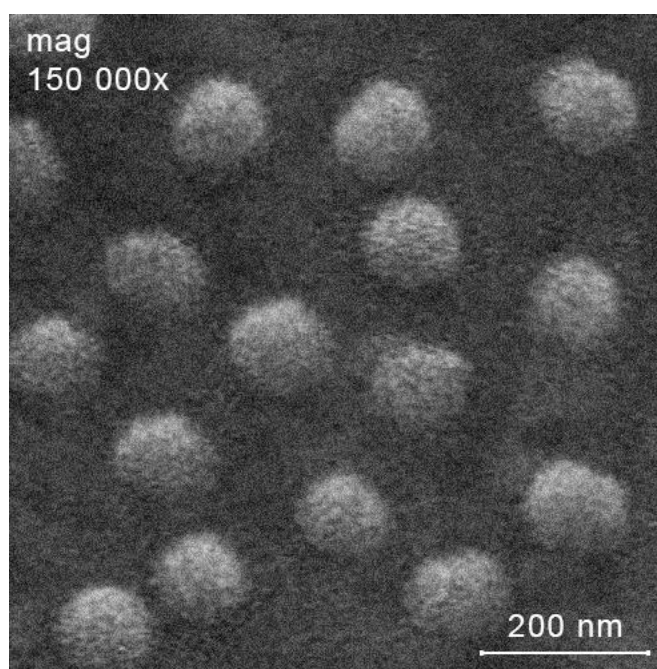


Рис. 12. СЭМ-изображение загруженных самоорганизующихся наночастиц.

Таблица 17. Характеристики загруженных самоорганизующихся наночастиц (схема 9, система 3).

Образец	$2R_h$, нм *	Индекс полидисперсности *	ζ -потенциал, мВ *	Эффективность захвата, % *	Эффективность загрузки, мкг/мг * (%)
---------	------------------	------------------------------	-----------------------------	-------------------------------	---

C-L-NPs-C-CS-I-M	48 ± 3	0.13 ± 0.04	33.0 ± 0.5	73 ± 5	264 ± 3 (около 26 %)
C-L-NPs-C-CS-II-M	83 ± 4	0.15 ± 0.03	38.4 ± 0.2	81 ± 2	283 ± 5 (около 28 %)
C-L-NPs-C-CS-III-M	137 ± 2	0.12 ± 0.02	40.0 ± 0.4	93 ± 3	317 ± 2 (около 32 %)

* Среднее значение ± стандартное отклонение, n=3

3.3.2. Получение наночастиц, загруженных ципрофлоксацином, из других полимеров методом ионного гелеобразования (схема 9, система 4 и схема 9, система б)

Полученные наночастицы характеризуются положительным значением ζ -потенциала. Гидродинамический диаметр образующихся наночастиц закономерно увеличивается с увеличением степени замещения и молекулярной массы исходных полимеров. Следует отметить, что практически во всех случаях наночастицы, полученные из конъюгатов, в которых ципрофлоксацин связан с полимерной цепью через спейсер, имеют большие размеры по сравнению с наночастицами, полученными из конъюгатов, в которых ципрофлоксацин напрямую связан с полимером. Кроме того, на примере загруженных наночастиц **C-L-NPs-C-SP-CS-I-M**, **C-L-NPs-C-SP-CS-II-M** и **C-L-NPs-C-SP-CS-III-M** (таблица 18) можно заметить, что они характеризуются большим размером, чем соответствующие незагруженные наночастицы **NPs-C-SP-CS-I-M**, **NPs-C-SP-CS-II-M** и **NPs-C-SP-CS-III-M** (таблица 16). Эффективность загрузки загруженных наночастиц, полученных методом ионного гелеобразования, находится в диапазоне 78–98 мкг/мг, и эти значения значительно меньше характеристик самоорганизующихся наночастиц, рассмотренных ранее и описанных в таблице 17. Пример СЭМ-

изображения загруженных наночастиц, приготовленных методом ионного гелеобразования (C-L-NPs-C-SP-CS-III-M), представлен на рисунке 13.

Таблица 18. Характеристики загруженных наночастиц, полученных методом ионного гелеобразования (схема 9, система 4 и схема 9, система 6).

Образец	Объем трифосфата натрия (мл)	$2R_h$, нм *	Индекс полидисперсности *	ζ -потенциал, мВ *	Эффективность захвата, % *	Эффективность загрузки, мкг/мг * (%)
Часть I (наночастицы на основе конъюгатов без спейсера, (схема 9, система 4))						
C-L-NPs-C-CS-I-L	3.0	43 ± 2	0.09 ± 0.02	34.3 ± 0.1	31 ± 3	80 ± 2 (около 8 %)
C-L-NPs-C-CS-I-H	3.0	49 ± 3	0.12 ± 0.03	33.2 ± 0.5	32 ± 4	80 ± 2 (около 8 %)
C-L-NPs-C-CS-II-L	2.0	63 ± 3	0.13 ± 0.04	38.2 ± 0.3	28 ± 2	82 ± 3 (около 8 %)
C-L-NPs-C-CS-II-H	2.0	69 ± 1	0.10 ± 0.03	39.1 ± 0.1	30 ± 3	91 ± 2 (около 9 %)
C-L-NPs-C-CS-III-L	1.5	128 ± 4	0.15 ± 0.02	43.3 ± 0.2	27 ± 6	88 ± 4 (около 9 %)
C-L-NPs-C-CS-III-H	1.5	126 ± 3	0.12 ± 0.03	45.8 ± 0.3	30 ± 3	98 ± 2 (около 10 %)
Часть II (наночастицы на основе конъюгатов со спейсером (схема 9, система 6))						

C-L-NPs- C-SP-CS-I- L	3.0	48 ± 2	0.12 ± 0.04	32.9 ± 0.3	31 ± 5	78 ± 4 (около 8 %)
C-L-NPs- C-SP-CS-I- M	3.0	51 ± 3	0.14 ± 0.03	33.1 ± 0.4	33 ± 5	81 ± 2 (около 8 %)
C-L-NPs- C-SP-CS-I- H	3.0	59 ± 2	0.12 ± 0.03	32.5 ± 0.2	30 ± 3	78 ± 8 (около 8 %)
C-L-NPs- C-SP-CS- II-L	2.0	64 ± 4	0.16 ± 0.02	35.3 ± 0.4	27 ± 4	80 ± 4 (около 8 %)
C-L-NPs- C-SP-CS- II-M	2.0	66 ± 2	0.12 ± 0.02	36.4 ± 0.1	31 ± 1	87 ± 1 (около 9 %)
C-L-NPs- C-SP-CS- II-H	2.0	71 ± 3	0.14 ± 0.05	36.9 ± 0.2	30 ± 2	84 ± 2 (около 8 %)
C-L-NPs- C-SP-CS- III-L	1.5	118 ± 4	0.16 ± 0.02	45.8 ± 0.2	30 ± 3	97 ± 3 (около 10 %)
C-L-NPs- C-SP-CS- III-M	1.5	125 ± 3	0.13 ± 0.04	45.3 ± 0.4	28 ± 2	91 ± 3 (около 9 %)
C-L-NPs- C-SP-CS- III-H	1.5	129 ± 3	0.12 ± 0.02	46.1 ± 0.3	26 ± 4	84 ± 3 (около 8 %)

* Среднее значение ± стандартное отклонение, n=3

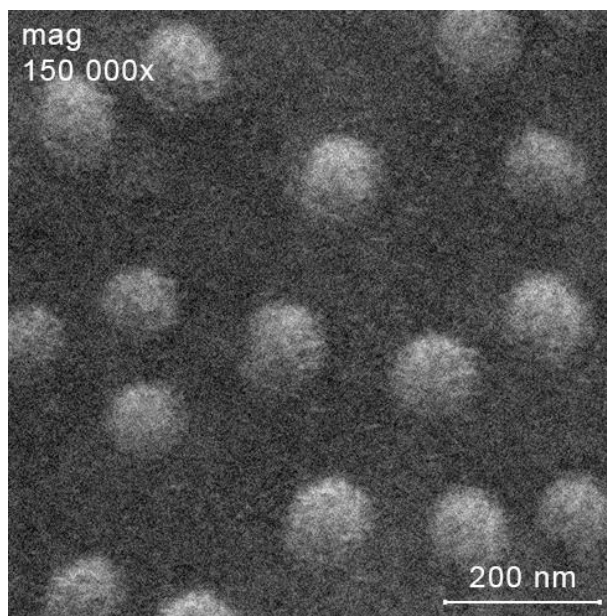


Рис. 13. СЭМ-изображение загруженных наночастиц, приготовленных методом ионного гелеобразования.

3.3.3. Изучение высвобождения лекарственного средства

В этом разделе проведена оценка высвобождения лекарственного средства из следующих систем:

(i) конъюгаты ципрофлоксацин-хитозан без pH-чувствительного спейсера (**схема 9, система 1; таблица 12**);

(ii) конъюгаты ципрофлоксацин-хитозан со спейсером (**схема 9, система 5; таблица 15**);

(iii) загруженные самособирающиеся наночастицы (на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера, **схема 9, система 3; таблица 17**);

(iv) загруженные наночастицы на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера, полученные методом иотропного гелеобразования (**схема 9, система 4; таблица 18, часть I**);

(v) загруженные наночастицы на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан со спейсером, приготовленным методом ионного гелеобразования (**схема 9, система 6; таблица 18, часть II**).

Опыты проводили при температуре 40 °С и значении pH, характерном для воспалительного процесса бактериальной этиологии (6.5). Экспериментальные

результаты (профили высвобождения) представлены на **рисунке 14** как процентаж высвобожденного ципрофлоксацина в зависимости от времени. Эксперименты показали, что конъюгаты без спейсера, независимо от молекулярной массы и степени замещения тестируемого конъюгата, не высвобождают ципрофлоксацин в течении 80 часов. Ципрофлоксацин-хитозановые конъюгаты со спейсером характеризуются быстрой и достаточно равномерной кинетикой высвобождения и высвобождают 100 % препарата в течение 15 часов. Загруженные самособирающиеся наночастицы (на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера) имеют аналогичный профиль высвобождения, однако высвобождение происходит несколько медленнее и достигает 100% за 20 часов. Загруженные наночастицы, полученные методом ионного гелеобразования, также характеризуются сходными профилями высвобождения между собой. Однако наночастицы на основе конъюгатов без спейсера высвобождают лекарственное средство несколько медленнее и имеют более равномерный профиль высвобождения. На **рисунке 14** представлены результаты для систем на основе среднемолекулярного хитозана. Для исследованных образцов на основе хитозана меньшей и большей молекулярной массы различий по сравнению с результатами, представленными на **рисунке 14**, обнаружено не было. На **рисунке 14** представлены результаты для степени замещения 0.20. Для более низких степеней замещения (0.10 и 0.05) характерно более быстрое высвобождение (на 5–10%). Это можно объяснить уменьшением содержания гидрофобного фрагмента в молекуле полимера, который связывал бы и удерживал ципрофлоксацин.

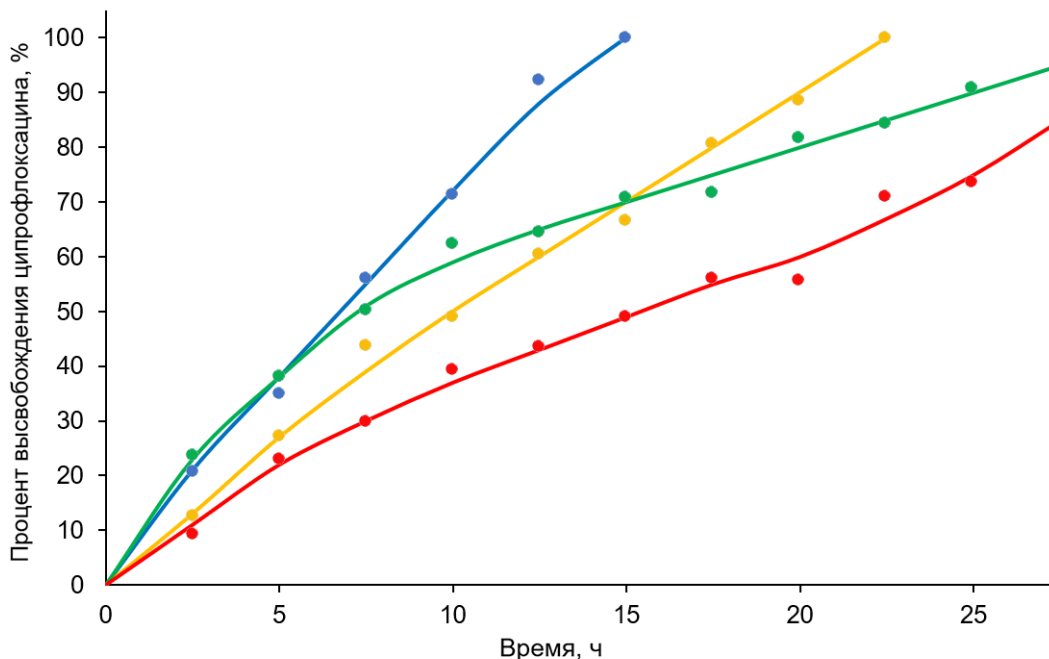


Рис. 14. Профили высвобождения ципрофлоксацина из систем на основе хитозана средней молекулярной массы (6.9×10^4 Да). Синий – конъюгаты ципрофлоксацин-хитозан со спейсером (схема 9, система 5); желтый – загруженные самоорганизующиеся наночастицы (на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера, схема 9, система 3); зеленый – загруженные наночастицы на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан со спейсером, приготовленным методом ионного гелеобразования (схема 9, система 6); красный – загруженные наночастицы на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера, приготовленные методом ионного гелеобразования (схема 9, система 4).

3.4. Антибактериальная активность наночастиц и конъюгатов *in vitro*

Антибактериальную активность полученных антибактериальных систем на основе фторхинолона/хитозана (конъюгатов и наночастиц) *in vitro* оценивали методом диффузии в агар. Результаты исследования представлены в **таблице 19**.

Таблица 19. Антибактериальная активность конъюгатов и наночастиц на основе ципрофлоксацина/хитозана.

