

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-38-45>  
УДК 544.165



Оригинальная статья / Research article

## Зависимость антимикробных эффектов гуанидинсодержащих производных пектина от некоторых структурных характеристик

О. Р. Ахмедов<sup>1</sup>✉, Ш. А. Шомуротов<sup>1</sup>, А. С. Тураев<sup>1</sup>, А. В. Сидоренко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт Биоорганической химии Академии Наук Республики Узбекистан, 100125, Узбекистан, г. Ташкент, Мирзо Улугбека, д. 83

<sup>2</sup> Государственное научное учреждение «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси», 220141, Беларусь, г. Минск, ул. Академика Купревича, д. 2

✉ Контактное лицо: Ахмедов Олий Равшанович. E-mail: [akhmedov.oliy@gmail.com](mailto:akhmedov.oliy@gmail.com)

ORCID: О. Р. Ахмедов – <https://orcid.org/0000-0002-0056-8646>; Ш. А. Шомуротов – <https://orcid.org/0000-0002-3890-0026>; А. С. Тураев – <https://orcid.org/0000-0003-2915-9237>; А. В. Сидоренко – <https://orcid.org/0000-0001-8447-9538>.

Статья поступила: 23.09.2021

Статья принята в печать: 12.01.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

### Резюме

**Введение.** К настоящему времени практически отсутствуют данные о взаимосвязи между биологической активностью и структурными характеристиками антимикробных полимеров, синтезируемых путем химического присоединения гуанидиновых групп к макромолекулам полисахаридов. В связи с этим обстоятельством, представляется интересным осуществление химической модификации гуанидина природными полимерами в частности полиальдегидпектином и проведение сравнительных исследований антимикробной активности полученных образцов, имеющих различные физико-химические характеристики.

**Цель.** Синтез гуанидинсодержащих производных пектина и установление влияния структурных вариаций, полученных образцов на проявления антимикробных свойств.

**Материалы и методы.** Синтез гуанидинсодержащих производных пектина состоял из следующих стадий: периодатное окисление полисахарида, модификация гуанидина посредством полиальдегидпектина и химическое восстановление азометинных связей. Количество гуанидина в полученных образцах вычислено ацидиметрическим титрованием, содержание азота (N, %) определено с помощью элементного анализатора марки Eura EA (Italy). Значения рКа синтезированных соединений найдены методом обратного титрования. Спектры поглощения были сняты на спектрофотометре «UV 1280» (Shimadzu, Japan), в диапазоне  $\lambda = 180-400$  нм. ИК-спектры записывали на спектрометре Vector-22 в области длин волн  $400-4000$  см<sup>-1</sup> в таблетках KBr (3 мг образца / 300 мг KBr). Молекулярно-массовые характеристики синтезированных производных, определяли методом высокоэффективной гельпроникающей хроматографии на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity. Острая токсичность гуанидинсодержащих производных пектина определена методом Прозоровского. Сравнительная оценка антимикробной активности проводилась методом диффузии в агар.

**Результаты и обсуждение.** Варьируя степенью окисления полиальдегидпектина, синтезированы соединения, отличающиеся степенью замещения, содержанием гуанидина, молекулярной массой и значением рКа. Установлено, что выраженность антибактериальной и противогрибковой активности исследованных образцов зависит от степени замещения и природы противоиона. С увеличением количественного содержания гуанидиновых групп в макромолекулярной цепи пектина, возрастает противомикробное действие. Обнаружено, что замена низкомолекулярных Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> противоионов на карбоксилат-анионы приводит к резкому уменьшению антимикробных свойств. При пероральном введении синтезированных соединений мышам установлено, что все образцы относятся к разряду практически не токсичных веществ (V-й класс).

**Заключение.** Сравнительный анализ гуанидинсодержащих производных пектина с различными характеристиками показал, что выраженность антимикробного действия синтезированных соединений в отношении бактерий и грибов рода *Candida* зависит от количественного содержания катионных группировок и природы противоиона.