Тестируемый образец	Зона ингибирования, мм *	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>

<i>Ципрофлоксацин-хитозановые конъюгаты без спейсера (схема 9, система 1; таблица 12)</i>		
C-CS-I-M	14.2 ± 0.3	11.3 ± 0.1
C-CS-II-M	16.2 ± 0.4	13.1 ± 0.2
C-CS-III-M	20.0 ± 0.2	14.9 ± 0.1
<i>Конъюгаты ципрофлоксацин-хитозан со спейсером (схема 9, система 5; таблица 15)</i>		
C-SP-CS-I-M	23.7 ± 0.4	18.4 ± 0.5
C-SP-CS-II-M	27.4 ± 0.1	21.6 ± 0.3
C-SP-CS-III-M	31.1 ± 0.1	23.9 ± 0.4
<i>Загруженные самоорганизующиеся наночастицы (на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера, схема 9, система 3; таблица 17)</i>		
C-L-NPs-C-CS-I-M	47.2 ± 0.1	42.5 ± 0.5
C-L-NPs-C-CS-II-M	47.8 ± 0.3	42.3 ± 0.4
C-L-NPs-C-CS-III-M	47.9 ± 0.2	42.6 ± 0.3
<i>Загруженные наночастицы на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера, полученные методом ионного гелеобразования (схема 9, система 4; таблица 18, часть I)</i>		
C-L-NPs-C-CS-I-H	36.0 ± 0.5	30.9 ± 0.7
C-L-NPs-C-CS-II-H	36.5 ± 0.1	30.2 ± 0.3
C-L-NPs-C-CS-III-H	36.2 ± 0.4	31.1 ± 0.2
<i>Загруженные наночастицы на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан со спейсером, приготовленным методом ионного гелеобразования (схема 9, система 6; таблица 18, часть II)</i>		
C-L-NPs-C-SP-CS-I-M	36.3 ± 0.1	29.9 ± 0.1
C-L-NPs-C-SP-CS-II-M	36.9 ± 0.4	31.2 ± 0.3
C-L-NPs-C-SP-CS-III-M	36.4 ± 0.3	30.5 ± 0.1
M		
<i>Справочные антибактериальные препараты</i>		

Ципрофлоксацин	43.6 ± 0.3	38.4 ± 0.5
Хитозан	8.7 ± 0.2	7.9 ± 0.4

* Среднее значение ± стандартное отклонение, n=3

Все протестированные антибактериальные системы характеризуются более выраженным антибактериальным эффектом, чем у исходного хитозана. Среди конъюгатов наименьшую антибактериальную активность продемонстрировали конъюгаты ципрофлоксацин-хитозан без спейсера. Антибактериальный эффект конъюгатов усиливается с увеличением степени их замещения, и это означает, что привитый ципрофлоксацин является тем фармакофором, который вносит важный (если не основной) вклад в развитие антибактериального действия конъюгата. Повышенную антибактериальную активность конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан со спейсером можно объяснить их способностью высвобождать свободный ципрофлоксацин и тем самым обеспечивать симбатность механизмов действия, характерных как для свободного ципрофлоксацина (ингибирование ДНК-гиразы и топоизомеразы IV [228]) так и для полимерной цепи хитозана (повреждение клеточной мембраны бактерий [229]).

Во многих случаях наночастицы на основе полимеров характеризуются повышенной антибактериальной активностью по сравнению с полимерами в нативной форме [230]. Механизмы антибактериального действия наночастиц плохо изучены. Рассматриваются три механизма антибактериального действия наночастиц. Наночастицы с положительным значением ζ -потенциала могут (i) прочно связываться с анионными фрагментами мембраны бактериальной клетки, вызывая ее необратимое повреждение; (ii) проникать в бактериальную клетку и связываться с полианионной ДНК, приводя к ингибированию ее репликации и синтеза белка; и (iii) вызывать коагуляцию клеток. Этот каскад неблагоприятных для микробной клетки событий приводит к ее неминуемой гибели [231]. Наиболее активными антибактериальными системами оказались загруженные ципрофлоксацином самоорганизующиеся наночастицы на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера. Их антибактериальный эффект как против

S. aureus, так и против *E. coli* сравним с действием эталонного антибиотика ципрофлоксацина (МИК для *E. coli*: ципрофлоксацин 0.10 мкг/мл, **C-L-NPs-C-CS-I-M** 0.13 мкг/мл, **C-L-NPs-C-CS-II-M** 0.11 мкг/мл, **C-L-NPs-C-CS-III-M** 0.10 мкг/мл МИК для *S. aureus*: ципрофлоксацин 2.10 мкг/мл, **C-L-NPs-C-CS-I-M** 2.60 мкг/мл, **C-L-NPs-C-CS-II-M** 2.40 мкг/мл, **C-L-NPs-C-CS-III-M** 2.05 мкг/мл).

Недавние исследования показали, что поликатионы и положительно заряженные наночастицы изменяют проницаемость мембран и вызывают разрыв мембраны, что приводит к потере ряда внутриклеточных соединений (белков, лактатдегидрогеназы, рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислот) [232]. Спектрофотометрия суспензии бактериальных клеток в 0.5 %-ном водном растворе NaCl в УФ-диапазоне является очень удобным способом контроля целостности бактериальной клеточной мембраны. Этот метод основан на том, что внутриклеточные компоненты бактерий характеризуются сильным поглощением при 260 нм. Используя этот подход, мы оценили влияние (i) хитозана, (ii) ципрофлоксацина, (iii) загруженных самоорганизующихся наночастиц на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера (наиболее эффективная разработанная в данной работе антибактериальная система) на целостность клеточные мембраны *S. aureus* как модельного микроорганизма.

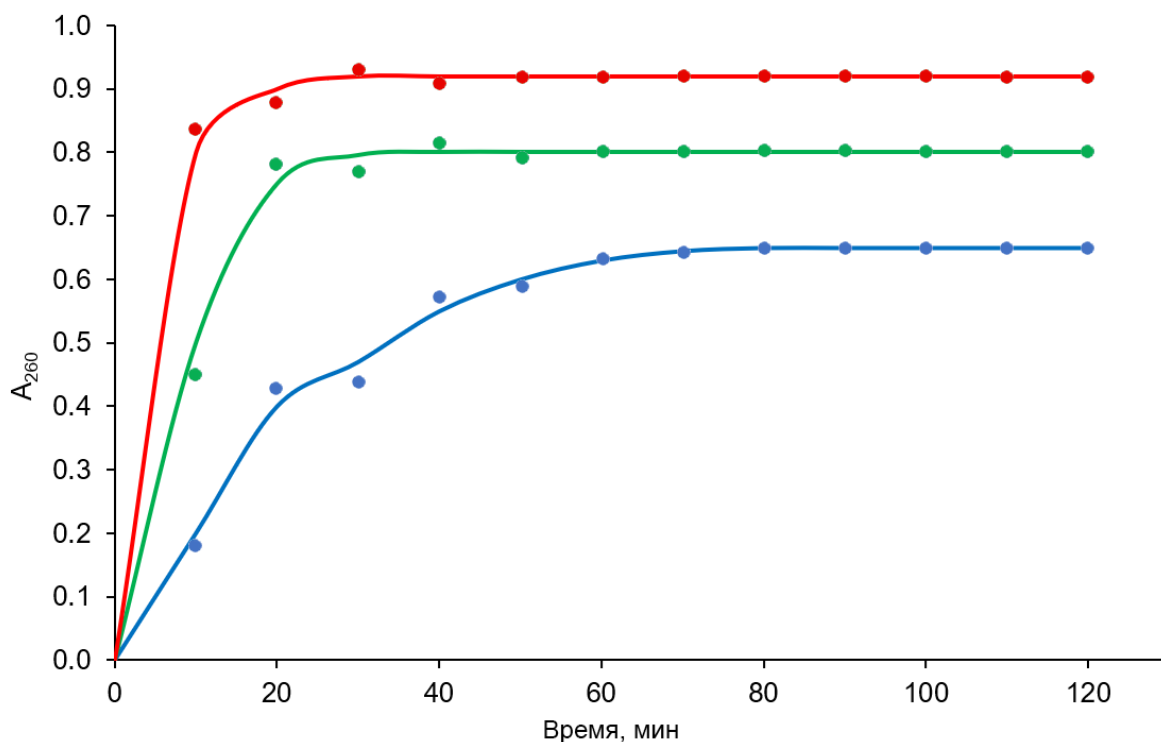


Рис. 15. Выделение содержимого бактериальных клеток, поглощающих при 260 нм, из *S. aureus* при обработке бактериальной суспензии 0.15% водным раствором ципрофлоксацина (синий), хитозана (зеленый) и конъюгаты загруженные самособирающимися наночастицами на основе ципрофлоксацин-хитозан без спейсера (красный).

На **рисунке 15** показано, что ципрофлоксацин действительно вызывает нарушение проницаемости мембраны бактериальной клетки *S. aureus*, но в меньшей степени, чем хитозан. Наибольший эффект высвобождения содержимого бактериальной клетки вызывают загруженные самособирающиеся наночастицы на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера. По-видимому, это связано с суммированием действия ципрофлоксацина и положительно заряженных наночастиц, способных повреждать мембрану бактериальной клетки.

3.5. Антибактериальная активность загруженных самособирающихся наночастиц на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера *in vivo*

Основываясь на результатах, описанных в предыдущих разделах, для экспериментов *in vivo* были выбраны загруженные самособирающиеся наночастицы на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера как наиболее перспективные антибактериальные системы из протестированных в данном исследовании. Мы протестировали наночастицы *in vivo* на белых крысах линии Вистар в сравнении с исходными хитозаном и ципрофлоксацином (масса тестируемого образца одинакова). Для опытов крысы были подвергнуты модельному перитониту, используя в качестве возбудителей микробную смесь, содержащую *S. aureus* и *E. coli*.

Через 6 часов после введения микроорганизмов у всех крыс наблюдались классические симптомы перитонита: вялость, отказ от еды, учащенное дыхание, вздутие живота. В контрольных группах забор экссудата (200 мкл) проводили стерильным шприцем через 24 часа после заражения. Через сутки всем остальным крысам вводили наносuspension испытуемых наночастиц, либо хитозан, либо ципрофлоксацин. Через 7 часов было взято 200 мкл экссудата. К 200 мкл экссудата прибавляли 1000 мкл 0.9 % водного раствора NaCl. 100 мкл полученного раствора равномерно наносили на чашку Петри с мясо-пептонным агаром. Подсчет колоний проводили через 24 часа после инкубации в инкубаторе при 37°C. В дальнейшем колониеобразующие единицы (КОЕ) пересчитывали на 1 мл экссудата.

Таблица 20. Антибактериальная активность *in vivo* загруженных самоорганизующихся наночастиц на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера (схема 9, система 3; таблица 17) в сравнении с исходными хитозаном и ципрофлоксацином.

Образец	КОЕ/мл экссудата (через 7 часов после инъекции или через 31 час после инфицирования)
Контроль без обработки (через 24 часа после инфекционного заболевания)	2825

Хитозан	1930
C-L-NPs-C-CS-I-M	0 (нет роста)
C-L-NPs-C-CS-II-M	0 (нет роста)
C-L-NPs-C-CS-III-M	0 (нет роста)
Ципрофлоксацин	175

Результаты экспериментов *in vivo* представлены в **таблице 20**. Наименьшая антибактериальная активность *in vivo* отмечена у исходного хитозана. Использование хитозана в качестве антибактериального средства привело к тому, что значение КОЕ на 1 мл экссудата составило всего в 1.5 раза меньше, чем в контрольной пробе. В качестве контрольной пробы использовали инфицированную перитонитом крысу, не получавшую лечения. Довольно высокую активность проявлял ципрофлоксацин. Исследуемые наночастицы продемонстрировали чрезвычайно высокий антибактериальный эффект *in vivo*: рост колоний не был обнаружен после забора экссудата. Высокая активность наночастиц обусловлена хорошим профилем их высвобождения. Кроме того, более низкая эффективность ципрофлоксацина может быть объяснена его быстрой элиминацией. Выведение наночастиц протекает гораздо сложнее, и это может привести к усилению антибактериального действия наночастиц по сравнению с ципрофлоксацином.

Особо следует отметить, что количество ципрофлоксацина в образцах тестируемых системах на основе хитозана более чем в 3 раза меньше по сравнению с количеством ципрофлоксацина в его образце такой же массы. Таким образом, использование разработанных систем приводит к снижению потребления ципрофлоксацина более чем в 3 раза, что крайне важно в связи с акцентированной в главе 1 экологической задачей сокращения уровня потребления антибиотиков.

3.6. Токсичность загруженных самоорганизующихся наночастиц на основе конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан без спейсера

Недавние исследования показали, что во многих случаях антибактериальные системы на основе хитозана характеризуются низкой токсичностью [233]. В частности, конъюгация токсичного антибактериального фармакофора с хитозановым основанием может преодолеть его токсичность без потери антибактериальной активности [172]. В рамках данного раздела диссертации была оценена токсичность *in vitro* наиболее перспективных систем (**C-L-NPs-C-CS-I-M**, **C-L-NPs-C-CS-II-M** и **C-L-NPs-C-CS-III-M**) с помощью классического МТТ-теста. МТТ-тест представляет собой колориметрический метод оценки процентного содержания жизнеспособных клеток в культуре. В основе этого метода лежит то, что НАДФН-зависимые дегидрогеназы жизнеспособных клеток эффективно восстанавливают 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) с образованием формазана пурпурного цвета. Таким образом, интенсивность пурпурной окраски соответствует жизнеспособности клеток [160]. Результаты показали, что при концентрации 10 мкг/мл (намного больше, чем МИК как ципрофлоксацина, так и тестируемых наночастиц) жизнеспособность клеток при действии наночастиц составляла около 95 %, тогда как под действием ципрофлоксацина жизнеспособность клеток составляла около 80 %.