**Ключевые слова:** гуанидин, полиальдегидпектин, химическая модификация, антимикробные свойства, острая токсичность

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** О. Р. Ахмедов и Ш. А. Шомуротов разработали метод химической модификации гуанидина полиальдегидпектином. Исследовали структуру, состав и молекулярные характеристики синтезированных соединений, принимали непосредственное участие в написании и корректуре статьи. А. С. Тураев осуществлял научно-теоретическое управление исследованием и рецензирование статьи. А. В. Сидоренко исследовала антимикробные свойства гуанидинсодержащих производных пектина с различными физико-химическими характеристиками. Данная статья была написана и согласована при участии всех авторов.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Инновационного развития Республики Узбекистан (проект № MRB-2021-539).

**Для цитирования:** Ахмедов О. Р., Шомуротов Ш. А., Тураев А. С., Сидоренко А. В. Зависимость антимикробных эффектов гуанидинсодержащих производных пектина от некоторых структурных характеристик. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):38–45. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-38-45>

## Dependence of Antimicrobial Effects of Guanidine-containing Pectin Derivatives from Some Structural Characteristics

Oliy R. Akhmedov<sup>1</sup>✉, Shavkat A. Shomurotov<sup>1</sup>, Abbaskhan S. Turaev<sup>1</sup>, Anastasiya V. Sidarenka<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Bioorganic Chemistry of the Uzbek Academy of Sciences, 83, Mirzo Ulugbek str., Tashkent, 100125, Uzbekistan

<sup>2</sup> Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, 2, Akademika Kuprevich str., Minsk, 220141, Belarus

✉ Corresponding author: Oliy R. Akhmedov. E-mail: [akhmedov.oliy@gmail.com](mailto:akhmedov.oliy@gmail.com)

© Ахмедов О. Р., Шомуротов Ш. А., Тураев А. С., Сидоренко А. В., 2022

© Akhmedov O. R., Shomurotov Sh. A., Turaev A. S., Sidarenka A. V., 2022

ORCID: Oliy R. Akhmedov – <https://orcid.org/0000-0002-0056-8646>; Shavkat A. Shomurotov – <https://orcid.org/0000-0002-3890-0026>;  
Abbaskhan S. Turaev – <https://orcid.org/0000-0003-2915-9237>; Anastasiya V. Sidarenka – <https://orcid.org/0000-0001-8447-9538>.

Received: 23.09.2021

Revised: 12.01.2022

Published: 25.05.2022

## Abstract

**Introduction.** Up to the present time, there are practically no studies on the relationship between the structural characteristics and biological activity of antimicrobial polymers synthesized by the chemical addition of guanidine groups to polysaccharide macromolecules. Therefore, there is a need to carry out the chemical modification of guanidine with natural polymers, in particular polyaldehyde pectin, and to conduct comparative studies of the antimicrobial activity of the obtained samples with different physicochemical characteristics.

**Aim.** To conduct the synthesis of guanidine-containing pectin derivatives. In addition, to determine the influence of structural variations in the obtained samples on exhibiting antimicrobial properties.

**Materials and methods.** The synthesis of guanidine-containing pectin derivatives consisted of the following stages: periodate oxidation of the polysaccharide, modification of guanidine using polyaldehyde pectin, and chemical reduction of azomethine bonds. The amount of guanidine in the obtained samples was calculated by acidimetric titration, the nitrogen content (N, %) was determined using a Eura EA (Italy) elemental analyzer. The pKa values of the synthesized compounds were found by the back titration method. Absorption spectra were analyzed on a "UV 1280" spectrophotometer (Shimadzu, Japan) in the range  $\lambda = 180\text{--}400\text{ nm}$ . IR spectra were recorded on a Vector-22 spectrometer in the wavelength range of  $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$  in KBr tablets (3 mg sample / 300 mg KBr). The molecular weight characteristics of the synthesized derivatives were determined by high-performance gel permeation chromatography on an Agilent 1260 Infinity liquid chromatograph. The acute toxicity of guanidine-containing pectin derivatives was calculated by the Prozorovsky method. Comparative assessment of antimicrobial activity was conducted by agar diffusion method.

**Results and discussion.** By varying the oxidation level of polyaldehyde pectin, synthesized compounds differ in the degree of substitution, guanidine content, molecular weight, and pKa value. It was found that the levels of the antibacterial and antifungal activity of the studied samples depend on the degree of substitution and the nature of the counterion. The antimicrobial effect increases with an increase in the quantitative content of guanidine groups in the macromolecular chain of pectin. Moreover, it was found that the change of low molecular weight  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{I}^-$  counterions by carboxylate anions leads to a sharp decrease in antimicrobial properties. Upon oral injection of the synthesized compounds to mice, it was found that all samples belong to the category of practically non-toxic substances (V-class).