Также была оценена токсичность полученных наночастиц *in vivo* на крысах. Установлено, что однократное введение наносuspензии **C-L-NPs-C-CS-I-M**, **C-L-NPs-C-CS-II-M** или **C-L-NPs-C-CS-III-M** в дозе 2000 мг/кг не влияет на общее состояние животных: симптомов острого отравления не зарегистрировано, гибели крыс не было. Поскольку исследуемая доза препарата не привела к гибели ни одного животного, был сделан вывод, что ЛД₅₀ > 2000 мг/кг и исследуемые наночастицы относятся к IV классу опасности (малотоксичные вещества). В течение всего периода наблюдения поведенческие реакции животных опытной группы находились в пределах физиологической нормы: нормальное пищевое поведение, нормальная координация движений, обычная частота и глубина дыхательных движений, нормальная консистенция каловых масс, частота мочеиспускания и цвет мочи. За это время крысы набрали вес. Гематологические

показатели периферической крови в ходе эксперимента изменялись незначительно в пределах нормы.

Таким образом, на основании экспериментальных данных как *in vitro*, так и *in vivo* исследований можно сделать вывод, что ведущие антибактериальные системы на основе хитозана **C-L-NPs-C-CS-I-M**, **C-L-NPs-C-CS-II-M** и **C-L-NPs-C-CS-III-M** нетоксичны.

3.7. Заключение к главе 3

Результаты работы можно рассматривать со следующих основных позиций. Во-первых, было показано, что ДЦК-опосредованное взаимодействие между группами *COOH* и *NH₂* с образованием амидной связи интенсифицируется ультразвуком в воде. Используя этот подход, были получены первые конъюгаты ципрофлоксацин-хитозан, не содержащие спейсера. Во-вторых, были синтезированы первые конъюгаты ципрофлоксацин-хитозан, несущие антибиотик, присоединенный к полимерной цепи через рН-чувствительный спейсер. В-третьих, разработано три типа загруженных ципрофлоксацином наночастиц на основе обоих конъюгатов со спейсером или без него (**схема 9**).

Загруженные ципрофлоксацином самоорганизующиеся наночастицы на основе конъюгатов без спейсера продемонстрировали способность высвобождать антибиотик с хорошим профилем высвобождения. Более того, их антибактериальный эффект *in vitro* является лучшим среди всех полученных в рамках данной главы диссертации систем. В-четвертых, была оценена антибактериальная активность *in vivo*, а также токсичность *in vivo* наиболее эффективных антибактериальных наночастиц (самособирающиеся загруженные ципрофлоксацином наночастицы на основе конъюгатов без спейсера). Антибактериальный эффект наночастиц *in vivo* превосходил эффект исходного ципрофлоксацина. Токсичность же данных наночастиц *in vivo* была почти идентична токсичности хитозана, который считается нетоксичным биополимером. Полученные результаты дают повод рассматривать разработанные лидирующие наночастицы как системы, представляющие интерес для создания лекарственных

форм пролонгированного высвобождения ципрофлоксацина и его адресной доставки с последующими доклиническими исследованиями.

Важнейшим итогом разработанного в рамках данной главы химического решения экологической задачи снижения потребления антибиотиков является то, что использование предложенных систем высвобождения позволяет снизить дозу ципрофлоксацина более чем в 3 раза, что представляется весьма перспективным.

Глава 4. Экспериментальная часть

4.1. Материалы и методы

4.1.1. Материалы

В работе был использован крабовый хитозан (Биопрогресс, Россия) со средневязкостной молекулярной массой (ММ) 3.7×10^4 (**L**) и степенью ацетилирования 26 %, средневязкостной молекулярной массой (ММ) 6.9×10^4 (**M**) и степенью ацетилирования 28%, средневязкостной молекулярной массой (ММ) 17.8×10^4 (**H**) и степенью ацетилирования 24%, крабовый хитин со средневязкостной молекулярной массой (ММ) 3.5×10^4 (**L**), 7.1×10^4 (**M**), 17.2×10^4 (**H**) и степень ацетилирования 100 %, ципрофлоксацин, *n*-бутиламин, ДЦК (*N,N'*-дициклогексилкарбодиимид), ЭДК (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид)), NHS (*N*-гидроксисукцинимид), гидразин, глиоксаль, ТПФ (триполифосфат натрия) (Sigma Aldrich, США). Бромид 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия, соединения **B** и **C** получали по экспериментальной методике, опубликованной в [179]. Другие реактивы и растворители были получены из коммерческих источников и использовались без дополнительной очистки.

4.1.2. Общие методы

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинах Merck 60 F₂₅₄SiO₂ со смесью гексан:хлороформ 1:1 (об:об) в качестве элюента.

Спектры ¹H ЯМР записывали на спектрометре Bruker (Германия) с частотой 400 МГц.

Масс-спектрометрию высокого разрешения ESI-MS (способ ионизации – электроспрей) проводили на приборе Bruker APEX-Qe ESI FT-ICR (США) с использованием ацетонитрила в качестве растворителя.

Гидродинамический диаметр и ζ -потенциал наночастиц в воде оценивали при комнатной температуре (около 20 °С) на приборе Photocor Compact-Z (Россия) при $\lambda = 659$ нм и $\theta = 90^\circ$.

Ультразвуковые эксперименты проводились в ультразвуковой установке (USB300У, ИТА), оснащенной устройством контроля температуры на частотах 22 кГц, 30 кГц, 45 кГц, 70 кГц, 80 кГц, 100 кГц, 250 кГц, 270 кГц, 280 кГц, 290 кГц или 300 кГц с переменной выходной мощностью от 120 Вт до 300 Вт. Ультразвуковое облучение подавалось со дна установки в воду с помощью шести связанных волноводов. Для каждого эксперимента реакционную смесь загружали в пробирку, затем помещали в водяную баню и фиксировали в одном и том же положении на время обработки ультразвуком.

Элементный анализ проводили с использованием анализатора элементного состава Perkin-Elmer.

СЭМ-изображения были получены с помощью электронного микроскопа JEOL JSM-6490LV при мощности 15 кВ и СЭМ-детектора (размер электронного луча 30, в высоком вакууме). Образцы для испытаний были покрыты слоем платины толщиной 20 нм (40 секунд при силе тока 40 мА) в установке для автоматического тонкого нанесения покрытий JEOL JFC-1600.

АСМ-изображения были получены на многорежимном атомно-силовом микроскопе Solver Bio (Olympus).

УФ-спектры записывали на спектрофотометре Mettler UV5.

4.2. Синтез селенсодержащих производных хитозана

В традиционных условиях 0.5 г хитозана растворяли в 1 % уксусной кислоте (20 мл), рН доводили до 3; затем добавляли 2.2, 6 или 13.5 экв. 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазола[4,5-а]пиридин-4-ия бромида, после чего реакционные смеси перемешивали при 60°С в течение 7 часов. Образовавшиеся полимеры осаждали добавлением 25 мл ацетона. Осажденные полимеры растворяли в воде, подвергали диализу против дистиллированной воды и сушили лиофильно.

Синтез указанных выше производных хитозана в ультразвуковых условиях отличается от синтеза в традиционных условиях тем, что использовалось 0.5, 1 или 1.7 экв. 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромида, а реакционные смеси обрабатывали ультразвуковым облучением с частотой 80 кГц, 250 Вт в течение 12 мин при 25°C.

В качестве эталонного сигнала ($I(I, I', I'') = 1$) был выбран сигнал аномерных протонов всех типов звеньев (I, I', I''). Затем рассчитывали общую степень замещения как $CЗ = (I(2,3,4,5,6,7) - 6)/2$. Степень *N*-замещения рассчитывали как $CЗ_N = I(I')$. Поэтому степень *O*-замещения рассчитывали как $CЗ_O = CЗ - CЗ_N$, где *I* – интегральные интенсивности соответствующих сигналов. Отнесение сигналов с нумерацией протонов дана на **рисунке 3**.

4.3. Синтез селенсодержащих производных хитина

0.5 г хитина диспергировали в воде, затем добавляли 3, 5 или 8 экв. 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромида, после чего реакционные смеси обрабатывали ультразвуковым облучением с частотой 90 кГц, 250 Вт в течение 25 мин при 25°C. Образовавшиеся полимеры осаждали добавлением 25 мл ацетона. Осажденные полимеры растворяли в воде, подвергали диализу против дистиллированной воды и сушили лиофильно.

Степень замещения (или общую степень *N*- и *O*-замещения) рассчитывали по формуле $CЗ = CЗ_{N,O} = (I(2,3,4,5,6,7) - 6)/2$, а $I(I) + I(I') = 1$. Степень *N*-замещения рассчитывалась как $CЗ_N = I(I')$, а $I(I) + I(I') = 1$, где *I* – интегральные интенсивности соответствующих сигналов. Отнесение сигналов с нумерацией протонов дана на **рисунке 5**.

4.4. Получение наночастиц селенсодержащих производных хитозана и хитина

Наночастицы получали растворением 20 мг производного хитозана или хитина в 20 мл дистиллированной воды. После 3-х часового перемешивания быстро добавляли 0.25% водный раствор триполифосфата натрия (ТПФ). Полученную суспензию наночастиц центрифугировали при 17000 об/мин и 2 °C в течение 40

мин с использованием центрифуги Optima MAX-XP (Beckman Coulter). Осажденные наночастицы редиспергировали в 20 мл воды и лиофилизировали.

4.5. Модельная реакция ципрофлоксацина с *n*-бутиламином

0.1 г ципрофлоксацина растворяли в 1 %-ном водном растворе уксусной кислоты (10 мл), затем добавляли 1.1 экв. *n*-бутиламина, 1.3 экв. ДЦК и 1.3 экв. NHS. Реакционную смесь обрабатывали ультразвуком при частоте 22–300 кГц и мощности 120–300 Вт. Протекание реакции контролировали с помощью ТСХ. Продукт очищали колоночной хроматографией (SiO₂, 40–60 mesh, элюент – хлороформ/ацетон 15/1, об./об.).

Для C₂₁H₂₄FN₄O₂ найдено, %: С 65.35, Н 7.02, N 14.56 (рассчитано, %: С 65.27, Н 7.04, N 14.50); ESI-MS, *m/z*: 387.2194, [M+H]⁺ (вычислено 387.2196); ¹H ЯМР, δ, CD₃OD: 0.91, m, 3H, 1.06–1.48 3m, 6H, 2.77, t, 4H, 3.23, t, 2H, 3.49, t, 4H, 4.15, m, 1H, 6.05, d, 1H, 8.00, d, 1H, 9.01, s, 1H.

4.6. Синтез конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан, в которых ципрофлоксацин непосредственно присоединен к полимерной цепи (без спейсера, схема 9, система 1; таблица 12)

В традиционных условиях 0.5 г хитозана растворяли в 1 % уксусной кислоте (20 мл), pH раствора доводили до 3; затем добавляли 0.5, 1.8 или 6.5 экв. ципрофлоксацина, ДЦК и NHS, после чего реакционные смеси перемешивали при 50 °С в течение 5 часов. Образовавшиеся полимеры осаждали добавлением 25 мл ацетона. Осажденные полимеры растворяли в воде, подвергали диализу против дистиллированной воды и сушили лиофильно.

Синтез указанных выше производных хитозана в ультразвуковых условиях отличается от синтеза в традиционных условиях тем, что использовалось 0.3, 1.0 или 3.5 экв. ципрофлоксацина, ДЦК и NHS, а реакционные смеси обрабатывали ультразвуковым облучением с частотой 100 кГц, 280 Вт в течение 20 мин при 50 °С.

В качестве эталонного сигнала ($I(I',I'') = 1$) был выбран сигнал аномерных протонов всех типов звеньев (I, I', I''). Степень замещения рассчитывали как $SZ = I(I')$, где I – интегральные интенсивности соответствующих сигналов. Отнесение сигналов с нумерацией протонов дана на **рисунке 8**.

4.7. Синтез конъюгатов ципрофлоксацин-хитозан, в которых ципрофлоксацин связан с полимерной цепью через рН-чувствительный спейсер (схема 9, система 5; таблица 15)

4.7.1. Синтез гидразона 1 (схема 12, А)

Ципрофлоксацин (0.5 г) растворяли в метаноле (10 мл), затем добавляли 2 экв. гидразингидрата и 1 каплю трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь перемешивали в течении 6 часов. Растворитель удаляли в вакууме, продукт очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , 40–60 mash, элюент – гексан/этилацетат 8/1, об./об.).

Для $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{FN}_5\text{O}_2$ найдено, %: С 59.18, Н 5.87, N 20.23 (рассчитано, %: С 59.12, Н 5.84, N 20.25); ESI-MS, m/z : 346.1675, $[\text{M}+\text{H}]^+$ (вычислено 346.1679); ^1H ЯМР, δ , CD_3OD : 1.09 and 1.37 two m, 4H, 2.80, t, 4H, 3.45, t, 4H, 4.14, m, 1H, 5.89, s, 1H, 6.00, br s, 2H, 7.50, s, 1H, 8.40, s, 1H, 15.10 br s, 1H.

4.7.2. Синтез соединения 2 (схема 12, В)

Гидразон **1** растворяли в метаноле, затем добавляли 1 каплю трифторуксусной кислоты и 3.5 экв. глиоксаля. Реакционную смесь перемешивали в течении 5 часов. Растворитель удаляли в вакууме, полученный продукт очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , 40–60 mash, элюент – гексан/этилацетат 10/1, об./об.).

Для $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{FN}_5\text{O}_3$ найдено, %: С 59.23, Н 5.26, N 18.15 (рассчитано, %: С 59.21, Н 5.23, N 18.17); ESI-MS, m/z : 386.1624, $[\text{M}+\text{H}]^+$ (вычислено 386.1628); ^1H ЯМР, δ , CD_3OD : 1.09 and 1.37 two m, 4H, 2.80, t, 4H, 3.45, t, 4H, 4.15, m, 1H, 5.90, s, 1H, 7.52, s, 1H, 8.25, s, 1H, 8.45, s, 1H, 9.70, s, 1H, 15.11 br s, 1H.

4.7.3. Конъюгация соединения 2 с хитозаном (схема 12, С)

В традиционных условиях 0.5 г хитозана растворяли в 1 % уксусной кислоте (20 мл), рН раствора доводили до 3; затем добавляли 0.9, 1.7 или 3.5 экв. соединения 2, после чего реакционные смеси перемешивали при 15 °С в течение 3 часов. Образовавшиеся полимеры осаждали добавлением 25 мл ацетона. Осажденные полимеры промывали ацетоном, метанолом, этанолом и сушили в вакууме.

Синтез указанных выше производных хитозана в ультразвуковых условиях отличается от синтеза в традиционных условиях тем, что использовалось 0.5, 0.9 или 1.6 экв. соединения 2, а реакционные смеси обрабатывали ультразвуковым облучением с частотой 80 кГц, 250 Вт в течение 20 мин при 25 °С.

В качестве эталонного сигнала ($I(I',I'') = 1$) был выбран сигнал аномерных протонов всех типов звеньев (I, I', I''). Степень замещения рассчитывали как $SZ = I(I')$, где I – интегральные интенсивности соответствующих сигналов. Отнесение сигналов с нумерацией протонов дана на рисунке 10.

4.8. Приготовление незагруженных ципрофлоксацином наночастиц (схема 9, система 2; таблица 13 и таблица 16)

C-CS-I-M, **C-CS-II-M** или **C-CS-III-M** растворяли в 1 % уксусной кислоте до концентрации 1 мг/мл, рН раствора доводили до 7.0 добавлением гидрокарбоната натрия. Суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 5 минут (30 кГц, 300 Вт). Полученные наночастицы центрифугировали, промывали водой с последующим центрифугированием (3 раза), редиспергировали в воде и сушили лиофильно.

Наночастицы, описанные в таблице 16, получали растворением 20 мг **C-SP-CS-I-M**, **C-SP-CS-II-M** или **C-SP-CS-III-M** в 20 мл 1 % уксусной кислоты. После 3-х часового перемешивания быстро добавляли 3.2, 2.1 или 1.5 мл 0.25 % водного раствора триполифосфата натрия (ТПФ). Полученную суспензию наночастиц центрифугировали, промывали водой с последующим центрифугированием (3 раза), редиспергировали в воде и сушили лиофильно.

4.9. Приготовление загруженных ципрофлоксацином наночастиц (схема 9, система 3; таблица 17 и схема 9, системы 4, 6; таблица 18)

5 мг ципрофлоксацина, растворенного в этаноле (1 мл), добавляли к 10 мг NPs-C-CS-I-M, NPs-C-CS-II-M или NPs-C-CS-III-M, суспендированных в воде (5 мл) с последующей обработкой ультразвуком на частоте 22 кГц, 120 Вт в течение 35 с. Затем наночастицы центрифугировали, чтобы отделить их от супернатанта. Отделенные наночастицы промывали водой и сушили лиофильно. Эффективность загрузки (ЭЗ) и эффективность инкапсуляции (ЭИ) рассчитывали с использованием следующих уравнений:

$$\text{ЭЗ} = [(m_{\text{(общий ципрофлоксацин)}} - m_{\text{(ципрофлоксацин в супернатанте)}}) / m_{\text{(общий ципрофлоксацин)}}] \times 100$$

$$\text{ЭИ} = [(m_{\text{(общее количество ципрофлоксацина)}} - m_{\text{(ципрофлоксацин в супернатанте)}}) / m_{\text{(загруженные наночастицы)}}] \times 100$$

Массу ципрофлоксацина в супернатанте определяли методом УФ-спектроскопии при длине волны 278 нм после добавления HCl до конечной концентрации 0.1 М (метод калибровочной кривой). Наночастицы (схема 9, система 4; таблица 15 часть 1 и схема 9, система 6; таблицу 15 часть 2) получали путем растворения 10 мг соответствующего полимера в 5 мл 1% уксусной кислоты. Затем добавляли 5 мг ципрофлоксацина в этаноле и при интенсивном перемешивании быстро добавляли 0.25% раствор ТПФ натрия (объем см. в таблице 15). Затем наночастицы центрифугировали, чтобы отделить их от супернатанта. Отделенные наночастицы промывали водой и сушили лиофильно. Для оценки эффективности загрузки и эффективности инкапсуляции после центрифугирования дисперсии наночастиц при 7500 об/мин в течение 40 мин, к осадку и супернатанту добавляли по 5 мл раствора хлорида кальция с концентрацией 10 мг/мл. Полученную смесь перемешивали в течение ночи, полученный триполифосфат кальция выпадал в осадок, смесь центрифугировали при 7500 об/мин в течение 15 мин и анализировали с помощью УФ-спектроскопии с использованием метода калибровочной кривой при 278 нм. Значения

эффективности загрузки и эффективности инкапсуляции рассчитывали, как описано выше.

4.10. Исследование кинетики высвобождения лекарств

Образец наночастиц или конъюгата массой 1 мг диспергировали или растворяли в буферном растворе (5 мл, pH = 6.5) и инкубировали при 32 °С при осторожном перемешивании. Через равные промежутки времени к 2 мл среды добавляли 0.5 мл воды (в случае наночастиц) или 0.5 мл 0.25 % натрия ТПФ (в случае конъюгатов). Полученные смеси ультрацентрифугировали при 4500 об/мин. Количество высвобожденного ципрофлоксацина в супернатанте определяли с помощью УФ-спектроскопии с использованием метода калибровочной кривой при 278 нм.

4.11. Антибактериальная активность

Антибактериальную активность наночастиц на основе хитозана *in vitro* оценивали методом диффузии в агар [109, 172, 234]. Антибактериальный эффект изучали в отношении *Staphylococcus aureus* (RCMB 010027) и *Escherichia coli* (RCMB 010051). Активность определяли путем измерения диаметра зоны ингибирования (в мм). Каждую зону ингибирования измеряли штангенциркулем три раза, чтобы получить среднее значение. В качестве референтных антибактериальных препаратов использовали ампициллин и гентамицин [108].

Антибактериальную активность *in vivo* (на белых крысах) проводили, как описано в [235].

4.12. Противогрибковая активность

Противогрибковую активность производных хитозана оценивали *in vitro* в отношении грибов *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) и *Geotrichum candidum* (*G. candidum*) на чашах с декстрозным агаром используя метод диффузии в агар с амфотерицином В в качестве эталонного противогрибкового препарата [236]. Культуру грибов очищали методом односпорового выделения. Антимикробный

эффект в отношении грибов оценивали так же, как и в отношении бактерий, как описано в разделе 4.11.

4.13. МТТ-тест

МТТ-тест выполняли, как описано в [237]. Растворы тестируемых соединений готовили серийными разведениями в культуральной среде альфа-МЕМ с получением растворов с концентрацией 10, 300 и 1000 мкг/мл. Линии клеток НЕК-293 культивировали в альфа-МЕМ на культуральных планшетах при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки высевают с плотностью 1×10⁵ клеток/лунку в 96-луночный планшет в течение 24 часов. К конфлюэнтному монослою клеток, культивируемых в 96-луночном планшете, добавляли по 0.1 мл каждого из тестируемых растворов. Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки дважды промывали фосфатным буфером, после чего добавляли 0.1 мл 3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ, 0.5 мкг/мл) в фосфатный буфер и инкубировали в течение 4 часов. Затем супернатант заменяли 0.1 мл 96% этанола и измеряли оптическую плотность при 535 нм.

4.14. Исследование токсичности

Токсичность *in vitro* оценивали с помощью МТТ-теста. Растворы или наносuspензии испытуемых образцов готовили путем серийного разведения в культуральной среде альфа-МЕМ. Объем 0.1 мл каждой наносuspензии добавляли к конфлюэнтному монослою клеток, культивируемых в 96-луночном планшете. Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки дважды промывали PBS, затем добавляли 0.1 мл 3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ, 0.5 мкг/мл) в PBS и инкубировали в течение 4 часов. Затем супернатант заменяли 0.1 мл 96% этанола и измеряли оптическую плотность при 535 нм.

Токсичность *in vivo* на белых крысах изучали, как описано в [235].

4.15. Статистический анализ

Статистическую значимость различий между выборками определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием программного обеспечения JMP 5.0.1 (SAS Campus Drive, Cary, NC). Средние значения, где это уместно, сравнивали, применяя критерий Стьюдента t -тест при уровне значимости $p < 0.05$.

Основные результаты и выводы

1. Выявлены оптимальные акустические параметры для зеленого ультразвукового синтеза селенсодержащих производных хитина и хитозана при обработке данных полисахаридов 3-(хлорметил)-[1,2,4]селенадиазоло[4,5-а]пиридин-4-ия бромидом, позволяющие проводить синтез в самом экологически чистом растворителе (воде) и минимизировать количество алкилирующего реагента. С использованием данного подхода получены первые селенсодержащие производные хитина и хитозана, а также наночастицы на их основе.

2. Установлено, что ДЦК-опосредованное взаимодействие между группами $COOH$ и NH_2 с образованием амидной связи интенсифицируется ультразвуком в воде. Используя этот подход, были получены первые конъюгаты ципрофлоксацин-хитозан, не содержащие спейсера. Также синтезированы первые конъюгаты ципрофлоксацин-хитозан, несущие антибиотик, присоединенный к полимерной цепи через рН-чувствительный спейсер. Кроме того, разработано три типа загруженных ципрофлоксацином наночастиц на основе обоих конъюгатов со спейсером или без спейсера.

3. Наночастицы селенсодержащих производных хитозана оказались высокоэффективными зелеными катализаторами окисления 1-фенилэтилового спирта в ацетофенон бромом при комнатной температуре. Использование упомянутых систем позволило осуществить замену более токсичного растворителя хлорорганического дихлорметана на более экологичный ацетон.

4. Обнаружена высокая антибактериальная и противогрибковая активность полученных селенсодержащих производных хитина и хитозана, а также наночастиц на их основе. Противомикробная активность полученных селенсодержащих систем превосходит действие классических антибиотиков (ампициллина и гентамицина) и противогрибкового препарата амфотерицина В. Кроме того, разработанные противомикробные системы на основе хитина и хитозана практически нетоксичны. Полученные результаты являются одними из лучших в литературе и имеют потенциал для дальнейших исследований *in vivo*, как

альтернатива традиционным антибиотикам, что важно для решения экологической задачи минимизации потребления антибиотиков.

5. Загруженные ципрофлоксацином самоорганизующиеся наночастицы на основе конъюгатов без спейсера характеризуются хорошим профилем высвобождения антибиотика. Антибактериальный эффект данных систем *in vivo* превосходит эффект исходного ципрофлоксацина. Токсичность же данных наночастиц *in vivo* была почти идентична токсичности хитозана, который считается нетоксичным соединением. Данные наночастицы представляют несомненный интерес как системы пролонгированного высвобождения ципрофлоксацина, позволяющие более чем в 3 раза снизить дозу антибиотика, что также важно в свете экологической тенденции снижения уровня потребления антибиотиков.

Список использованной литературы

1. Fundamentals of sustainable chemical science. / Manahan S. E.: CRC Press, 2009.
2. Environmental chemistry, Tenth edition. / Manahan S., 2017. – 1-752 с.
3. Constable D. J. C. Green and sustainable chemistry - The case for a systems-based, interdisciplinary approach // *iScience*. – 2021. – V. 24, № 12. – P. 103489.
4. Zhou J., Zhang L. Solubility of cellulose in NaOH/urea aqueous solution // *Polymer Journal*. – 2000. – V. 32, № 10. – P. 866-870.
5. Hu X., Du Y., Tang Y., Wang Q., Feng T., Yang J., Kennedy J. F. Solubility and property of chitin in NaOH/urea aqueous solution // *Carbohydrate Polymers*. – 2007. – V. 70, № 4. – P. 451-458.
6. Li G., Du Y., Tao Y., Liu Y., Li S., Hu X., Yang J. Dilute solution properties of four natural chitin in NaOH/urea aqueous system // *Carbohydrate Polymers*. – 2010. – V. 80, № 3. – P. 970-976.
7. Chang C., Chen S., Zhang L. Novel hydrogels prepared via direct dissolution of chitin at low temperature: Structure and biocompatibility // *Journal of Materials Chemistry*. – 2011. – V. 21, № 11. – P. 3865-3871.
8. Ding B., Cai J., Huang J., Zhang L., Chen Y., Shi X., Du Y., Kuga S. Facile preparation of robust and biocompatible chitin aerogels // *Journal of Materials Chemistry*. – 2012. – V. 22, № 12. – P. 5801-5809.
9. Fang Y., Duan B., Lu A., Liu M., Liu H., Xu X., Zhang L. Intermolecular Interaction and the Extended Wormlike Chain Conformation of Chitin in NaOH/Urea Aqueous Solution // *Biomacromolecules*. – 2015. – V. 16, № 4. – P. 1410-1417.
10. Tamura H., Tsuruta Y., Tokura S. Preparation of chitosan-coated alginate filament // *Materials Science and Engineering C*. – 2002. – V. 20, № 1-2. – P. 143-147.
11. Tamura H., Nagahama H., Tokura S. Preparation of chitin hydrogel under mild conditions // *Cellulose*. – 2006. – V. 13, № 4. – P. 357-364.

12. Tamura H., Sawada M., Nagahama H., Higuchi T., Tokura S. Influence of amide content on the crystal structure of chitin // *Holzforschung*. – 2006. – V. 60, № 5. – P. 480-484.
13. Austin P. R. Chitin solution // *Chitin solution*. – 1977.
14. Vincendon M. ¹H NMR study of the chitin dissolution mechanism // *Makromol. Chem.* – 1985. – V. 186, № 9. – P. 1787-1795.
15. Rogers R. D., Seddon K. R. Ionic Liquids - Solvents of the Future? // *Science*. – 2003. – V. 302, № 5646. – P. 792-793.
16. Deetlefs M., Seddon K. R. Ionic liquids: Fact and fiction // *Chimica Oggi*. – 2006. – V. 24, № 2. – P. 16-23.
17. Timken H. K. C., Elomari S., Trumbull S., Cleverdon R. Chloroaluminate-based ionic liquid catalysts for ethylene-isoalkane alkylation for manufacture of high-octane gasoline alkylate // *US Pat.* – 2006.
18. Swatloski R. P., Holbrey J. D., Weston J. L., Rogers R. D. Preparation of magnetic cellulose composites using ionic liquids // *Chimica Oggi*. – 2006. – V. 24, № 2. – P. 31-35.
19. Remsing R. C., Swatloski R. P., Rogers R. D., Moyna G. Mechanism of cellulose dissolution in the ionic liquid 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride: A ¹³C and ^{35/37}Cl NMR relaxation study on model systems // *Chemical Communications*. – 2006.10.1039/b600586c № 12. – P. 1271-1273.
20. Turner M. B., Spear S. K., Holbrey J. D., Daly D. T., Rogers R. D. Ionic liquid-reconstituted cellulose composites as solid support matrices for biocatalyst immobilization // *Biomacromolecules*. – 2005. – V. 6, № 5. – P. 2497-2502.
21. Swatloski R. P., Holbrey J. D., Spear S. K., Rogers R. D. Ionic Liquids for the dissolution and regeneration of cellulose // *Molten Salts XIII*. – 2002. – P. 155-164.
22. Turner M. B., Spear S. K., Holbrey J. D., Rogers R. D. Production of bioactive cellulose films reconstituted from ionic liquids // *Biomacromolecules*. – 2004. – V. 5, № 4. – P. 1379-1384.
23. Van Rantwijk F., Lau R. M., Sheldon R. A. Biocatalytic transformations in ionic liquids // *Trends in Biotechnology*. – 2003. – V. 21, № 3. – P. 131-138.

24. Sheldon R. A., Lau R. M., Sorgedraeger M. J., van Rantwijk F., Seddon K. R. Biocatalysis in ionic liquids // *Green Chemistry*. – 2002. – V. 4, № 2. – P. 147-151.
25. Kmentová I., Gotov B., Gajda V., Toma S. The Sonogashira Reaction in Ionic Liquids // *Monatshefte fur Chemie*. – 2003. – V. 134, № 4. – P. 545-549.
26. Schucker R. C., Baird J., William C. Electrochemical oxidation of sulfur compounds in naphtha using ionic liquids // *Electrochemical Oxidation of Sulfur Compounds in Naphtha Using Ionic Liquids*. – 2019.
27. Abbott A. P., Capper G., McKenzie K. J., Glidle A., Ryder K. S. Electropolishing of stainless steels in a choline chloride based ionic liquid: An electrochemical study with surface characterisation using SEM and atomic force microscopy // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2006. – V. 8, № 36. – P. 4214-4221.
28. Liu Q. X., El Abedin S. Z., Endres F. Electroplating of mild steel by aluminium in a first generation ionic liquid: A green alternative to commercial Al-plating in organic solvents // *Surface and Coatings Technology*. – 2006. – V. 201, № 3-4. – P. 1352-1356.
29. Zein El Abedin S., Moustafa E. M., Hempelmann R., Natter H., Endres F. Electrodeposition of nano- and macrocrystalline aluminium in three different air and water stable ionic liquids // *ChemPhysChem*. – 2006. – V. 7, № 7. – P. 1535-1543.
30. Natter H., Bukowski M., Hempelmann R., Zein El Abedin S., Moustafa E. M., Endres F. Electrochemical deposition of nanostructured metals and alloys from ionic liquids // *Zeitschrift fur Physikalische Chemie*. – 2006. – V. 220, № 10-11. – P. 1275-1291.
31. Abbott A. P., Capper G., Swain B. G., Wheeler D. A. Electropolishing of stainless steel in an ionic liquid // *Transactions of the Institute of Metal Finishing*. – 2005. – V. 83, № 1. – P. 51-53.
32. Abbott A. P., Capper G., Davies D. L., Munro H., Rasheed R. K., Tambyrajah V. Electrochemical studies of ambient temperature ionic liquids based on choline chloride / Edited by. – ed. –: 2003. – V.: – Number of 439-452 c. Electrochemical studies of ambient temperature ionic liquids based on choline chloride. ACS Symposium Series. /

Abbott A. P., Capper G., Davies D. L., Munro H., Rasheed R. K., Tambyrajah V.: 2003. – C. 439-452 c.

33. Seddon K. R. Ionic liquids for clean technology // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 1997. – V. 68, № 4. – P. 351-356.

34. Chinn D., Vu D. Q., Driver M. S., Boudreau L. C. CO₂ removal from gas using ionic liquid absorbents // *CO₂ Removal from Gas Using Ionic Liquid Absorbents*. – 2006.

35. Tempel D. J., Henderson P. B., Brzozowski J. R., Pearlstein R. M., Garg D. Ionic Liquid Based Mixtures for Gas Storage and Delivery // *Ionic Liquid Based Mixtures for Gas Storage and Delivery*. – 2006.

36. Anderson J. L., Armstrong D. W., Wei G. Ionic liquids in analytical chemistry // *Analytical Chemistry*. – 2006. – V. 78, № 9. – P. 2893-2902.

37. Xie H., Zhang S., Li S. Chitin and chitosan dissolved in ionic liquids as reversible sorbents of CO₂ // *Green Chemistry*. – 2006. – V. 8, № 7. – P. 630-633.

38. Walther P., Ota A., Müller A., Hermanutz F., Gähr F., Buchmeiser M. R. Chitin Foils and Coatings Prepared from Ionic Liquids // *Macromolecular Materials and Engineering*. – 2016. – V. 301, № 11. – P. 1337-1344.

39. Yu J., Qiao Y., Jin L., Ma C., Paterson N., Sun L. Removal of toxic and alkali/alkaline earth metals during co-thermal treatment of two types of MSWI fly ashes in China // *Waste Management*. – 2015. – V. 46. – P. 287-297.

40. Baum S. L., Suruda A. J. Toxic hepatitis from dimethylacetamide // *International Journal of Occupational and Environmental Health*. – 1997. – V. 3, № 1. – P. 1-4.

41. Radomski J. L., Fuyat H. N., Nelson A. A., Smith P. K. The toxic effects, excretion and distribution of lithium chloride // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. – 1950. – V. 100, № 4 :1. – P. 429-444.

42. Sanati A., Malayeri M. R., Busse O., Weigand J. J. Utilization of ionic liquids and deep eutectic solvents in oil operations: Progress and challenges // *Journal of Molecular Liquids*. – 2022. – V. 361. – P. 119641.

43. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications // Progress in Polymer Science (Oxford). – 2006. – V. 31, № 7. – P. 603-632.
44. Ravi Kumar M. N. V. A review of chitin and chitosan applications // Reactive and Functional Polymers. – 2000. – V. 46, № 1. – P. 1-27.
45. Dutta P. K., Duta J., Tripathi V. S. Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications // Journal of Scientific and Industrial Research. – 2004. – V. 63, № 1. – P. 20-31.
46. Sashiwa H., Aiba S. I. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials // Progress in Polymer Science (Oxford). – 2004. – V. 29, № 9. – P. 887-908.
47. Shahidi F., Arachchi J. K. V., Jeon Y. J. Food applications of chitin and chitosans // Trends in Food Science and Technology. – 1999. – V. 10, № 2. – P. 37-51.
48. Ma Y., Xu S., Yue P., Cao H., Zou Y., Wang L., Long H., Wu S., Ye Q. Synthesis and evaluation of water-soluble imidazolium salt chitin with broad-spectrum antimicrobial activity and excellent biocompatibility for infected wound healing // Carbohydrate Polymers. – 2023. – V. 306. – P. 120575.
49. Xie Q., Yang J., Cai J., Shen F., Gu J. Homogeneous preparation of water-soluble products from chitin under alkaline conditions and their cell proliferation *in vitro* // International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. – V. 231. – P. 123321.
50. Luan F., Xu Z., Wang K., Qi X., Guo Z. Synthesis of Water-Soluble Sulfonated Chitin Derivatives for Potential Antioxidant and Antifungal Activity // Marine Drugs. – 2022. – V. 20, № 11. – P. 668.
51. Kritchenkov A. S., Kletskov A. V., Egorov A. R., Tskhovrebov A. G., Kurliuk A. V., Zhaliashniak N. V., Shakola T. V., Khrustalev V. N. New water-soluble chitin derivative with high antibacterial properties for potential application in active food coatings // Food Chemistry. – 2021. – V. 343. – P. 128696.
52. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Abramovich R. A., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Kultyshkina E. K., Ballesteros Meza M. J., Pavlova A. V., Suchkova E. P., Le Nhat Thuy G., Van Tuyen N., Khrustalev V. N. Water-soluble triazole chitin derivative and its based nanoparticles: Synthesis, characterization, catalytic and antibacterial properties // Carbohydrate Polymers. – 2021. – V. 257. – P. 117593.

53. Kritchenkov A. S., Kletskov A. V., Egorov A. R., Kurliuk A. V., Rubanik V. V., Khrustalev V. N. New water-soluble derivatives of chitin and their based nanoparticles: Antibacterial and catalytic activity // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – V. 163. – P. 2005-2012.

54. Kritchenkov A. S., Kletskov A. V., Egorov A. R., Kurasova M. N., Tskhovrebov A. G., Khrustalev V. N. Ultrasound and click chemistry lead to a new chitin chelator. Its Pd(II) complex is a recyclable catalyst for the Sonogashira reaction in water // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – V. 252. – P. 117167.

55. Bashir S., Teo Y. Y., Ramesh S., Ramesh K., Khan A. A. N-succinyl chitosan preparation, characterization, properties and biomedical applications: a state of the art review // *Reviews in Chemical Engineering*. – 2015. – V. 31, № 6. – P. 563-597.

56. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Volkova O. V., Zabodalova L. A., Suchkova E. P., Yagafarov N. Z., Kurasova M. N., Dysin A. P., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Khrustalev V. N. Active antibacterial food coatings based on blends of succinyl chitosan and triazole betaine chitosan derivatives // *Food Packaging and Shelf Life*. – 2020. – V. 25. – P. 100534.

57. Skorik Y. A., Kritchenkov A. S., Moskalenko Y. E., Golyshev A. A., Raik S. V., Whaley A. K., Vasina L. V., Sonin D. L. Synthesis of N-succinyl- and N-glutaryl-chitosan derivatives and their antioxidant, antiplatelet, and anticoagulant activity // *Carbohydrate Polymers*. – 2017. – V. 166. – P. 166-172.

58. Xu W., Xiao Y., Luo P., Fan L. Preparation and characterization of C-phycocyanin peptide grafted N-succinyl chitosan by enzyme method // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – V. 113. – P. 841-848.

59. Yamaguchi R., Arai Y., Itoh T., Hirano S. Preparation of partially N-succinylated chitosans and their cross-linked gels // *Carbohydrate Research*. – 1981. – V. 88, № 1. – P. 172-175.

60. Pei L., Cai Z., Shang S., Song Z. Synthesis and antibacterial activity of alkylated chitosan under basic ionic liquid conditions // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2014. – V. 131, № 7.

61. Sun X., Li J., Shao K., Su C., Bi S., Mu Y., Zhang K., Cao Z., Wang X., Chen X., Feng C. A composite sponge based on alkylated chitosan and diatom-biosilica for rapid hemostasis // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – V. 182. – P. 2097-2107.

62. Bi S., Hu S., Zhou Z., Kong M., Liu Y., Feng C., Cheng X., Chen X. The green and stable dissolving system based on KOH/urea for homogeneous chemical modification of chitosan // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – V. 120. – P. 1103-1110.

63. Almeida E. V. R., Frollini E., Castellan A., Coma V. Chitosan, sisal cellulose, and biocomposite chitosan/sisal cellulose films prepared from thiourea/NaOH aqueous solution // *Carbohydrate Polymers*. – 2010. – V. 80, № 3. – P. 655-664.

64. Nie J., Wang Z., Zhang J., Yang L., Pang Y., Hu Q. High strength chitosan rod prepared via LiOH/urea solvent through centrifugation induced orientation processing // *RSC Advances*. – 2015. – V. 5, № 83. – P. 68243-68250.

65. Nie J., Wang Z., Hu Q. Difference between Chitosan Hydrogels via Alkaline and Acidic Solvent Systems // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6, № 1. – P. 36053.

66. Wang Z., Nie J., Qin W., Hu Q., Tang B. Z. Gelation process visualized by aggregation-induced emission fluorogens // *Nature Communications*. – 2016. – V. 7, № 1. – P. 12033.

67. Assis H. C., Nascimento G. C. d., Roperto R., Sousa-Neto M. D., Lopes-Olhê F. C. Can Carbodiimide (EDC) and Chitosan Cross-linking Agents Effect the Longevity of Fiberglass Posts Luted with Different Types of Composite Cements to Root Dentin? // *The journal of adhesive dentistry*. – 2023. – V. 25, № 1. – P. 39-50.

68. Fitriana H. N., Lee J., Lee S., Moon M., Lee Y. R., Oh Y.-K., Park M., Lee J.-S., Song J., Lee S. Y. Surface Modification of a Graphite Felt Cathode with Amide-Coupling Enhances the Electron Uptake of *Rhodobacter sphaeroides* // *Applied Sciences*. – 2021. – V. 11, № 16. – P. 7585.

69. Costa F., Maia S., Gomes J., Gomes P., Martins M. C. L. Characterization of hLF1–11 immobilization onto chitosan ultrathin films, and its effects on antimicrobial activity // *Acta Biomaterialia*. – 2014. – V. 10, № 8. – P. 3513-3521.

70. Shen J., Nada A. A., Abou-Zeid N. Y., Hudson S. M. Synthesis of chitosan iodoacetamides via carbodiimide coupling reaction: Effect of degree of substitution on the hemostatic properties // *Carbohydrate Polymers*. – 2020. – V. 229. – P. 115522.

71. Dubashynskaya N. V., Golovkin A. S., Kudryavtsev I. V., Prikhodko S. S., Trulioff A. S., Bokatyi A. N., Poshina D. N., Raik S. V., Skorik Y. A. Mucoadhesive cholesterol-chitosan self-assembled particles for topical ocular delivery of dexamethasone // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – V. 158. – P. 811-818.

72. Donia A. M., Atia A. A., Elwakeel K. Z. Selective separation of mercury(II) using magnetic chitosan resin modified with Schiff's base derived from thiourea and glutaraldehyde // *Journal of Hazardous Materials*. – 2008. – V. 151, № 2-3. – P. 372-379.

73. Guo Z., Xing R., Liu S., Yu H., Wang P., Li C., Li P. The synthesis and antioxidant activity of the Schiff bases of chitosan and carboxymethyl chitosan // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2005. – V. 15, № 20. – P. 4600-4603.

74. Antony R., Arun T., Manickam S. T. D. A review on applications of chitosan-based Schiff bases // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – V. 129. – P. 615-633.

75. Guo Z., Xing R., Liu S., Zhong Z., Ji X., Wang L., Li P. Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, N-substituted chitosan and quaternized chitosan // *Carbohydrate Research*. – 2007. – V. 342, № 10. – P. 1329-1332.

76. Dos Santos J. E., Dockal E. R., Cavalheiro E. T. G. Synthesis and characterization of Schiff bases from chitosan and salicylaldehyde derivatives // *Carbohydrate Polymers*. – 2005. – V. 60, № 3. – P. 277-282.

77. Pant A., Jain R., Ahammad S. Z., Ali S. W. Removal of antibiotic resistance genes from wastewater using diethylaminoethyl cellulose as a promising adsorbent // *Journal of Water Process Engineering*. – 2023. – V. 55. – P. 104109.

78. Критченков А. С. Новые функционализированные производные хитозана: подходы к получению и свойства; РУДН, 2021.

79. Kushwaha D., Dwivedi P., Kuanar S. K., Tiwari V. K. Click Reaction in Carbohydrate Chemistry: Recent Developments and Future Perspective // Current Organic Synthesis. – 2013. – V. 10, № 1. – P. 90-135.

80. Elchinger P. H., Faugeras P. A., Boens B., Brouillette F., Montplaisir D., Zerrouki R., Lucas R. Polysaccharides: The "Click" Chemistry Impact // Polymers. – 2011. – V. 3, № 4. – P. 1607-1651.

81. Kulbokaite R., Ciuta G., Netopilik M., Makuska R. N-PEG'ylation of chitosan via "click chemistry" reactions // Reactive & Functional Polymers. – 2009. – V. 69, № 10. – P. 771-778.

82. Oliveira J. R., Martins M. C. L., Mafra L., Comes P. Synthesis of an O-alkynyl-chitosan and its chemoselective conjugation with a PEG-like amino-azide through click chemistry // Carbohydrate Polymers. – 2012. – V. 87, № 1. – P. 240-249.

83. Peng P., Cao X. F., Peng F., Bian J., Xu F., Sun R. C. Binding cellulose and chitosan via click chemistry: Synthesis, characterization, and formation of some hollow tubes // Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry. – 2012. – V. 50, № 24. – P. 5201-5210.

84. Yuan W. Z., Zhao Z. D., Gu S. Y., Ren J. Synthesis, Characterization, and Properties of Amphiphilic Chitosan Copolymers with Mixed Side Chains by Click Chemistry // Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry. – 2010. – V. 48, № 15. – P. 3476-3486.

85. Kritchenkov A. S., Artemyev A. A., Skorik Y. A. // Polymer Science. – 2018. – V. (submitted).

86. Kritchenkov A. S., Skorik Y. A. Click reactions in chitosan chemistry // Russian Chemical Bulletin. – 2017. – V. 66, № 5. – P. 769-781.

87. Carvalho L. C. R., Queda F., Santos C. V. A., Marques M. M. B. Selective Modification of Chitin and Chitosan: En Route to Tailored Oligosaccharides // Chemistry-an Asian Journal. – 2016. – V. 11, № 24. – P. 3468-3481.

88. Cheaburu-Yilmaz C. N., Karavana S. Y., Yilmaz O. Functionalized Chitosan for Pharmaceutical Applications // Current Organic Synthesis. – 2017. – V. 14, № 6. – P. 785-797.

89. Kritchenkov A. S., Kletskov A. V., Egorov A. R., Tskhovrebov A. G., Kurliuk A. V., Zhaliashniak N. V., Shakola T. V., Khrustalev V. N. New water-soluble chitin derivative with high antibacterial properties for potential application in active food coatings // *Food Chemistry*. – 2021. – V. 343. – P. 128696.
90. Manyi-Loh C., Mamphweli S., Meyer E., Okoh A. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications // *Molecules*. – 2018. – V. 23, № 4. – P. 795.
91. Zhang Z., Wang B., Yuan H., Ma R., Huang J., Deng S., Wang Y., Yu G. Discharge inventory of pharmaceuticals and personal care products in Beijing, China // *Emerging Contaminants*. – 2016. – V. 2, № 3. – P. 148-156.
92. Spielmeier A., Petri M. S., Höper H., Hamscher G. Long-term monitoring of sulfonamides and tetracyclines in manure amended soils and leachate samples - A follow-up study // *Heliyon*. – 2020. – V. 6, № 8.
93. Kumar M., Jaiswal S., Sodhi K. K., Shree P., Singh D. K., Agrawal P. K., Shukla P. Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance // *Environment International*. – 2019. – V. 124. – P. 448-461.
94. Barancheshme F., Munir M. Strategies to Combat Antibiotic Resistance in the Wastewater Treatment Plants // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 8.
95. Kümmerer K. Significance of antibiotics in the environment // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2003. – V. 52, № 1. – P. 5-7.
96. Zhang Q.-s., Zhu S.-c. Visual interpretability for deep learning: a survey // *Frontiers of Information Technology & Electronic Engineering*. – 2018. – V. 19, № 1. – P. 27-39.
97. Isman M. B. Challenges of Pest Management in the Twenty First Century: New Tools and Strategies to Combat Old and New Foes Alike // *Frontiers in Agronomy*. – 2019. – V. 1.
98. Ishikawa N. F., Chikaraishi Y., Takano Y., Sasaki Y., Takizawa Y., Tsuchiya M., Tayasu I., Nagata T., Ohkouchi N. A new analytical method for determination of the nitrogen isotopic composition of methionine: Its application to aquatic ecosystems with

mixed resources // *Limnology and Oceanography: Methods*. – 2018. – V. 16, № 9. – P. 607-620.

99. Ho Y. B., Zakaria M. P., Latif P. A., Saari N. Degradation of veterinary antibiotics and hormone during broiler manure composting // *Bioresource Technology*. – 2013. – V. 131. – P. 476-484.

100. Wu M., Long Z., Xiao H., Dong C. Recent research progress on preparation and application of N, N, N-trimethyl chitosan // *Carbohydrate Research*. – 2016. – V. 434. – P. 27-32.

101. Li J., Zhuang S. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives // *European Polymer Journal*. – 2020. – V. 138. – P. 109984.

102. Ma Z., Garrido-Maestu A., Jeong K. C. Application, mode of action, and *in vivo* activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review // *Carbohydrate Polymers*. – 2017. – V. 176. – P. 257-265.

103. Ke C.-L., Deng F.-S., Chuang C.-Y., Lin C.-H. Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan // *Polymers*. – 2021. – V. 13, № 6. – P. 904.

104. Lan W., Du J., Sun Y., Xie J. Insight into the antibacterial activity and mechanism of chitosan caffeic acid graft against *Pseudomonas fluorescens* // *International Journal of Food Science & Technology*. – 2023. – V. 58, № 3. – P. 1317-1325.

105. Egorov A. R., Khubiev O., Rubanik V. V., Rubanik V. V., Lobanov N. N., Savilov S. V., Kirichuk A. A., Kritchenkov I. S., Tskhovrebov A. G., Kritchenkov A. S. The first selenium containing chitin and chitosan derivatives: Combined synthetic, catalytic and biological studies // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – V. 209. – P. 2175-2187.

106. Egorov A. R., Artemjev A. A., Kozyrev V. A., Sikaona D. N., Rubanik V. V., Rubanik Jr V. V., Kritchenkov I. S., Yagafarov N. Z., Khubiev O. M., Tereshina T. A., Kultyshkina E. K., Medjbour B., Khrustalev V. N., Kritchenkov A. S. Synthesis of Selenium-Containing Chitosan Derivatives and Their Antibacterial Activity // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2022. – V. 58, № 2. – P. 132-135.

107. Kumar M. N. V. R., Muzzarelli R. A. A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb A. J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives // Chemical Reviews. – 2004. – V. 104, № 12. – P. 6017-6084.

108. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Krytchankou I. S., Dubashynskaya N. V., Volkova O. V., Shakola T. V., Kurliuk A. V., Skorik Y. A. Synthesis of novel 1H-tetrazole derivatives of chitosan via metal-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition. Catalytic and antibacterial properties of [3-(1H-tetrazole-5-yl)ethyl]chitosan and its nanoparticles // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – V. 132. – P. 340-350.

109. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Skorik Y. A. Azide pre-click modification of chitosan: N-(2-azidoethyl)chitosan // Russian Chemical Bulletin. – 2018. – V. 67, № 10. – P. 1915-1919.

110. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Artemjev A. A., Kritchenkov I. S., Volkova O. V., Kiprushkina E. I., Zabodalova L. A., Suchkova E. P., Yagafarov N. Z., Tskhovrebov A. G., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Khrustalev V. N. Novel heterocyclic chitosan derivatives and their derived nanoparticles: Catalytic and antibacterial properties // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – V. 149. – P. 682-692.

111. Pereira L. A., da Silva Reis L., Batista F. A., Mendes A. N., Osajima J. A., Silva-Filho E. C. Biological properties of chitosan derivatives associated with the ceftazidime drug // Carbohydrate Polymers. – 2019. – V. 222. – P. 115002.

112. Dragostin O. M., Samal S. K., Dash M., Lupascu F., Pânzariu A., Tuchilus C., Ghetu N., Danciu M., Dubruel P., Pieptu D., Vasile C., Tatia R., Profire L. New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications // Carbohydrate Polymers. – 2016. – V. 141. – P. 28-40.

113. Abdelwahab H. E., Hassan S. Y., Yacout G. A., Mostafa M. A., El Sadek M. M. Synthesis and Biological Evaluation of New Imine- and Amino-Chitosan Derivatives // Polymers. – 2015. – V. 7, № 12. – P. 2690-2700.

114. Sun Z., Shi C., Wang X., Fang Q., Huang J. Synthesis, characterization, and antimicrobial activities of sulfonated chitosan // Carbohydrate Polymers. – 2017. – V. 155. – P. 321-328.

115. Kazemi M. S., Mohammadi Z., Amini M., Yousefi M., Tarighi P., Eftekhari S., Rafiee Tehrani M. Thiolated chitosan-lauric acid as a new chitosan derivative: Synthesis, characterization and cytotoxicity // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – V. 136. – P. 823-830.

116. Gularte M. S., Anghinoni J. M., Abenante L., Voss G. T., de Oliveira R. L., Vaucher R. A., Luchese C., Wilhelm E. A., Lenardão E. J., Fajardo A. R. Synthesis of chitosan derivatives with organoselenium and organosulfur compounds: Characterization, antimicrobial properties and application as biomaterials // *Carbohydrate Polymers*. – 2019. – V. 219. – P. 240-250.

117. Nada A. A., El Aref A. T., Sharaf S. S. The synthesis and characterization of zinc-containing electrospun chitosan/gelatin derivatives with antibacterial properties // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – V. 133. – P. 538-544.

118. Bayat F., Karimi A. R. Design of photodynamic chitosan hydrogels bearing phthalocyanine-colistin conjugate as an antibacterial agent // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – V. 129. – P. 927-935.

119. Omid S., Kakanejadifard A. Modification of chitosan and chitosan nanoparticle by long chain pyridinium compounds: Synthesis, characterization, antibacterial, and antioxidant activities // *Carbohydrate Polymers*. – 2019. – V. 208. – P. 477-485.

120. Shagdarova B., Lunkov A., Il'ina A., Varlamov V. Investigation of the properties of N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl] chloride chitosan derivatives // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – V. 124. – P. 994-1001.

121. Anush S. M., Vishalakshi B., Kalluraya B., Manju N. Synthesis of pyrazole-based Schiff bases of Chitosan: Evaluation of antimicrobial activity // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – V. 119. – P. 446-452.

122. Salama H. E., Abdel Aziz M. S., Sabaa M. W. Novel biodegradable and antibacterial edible films based on alginate and chitosan biguanidine hydrochloride // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – V. 116. – P. 443-450.

123. Qu X., Liu H., Zhang C., Lei Y., Lei M., Xu M., Jin D., Li P., Yin M., Payne G. F., Liu C. Electrofabrication of functional materials: Chloramine-based antimicrobial film for infectious wound treatment // *Acta Biomaterialia*. – 2018. – V. 73. – P. 190-203.
124. Arshad N., Zia K. M., Jabeen F., Anjum M. N., Akram N., Zuber M. Synthesis, characterization of novel chitosan based water dispersible polyurethanes and their potential deployment as antibacterial textile finish // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – V. 111. – P. 485-492.
125. Salama H. E., Aziz M. S. A., Saad G. R. Thermal properties, crystallization and antimicrobial activity of chitosan biguanidine grafted poly(3-hydroxybutyrate) containing silver nanoparticles // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – V. 111. – P. 19-27.
126. Rizwan M., Yahya R., Hassan A., Yar M., Anita Omar R., Azari P., Danial Azzahari A., Selvanathan V., Rageh Al-Maleki A., Venkatraman G. Synthesis of a novel organosoluble, biocompatible, and antibacterial chitosan derivative for biomedical applications // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2018. – V. 135, № 9. – P. 45905.
127. Khairul W. M., Daud A. I., Ismail N. Understanding the properties of chitosan aryl substituted thioureas in their role and potential as antibacterial agents // *AIP Conference Proceedings*. – 2018. – V. 1933, № 1. – P. 020002.
128. Liu X., Xia W., Jiang Q., Yu P., Yue L. Chitosan oligosaccharide-N-chlorokojic acid mannich base polymer as a potential antibacterial material // *Carbohydrate Polymers*. – 2018. – V. 182. – P. 225-234.
129. Lalge R., Thipsay P., Shankar V. K., Maurya A., Pimparade M., Bandari S., Zhang F., Murthy S. N., Repka M. A. Preparation and evaluation of cefuroxime axetil gastro-retentive floating drug delivery system via hot melt extrusion technology // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2019. – V. 566. – P. 520-531.
130. Mandal U. K., Chatterjee B., Senjoti F. G. Gastro-retentive drug delivery systems and their *in vivo* success: A recent update // *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2016. – V. 11, № 5. – P. 575-584.
131. Lupascu F. G., Dash M., Samal S. K., Dubruel P., Lupusoru C. E., Lupusoru R. V., Dragostin O., Profire L. Development, optimization and biological evaluation of

chitosan scaffold formulations of new xanthine derivatives for treatment of type-2 diabetes mellitus // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2015. – V. 77. – P. 122-134.

132. Mohammed M. A., Syeda J. T. M., Wasan K. M., Wasan E. K. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery // *Pharmaceutics*. – 2017. – V. 9, № 4. – P. 53.

133. Tin S., Sakharkar K. R., Lim C. S., Sakharkar M. K. Activity of Chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* // *International Journal of Biological Sciences*. – 2009. – V. 5, № 2. – P. 153-160.

134. Asghar M. A., Yousuf R. I., Shoaib M. H., Asghar M. A., Ansar S., Zehravi M., Rehman A. A. Synergistic nanocomposites of different antibiotics coupled with green synthesized chitosan-based silver nanoparticles: Characterization, antibacterial, *in vivo* toxicological and biodistribution studies // *International Journal of Nanomedicine*. – 2020. – V. 15. – P. 7841-7859.

135. Barakat K. M., Gohar Y. M. Nanosilver-marine fungal chitosan as antibiotic synergizers against sepsis fish bacteria // *Iranian Journal of Microbiology*. – 2015. – V. 7, № 6. – P. 324-332.

136. Ibrahim H. M., El-Bisi M. K., Taha G. M., El-Alfy E. A. Chitosan nanoparticles loaded antibiotics as drug delivery biomaterial // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. – 2015. – V. 5, № 10. – P. 85-90.

137. Brasil M. S. L., Filgueiras A. L., Campos M. B., Neves M. S. L., Eugênio M., Sena L. A., Sant'Anna C. B., Da Silva V. L., Diniz C. G., Sant'Ana A. C. Synergism in the antibacterial action of ternary mixtures involving silver nanoparticles, chitosan and antibiotics // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. – 2018. – V. 29, № 10. – P. 2026-2033.

138. Ong T. H., Chitra E., Ramamurthy S., Ling C. C. S., Ambu S. P., Davamani F. Cationic chitosan-propolis nanoparticles alter the zeta potential of *S. Epidermidis*, inhibit biofilm formation by modulating gene expression and exhibit synergism with antibiotics // *PLoS ONE*. – 2019. – V. 14, № 2. – P. e0213079.

139. Golmohamadi M., Ghorbani H. R., Otadi M. Synthesis of chitosan nanoparticles loaded with antibiotics as drug carriers and the study of antibacterial activity // *J. Nanoanalysis*. – 2019. – V. 6. – P. 72-79.
140. Sharma P. K., Halder M., Srivastava U., Singh Y. Antibacterial PEG-Chitosan Hydrogels for Controlled Antibiotic/Protein Delivery // *ACS Applied Bio Materials*. – 2019.10.1021/acsabm.9b00570. – P. 5313-5322.
141. Aksel H., Mahjour F., Bosaid F., Calamak S., Azim A. A. Antimicrobial Activity and Biocompatibility of Antibiotic-Loaded Chitosan Hydrogels as a Potential Scaffold in Regenerative Endodontic Treatment // *Journal of Endodontics*. – 2020. – V. 46, № 12. – P. 1867-1875.
142. Thattaruparambil Raveendran N., Mohandas A., Ramachandran Menon R., Somasekharan Menon A., Biswas R., Jayakumar R. Ciprofloxacin-and Fluconazole-Containing Fibrin-Nanoparticle-Incorporated Chitosan Bandages for the Treatment of Polymicrobial Wound Infections // *ACS Applied Bio Materials*. – 2019. – V. 2, № 1. – P. 243-254.
143. Goller S., Turner N. J. The antimicrobial effectiveness and cytotoxicity of the antibiotic-loaded chitosan: Ecm scaffolds // *Applied Sciences (Switzerland)*. – 2020. – V. 10, № 10. – P. 3446.
144. Fontana C. R., Dos Santos Jr D. S., Bosco J. M., Spolidorio D. M., Chierici Marcantonio R. A. Evaluation of chitosan gel as antibiotic and photosensitizer delivery // *Drug Delivery*. – 2008. – V. 15, № 7. – P. 417-422.
145. Noel S. P., Courtney H., Bumgardner J. D., Haggard W. O. Chitosan films: A potential local drug delivery system for antibiotics // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 2008. – V. 466, № 6. – P. 1377-1382.
146. Smith J. K., Bumgardner J. D., Courtney H. S., Smeltzer M. S., Haggard W. O. Antibiotic-loaded chitosan film for infection prevention: A preliminary *in vitro* characterization // *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. – 2010. – V. 94, № 1. – P. 203-211.
147. Grimling B., Karolewicz B., Nawrot U., Włodarczyk K., Górnica A. Physicochemical and antifungal properties of clotrimazole in combination with high-

molecular weight chitosan as a multifunctional excipient // *Marine Drugs*. – 2020. – V. 18, № 12. – P. 591.

148. Shahiwala A. F., Khan G. A., Bostanooei N. M. Efficacy of levofloxacin, chitosan and EDTA combination against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: *In vitro* and *in vivo* evaluations // *Int. J. Clin. Med. Microbiol.* – 2017. – V. 2. – P. 119.

149. Perinelli D. R., Campana R., Skouras A., Bonacucina G., Cespi M., Mastrotto F., Baffone W., Casettari L. Chitosan loaded into a hydrogel delivery system as a strategy to treat vaginal Co-infection // *Pharmaceutics*. – 2018. – V. 10, № 1. – P. 23.

150. Norowski P. A., Courtney H. S., Babu J., Haggard W. O., Bumgardner J. D. Chitosan coatings deliver antimicrobials from titanium implants: A preliminary study // *Implant Dentistry*. – 2011. – V. 20, № 1. – P. 56-67.

151. Aimin C., Chunlin H., Juliang B., Tinyin Z., Zhichao D. Antibiotic loaded chitosan bar: An *in vitro*, *in vivo* study of a possible treatment for osteomyelitis // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 1999. – V. 366. – P. 239-247.

152. *Green Chemistry: Theory and Practice*. / Anastas P. T., Warner J. C.: Oxford University Press, 1998.

153. Kinrys G., Gold A. K., Worthington J. J., Nierenberg A. A. Medication disposal practices: Increasing patient and clinician education on safe methods // *J Int Med Res*. – 2018. – V. 46, № 3. – P. 927-939.

154. Kraemer S. A., Ramachandran A., Perron G. G. Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy // *Microorganisms*. – 2019. – V. 7, № 6.

155. Aydin S., Aydin M. E., Ulvi A., Kilic H. Antibiotics in hospital effluents: occurrence, contribution to urban wastewater, removal in a wastewater treatment plant, and environmental risk assessment // *Environ Sci Pollut Res Int*. – 2019. – V. 26, № 1. – P. 544-558.

156. Muzzarelli R. A. A., Muzzarelli C. Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences // *Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use* / Heinze T. – Berlin: Springer International Publishing, 2005. – P. 151-209.

157. Verma M. L., Kumar S., Das A., Randhawa J. S., Chamundeeswari M. Enzyme Immobilization on Chitin and Chitosan-Based Supports for Biotechnological Applications // Sustainable Agriculture Reviews 35: Chitin and Chitosan: History, Fundamentals and Innovations / Crini G., Lichtfouse E. – Cham: Springer International Publishing, 2019. – P. 147-173.

158. Verma M. L., Kumar S., Das A., Randhawa J. S., Chamundeeswari M. Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications // Environmental Chemistry Letters. – 2020. – V. 18, № 2. – P. 315-323.

159. Verma M. L., Dhanya B. S., Sukriti, Rani V., Thakur M., Jeslin J., Kushwaha R. Carbohydrate and protein based biopolymeric nanoparticles: Current status and biotechnological applications // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – V. 154. – P. 390-412.

160. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Dysin A. P., Volkova O. V., Zabodalova L. A., Suchkova E. P., Kurliuk A. V., Shakola T. V. Ultrasound-assisted Cu(I)-catalyzed azide-alkyne click cycloaddition as polymer-analogous transformation in chitosan chemistry. High antibacterial and transfection activity of novel triazol betaine chitosan derivatives and their nanoparticles // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – V. 137. – P. 592-603.

161. Li Q., Sun X., Gu G., Guo Z. Novel Water Soluble Chitosan Derivatives with 1,2,3-Triazolium and Their Free Radical-Scavenging Activity // Marine drugs. – 2018. – V. 16, № 4. – P. 107.

162. Hajipour A. R., Abolfathi P. Novel triazole-modified chitosan@nickel nanoparticles: efficient and recoverable catalysts for Suzuki reaction // New Journal of Chemistry. – 2017. – V. 41, № 6. – P. 2386-2391.

163. Kritchenkov A. S., Bokach N. A., Starova G. L., Kukushkin V. Y. A palladium(II) center activates nitrile ligands toward 1,3-dipolar cycloaddition of nitrones substantially more than the corresponding platinum(II) center // Inorganic Chemistry. – 2012. – V. 51, № 21. – P. 11971-9.

164. Kritchenkov A. S., Luzyanin K. V., Bokach N. A., Kuznetsov M. L., Gurzhiy V. V., Kukushkin V. Y. Selective Nucleophilic Oxygenation of Palladium-Bound

Isocyanide Ligands: Route to Imine Complexes That Serve as Efficient Catalysts for Copper-/Phosphine-Free Sonogashira Reactions // *Organometallics*. – 2013. – V. 32, № 6. – P. 1979-1987.

165. Hamed A. A., Abdelhamid I. A., Saad G. R., Elkady N. A., Elsabee M. Z. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of a novel chitosan Schiff bases based on heterocyclic moieties // *Int J Biol Macromol*. – 2020. – V. 153. – P. 492-501.

166. Mansour H. Thiophenethieno[2,3-b]pyridine-chitosan nanorods; synthesis, characterization, BSA-Binding and kinetic interactions with BSA, antibacterial and in-vitro release studies // *Journal of Molecular Structure*. – 2020. – V. 1219. – P. 128611.

167. Kritchenkov A. S., Kurasova M. N., Godzishvskaya A. A., Mitrofanova E. S., Egorov A. R., Yagafarov N. Z., Ballesteros Meza M. J., Tskhovrebov A. G., Artemjev A. A., Andrusenko E. V., Khrustalev V. N. High antibacterial activity and low toxicity of pyridoxal derivatives of chitosan and their nanoparticles // *Mendeleev Communications*. – 2021. – V. 31, № 4. – P. 504-506.

168. Wang W. Q., Meng Q. Y., Li Q., Liu J. B., Zhou M., Jin Z., Zhao K. Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine // *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*. – 2020. – V. 21, № 2.

169. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Yagafarov N. Z., Volkova O. V., Zabodalova L. A., Suchkova E. P., Kurliuk A. V., Khrustalev V. N. Efficient reinforcement of chitosan-based coatings for Ricotta cheese with non-toxic, active, and smart nanoparticles // *Progress in Organic Coatings*. – 2020. – V. 145. – P. 105707.

170. Kritchenkov A. S., Kletskov A. V., Egorov A. R., Tskhovrebov A. G., Kurliuk A. V., Zhaliuzniak N. V., Shakola T. V., Khrustalev V. N. New water-soluble chitin derivative with high antibacterial properties for potential application in active food coatings // *Food Chemistry*. – 2020. – V. 343. – P. 128696.

171. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Volkova O. V., Artemjev A. A., Kurliuk A. V., Anh Le T., Hieu Truong H., Le-Nhat-Thuy G., Van Tran Thi T., Van Tuyen N., Khrustalev V. N. Novel biopolymer-based nanocomposite food coatings that exhibit active and smart properties due to a single type of nanoparticles // *Food Chemistry*. – 2021. – V. 343. – P. 128676.

172. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Kurasova M. N., Volkova O. V., Meledina T. V., Lipkan N. A., Tskhovrebov A. G., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Dysin A. P., Egorov M. Y., Savicheva E. A., dos Santos W. M. Novel non-toxic high efficient antibacterial azido chitosan derivatives with potential application in food coatings // *Food Chemistry*. – 2019. – V. 301. – P. 125247.

173. Kritchenkov A. S., Lipkan N. A., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Egorov A. R., Volkova O. V., Meledina T. V., Suchkova E. P., Zabodalova L. A., Dysin A. P. Synthesis and Antibacterial Activity of Chitin Tetrazole Derivatives // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2020. – V. 54, № 2. – P. 138-141.

174. Singh F. V., Wirth T. Selenium reagents as catalysts // *Catalysis Science & Technology*. – 2019. – V. 9, № 5. – P. 1073-1091.

175. Ninomiya M., Garud D., Koketsu M. Biologically significant selenium-containing heterocycles // *Coordination Chemistry Reviews - COORD CHEM REV*. – 2011. – V. 255. – P. 2968-2990.

176. Elsherbini M., Hamama W., Zoorob H. Recent Advances in the Chemistry of Selenium-Containing Heterocycles: Five-Membered Ring Systems // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2016. – V. 312. – P. 149.

177. Abdel-Hafez Sh H. Selenium containing heterocycles: synthesis, anti-inflammatory, analgesic and anti-microbial activities of some new 4-cyanopyridazine-3(2H)selenone derivatives // *Eur J Med Chem*. – 2008. – V. 43, № 9. – P. 1971-7.

178. Al-Smadi M., Al-Momani F. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of new 1,2,3-selenadiazoles // *Molecules (Basel, Switzerland)*. – 2008. – V. 13, № 11. – P. 2740-2749.

179. Khrustalev V. N., Grishina M. M., Matsulevich Z. V., Lukiyanova J. M., Borisova G. N., Osmanov V. K., Novikov A. S., Kirichuk A. A., Borisov A. V., Solari E., Tskhovrebov A. G. Novel cationic 1,2,4-selenadiazoles: synthesis via addition of 2-pyridylselenyl halides to unactivated nitriles, structures and four-center Se...N contacts // *Dalton Transactions*. – 2021. – V. 50, № 31. – P. 10689-10691.

180. Kritchenkov A. S., Zhaliyazniak N. V., Egorov A. R., Lobanov N. N., Volkova O. V., Zabodalova L. A., Suchkova E. P., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Rubanik V. V.,

Rubanik V. V., Yagafarov N. Z., Khomik A. S., Khrustalev V. N. Chitosan derivatives and their based nanoparticles: ultrasonic approach to the synthesis, antimicrobial and transfection properties // Carbohydrate Polymers. – 2020. – V. 242. – P. 116478.

181. 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. Ultrasound-assisted catalyst-free thiol-yne click reaction in chitosan chemistry: Antibacterial and transfection activity of novel cationic chitosan derivatives and their based nanoparticles // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – V. 143. – P. 143-152.

182. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Volkova O. V., Kritchenkov I. S., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Khrustalev V. N. Ultrasound-assisted catalyst-free phenol-yne reaction for the synthesis of new water-soluble chitosan derivatives and their nanoparticles with enhanced antibacterial properties // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – V. 139. – P. 103-113.

183. Jindal D. K., Singh S. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CHITIN co-(ACETATE/SUCCINATE) COPOLYMERS // International Journal of Pharmacy and Biological Sciences. – 2016. – V. 6, № 3. – P. 49-54.

184. Tsaih M. L., Chen R. H. The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan // Journal of Applied Polymer Science. – 2003. – V. 88, № 13. – P. 2917-2923.

185. Lamarque G., Viton C., Domard A. Comparative Study of the First Heterogeneous Deacetylation of α - and β -Chitins in a Multistep Process // Biomacromolecules. – 2004. – V. 5, № 3. – P. 992-1001.

186. Ngo T. H. D., Ngo D. N. Effects of low-frequency ultrasound on heterogenous deacetylation of chitin // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – V. 104. – P. 1604-1610.

187. Davidson R. S., Safdar A., Spencer J. D., Robinson B. Applications of ultrasound to organic chemistry // Ultrasonics. – 1987. – V. 25, № 1. – P. 35-39.

188. Fiamingo A., Delezuk J. A. D., Trombotto S., David L., Campana S. P. Extensively deacetylated high molecular weight chitosan from the multistep ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2016. – V. 32. – P. 79-85.
189. Duong N. T. H., Nghia N. D. Effects of low-frequency ultrasound on heterogenous deacetylation of chitin // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – V. 104. – P. 1604-1610.
190. Kurita K., Inoue S., Nishimura S.-I. Preparation of soluble chitin derivatives as reactive precursors for controlled modifications: Tosyl- and iodo-chitins // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 1991. – V. 29, № 6. – P. 937-939.
191. Kurita K., Koyama Y., Inoue S., Nishimura S. ((Diethylamino)ethyl)chitins: preparation and properties of novel aminated chitin derivatives // *Macromolecules*. – 1990. – V. 23, № 11. – P. 2865-2869.
192. Park I. K., Park Y. H. Preparation and structural characterization of water-soluble O-hydroxypropyl chitin derivatives // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2001. – V. 80, № 13. – P. 2624-2632.
193. Pourjavadi A., Seidi F., Salimi H. Synthesis of Novel Water-Soluble Aminodeoxychitin Derivatives // *Starch - Stärke*. – 2007. – V. 59, № 11. – P. 557-562.
194. Nishi N., Nishimura S.-i., Ebina A., Tsutsumi A., Tokura S. Preparation and characterization of water-soluble chitin phosphate // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 1984. – V. 6, № 1. – P. 53-54.
195. Peng N., Ai Z., Fang Z., Wang Y., Xia Z., Zhong Z., Fan X., Ye Q. Homogeneous synthesis of quaternized chitin in NaOH/urea aqueous solution as a potential gene vector // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – V. 150. – P. 180-186.
196. Ding F. Y., Shi X. W., Li X. X., Cai J., Duan B., Du Y. M. Homogeneous synthesis and characterization of quaternized chitin in NaOH/urea aqueous solution // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – V. 87, № 1. – P. 422-426.
197. Jayakumar R., Prabakaran M., Nair S. V., Tokura S., Tamura H., Selvamurugan N. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and

their biomedical applications // *Progress in Materials Science*. – 2010. – V. 55, № 7. – P. 675-709.

198. Verlee A., Mincke S., Stevens C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives // *Carbohydrate Polymers*. – 2017. – V. 164. – P. 268-283.

199. Muzzarelli R. A. A. CHAPTER 3 - CHITIN CHEMISTRY // *Chitin / Muzzarelli R. A. A. Pergamon, 1977*. – P. 87-154.

200. Yang Y., Cai Z., Huang Z., Tang X., Zhang X. Antimicrobial cationic polymers: from structural design to functional control // *Polymer Journal*. – 2018. – V. 50, № 1. – P. 33-44.

201. Egorov A. R., Kirichuk A. A., Rubanik V. V., Rubanik V. V., Tskhovrebov A. G., Kritchenkov A. S. Chitosan and Its Derivatives: Preparation and Antibacterial Properties // *Materials*. – 2023. – V. 16, № 18. – P. 6076.

202. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Volkova O. V., Artemjev A. A., Kurliuk A. V., Le T. A., Truong H. H., Le-Nhat-Thuy G., Thi T. V. T., Tuyen N. V., Khrustalev V. N. Novel biopolymer-based nanocomposite food coatings that exhibit active and smart properties due to a single type of nanoparticles // *FOOD CHEMISTRY*. – 2021. – V. 343.

203. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Volkova O. V., Zabodalova L. A., Suchkova E. P., Yagafarov N. Z., Kurasova M. N., Dysin A. P., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Khrustalev V. N. Active antibacterial food coatings based on blends of succinyl chitosan and triazole betaine chitosan derivatives // *FOOD PACKAGING AND SHELF LIFE*. – 2020. – V. 25.

204. Olmos D., Gonzalez-Benito J. Polymeric Materials with Antibacterial Activity: A Review // *Polymers*. – 2021. – V. 13. – P. 613.

205. Chandrasekaran M., Kim K. D., Chun S. C. Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles: A Review // *Processes*. – 2020. – V. 8, № 9.

206. Sacco P., Pedroso-Santana S., Kumar Y., Joly N., Martin P., Bocchetta P. Ionotropic Gelation of Chitosan Flat Structures and Potential Applications // *Molecules*. – 2021. – V. 26, № 3.

207. Wang W., Meng Q., Li Q., Liu J., Zhou M., Jin Z., Zhao K. Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – V. 21, № 2. – P. 487.

208. Ardean C., Davidescu C. M., Nemeş N. S., Negrea A., Ciopec M., Duteanu N., Negrea P., Duda-Seiman D., Musta V. Factors Influencing the Antibacterial Activity of Chitosan and Chitosan Modified by Functionalization // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22, № 14. – P. 7449.

209. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Kurasova M. N., Volkova O. V., Meledina T. V., Lipkan N. A., Tskhovrebov A. G., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Dysin A. P., Egorov M. Y., Savicheva E. A., Dos Santos W. M. Novel non-toxic high efficient antibacterial azido chitosan derivatives with potential application in food coatings // Food Chem. – 2019. – V. 301. – P. 125247.

210. Shao L. X., Li Y. M., Lu J. M., Jiang X. F. Recent progress in selenium-catalyzed organic reactions // ORGANIC CHEMISTRY FRONTIERS. – 2019. – V. 6, № 16. – P. 2999-3041.

211. Chen F., Tan C. K., Yeung Y.-Y. C2-Symmetric Cyclic Selenium-Catalyzed Enantioselective Bromoaminocyclization // Journal of the American Chemical Society. – 2013. – V. 135, № 4. – P. 1232-1235.

212. Balkrishna S. J., Prasad C. D., Panini P., Detty M. R., Chopra D., Kumar S. Isoselenazolones as Catalysts for the Activation of Bromine: Bromolactonization of Alkenoic Acids and Oxidation of Alcohols // The Journal of Organic Chemistry. – 2012. – V. 77, № 21. – P. 9541-9552.

213. Balkrishna S. J., Prasad C. D., Panini P., Detty M. R., Chopra D., Kumar S. Isoselenazolones as Catalysts for the Activation of Bromine: Bromolactonization of Alkenoic Acids and Oxidation of Alcohols // JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY. – 2012. – V. 77, № 21. – P. 9541-9552.

214. Front Matter // A New History of Vaccines for Infectious Diseases / Rees A. R. Academic Press, 2022. – P. iii.

215. Grayson M. L., Cosgrove S., Crowe S. M., McCarthy J. S., Hope W., Mills J., Mouton J. W., Paterson D. L. Principles of antimicrobial use // Kucers the Use of Antibiotics CRC Press, 2017. – P. 3-8.

216. Khaleel A. K., Shaari R. B., Nawi M. A. A., Al-Yassiri A. M. H. Toxicological Aspects of Fluoroquinolones Administration: A Literature Review // Egyptian Journal of Chemistry. – 2022. – V. 65, № 5. – P. 561-569.

217. Jorgensen S. C. J., Mercurio N. J., Davis S. L., Rybak M. J. Delafloxacin: Place in Therapy and Review of Microbiologic, Clinical and Pharmacologic Properties // Infectious Diseases and Therapy. – 2018. – V. 7, № 2. – P. 197-217.

218. Estradé O., Vozmediano V., Carral N., Isla A., González M., Poole R., Suarez E. Key Factors in Effective Patient-Tailored Dosing of Fluoroquinolones in Urological Infections: Interindividual Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Variability // Antibiotics. – 2022. – V. 11, № 5.

219. Jampilek J., Kralova K. Advances in Nanostructures for Antimicrobial Therapy // Materials. – 2022. – V. 15, № 7. – P. 2388.

220. Chen Y., Huang Y., Jin Q. Polymeric Nanoplatfoms for the Delivery of Antibacterial Agents // Macromolecular Chemistry and Physics. – 2022. – V. 223, № 5. – P. 2100440.

221. Ndayishimiye J., Kumeria T., Popat A., Falconer J. R., Blaskovich M. A. T. Nanomaterials: The New Antimicrobial Magic Bullet // ACS Infectious Diseases. – 2022. – V. 8, № 4. – P. 693-712.

222. Al-Obaidi H., Kalgudi R., Zariwala M. G. Fabrication of inhaled hybrid silver/ciprofloxacin nanoparticles with synergetic effect against Pseudomonas aeruginosa // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2018. – V. 128. – P. 27-35.

223. Levofloxacin-Loaded Nanoparticles Decrease Emergence of Fluoroquinolone Resistance in Escherichia coli // Microbial Drug Resistance. – 2018. – V. 24, № 8. – P. 1098-1107.

224. Anwer M. K., Iqbal M., Muharram M. M., Mohammad M., Ezzeldin E., Aldawsari M. F., Alalaiwe A., Imam F. Development of Lipomer Nanoparticles for the

Enhancement of Drug Release, Anti-Microbial Activity and Bioavailability of Delafloxacin // *Pharmaceutics*. – 2020. – V. 12, № 3. – P. 252.

225. Complex Systems and Computational Biology Approaches to Acute Inflammation. 2013. – 1-291 c.

226. Nozaki S. Effects of amounts of additives on peptide coupling mediated by a water-soluble carbodiimide in alcohols // *The Journal of Peptide Research*. – 1999. – V. 54, № 2. – P. 162-167.

227. Semenov K. N., Charykov N. A., Keskinov V. A., Kritchenkov A. S., Murin I. V. Fullerenol-d Solubility in Fullerenol-d-Inorganic Salt-Water Ternary Systems at 25 degrees C // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2013. – V. 52, № 46. – P. 16095-16100.

228. Zhanel G. G., Walkty A., Vercaigne L., Karlowsky J. A., Embil J., Gin A. S., Hoban D. J. The New Fluoroquinolones: A Critical Review // *Canadian Journal of Infectious Diseases*. – 1999. – V. 10. – P. 378394.

229. Sahariah P., Másson M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure–Activity Relationship // *Biomacromolecules*. – 2017. – V. 18, № 11. – P. 3846-3868.

230. Chandrasekaran M., Kim K. D., Chun S. C. Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles: A Review // *Processes*. – 2020. – V. 8, № 9. – P. 1173.

231. Confederat L. G., Tuchilus C. G., Dragan M., Sha'at M., Dragostin O. M. Preparation and Antimicrobial Activity of Chitosan and Its Derivatives: A Concise Review // *Molecules*. – 2021. – V. 26, № 12. – P. 3694.

232. Kong M., Chen X. G., Xing K., Park H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review // *International Journal of Food Microbiology*. – 2010. – V. 144, № 1. – P. 51-63.

233. Al-Zahrani S. S., Bora R. S., Al-Garni S. M. Antimicrobial activity of chitosan nanoparticles // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. – 2021. – V. 35, № 1. – P. 1874-1880.

234. Bioassay Techniques for Drug Development. / Rahman A.-u., Choudhary M. I., Thomson W., 2005.

235. Sahn D. H. Antibacterial susceptibility tests: dilution methods // Manual of clinical microbiology / Murray P. R. – Washington, D.C.: ASM Press, 1991. – P. 1105-1116.

236. Rathore H., Mittal S., Kumar S. Synthesis, characterization and antifungal activities of 3d-transition metal complexes of 1-acetylpiperazinyldithiocarbamate, M (acpdtc) 2 // Pestic Res J. – 2000. – V. 12. – P. 103-107.

237. Raik S. V., Poshina D. N., Lyalina T. A., Polyakov D. S., Vasilyev V. B., Kritchenkov A. S., Skorik Y. A. N-[4-(N,N,N-trimethylammonium)benzyl]chitosan chloride: Synthesis, interaction with DNA and evaluation of transfection efficiency // Carbohydrate Polymers. – 2018. – V. 181. – P. 693-700.