**Conclusion.** Comparative analysis of guanidine-containing pectin derivatives with different characteristics showed that the severity of the antimicrobial action of the synthesized compounds against bacteria and fungi of the genus *Candida* depends on the quantitative content of cationic groups and the nature of the counterion.

**Keywords:** guanidine, polyaldehyde pectin, chemical modification, antimicrobial properties, acute toxicity

**Conflict of interest.** The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Contribution of the authors.** Oliy R. Akhmedov and Shavkat A. Shomurotov developed a method for the chemical modification of guanidine with polyaldehyde pectin. In addition, studied the structure, composition and molecular characteristics, as well as took a direct part in writing and correcting the article. Abbaskhan S. Turaev carried out scientific and theoretical research management and review of the article. Anastasiya V. Sidarenka studied the antimicrobial properties of guanidine-containing pectin derivatives with different physicochemical characteristics. This article was written and agreed upon with the participation of all authors.

**Funding.** This work was financially supported by the Ministry of Innovative Development of the Republic of Uzbekistan (project No. MRB-2021-539).

**For citation:** Akhmedov O. R., Shomurotov Sh. A., Turaev A. S., Sidarenka A. V. Dependence of antimicrobial effects of guanidine-containing pectin derivatives from some structural characteristics. *Drug development & registration*. 2022;11(2):38–45. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-38-45>

## ВВЕДЕНИЕ

По причине резкого возрастания устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к низкомолекулярным антимикробным препаратам, применяющимся в клинической практике, усиленно ведется поиск, направленный на создание нового поколения терапевтических средств, отличающихся не только величиной биологической активности, но и улучшенными фармако-токсикологическими свойствами [1]. В этом направлении наиболее перспективными средствами можно считать антимикробные полимеры, синтез которых осуществляется различными путями. Известно, что при молекулярном конструировании макромолекулярной цепи полимера, удается в же-

лаемом направлении регулировать его биологическую активность, токсичность, фармакокинетические свойства и ряд других фармакологических характеристик, что не является возможным при химической модификации низкомолекулярных химиотерапевтических агентов [2–4].

Среди неоднородного класса антимикробных полимеров существенная роль отводится синтезу макромолекулярных производных, несущих в цепи положительный заряд. Это связано с тем, что большинство катионных полимеров обладают выраженными антимикробными свойствами, основой действия которых, является взаимодействие с отрицательно заряженной поверхностью микроорганизмов и ее последу-

ющее разрушение [5–7]. В частности, такими свойствами обладают сополимеры, по большей части синтезируемые на основе различных алифатических диаминов и гуанидина. Наличие гуанидиновых фрагментов в повторяющихся звеньях полимера придает всей макромолекуле свойства поликатионов и обеспечивает выраженное противомикробное действие [8–10]. Помимо высокого биоцидного действия полимерные производные гуанидина нетоксичны, безопасны, имеют пролонгированное действие и хорошо растворяются в воде. Перечисленные преимущества этого класса антимикробных полимеров определяют их широкое применение в качестве безвредных дезинфицирующих и антисептических средств.

Несмотря на имеющийся огромный материал в области разработки и применения полиалкиленгуанидиновых средств, к настоящему времени недостаточно сведений о работах, посвященных синтезу и фармакологическим исследованиям антимикробных полимеров, получаемых посредством химического связывания гуанидина с макромолекулами полисахаридов. Также, не изучены структурные показатели, влияющие на биологическую активность и токсикологические свойства гуанидинсодержащих производных полисахаридов. Поскольку очевидно, что после модификации гуанидина полисахаридами, эффективность биологического действия создаваемых полимерных молекул может оказаться различной и главным образом зависеть от количественного содержания катионных группировок, молекулярных характеристик, состава, природы противоиона и др.

С учетом высокой нуклеофильности аминогрупп гуанидина, способных в мягких условиях синтеза вступать в реакцию конденсации с альдегидами [11, 12], наиболее подходящим выглядит проведение химической модификации низкомолекулярного катионного фрагмента с помощью окисленного полисахарида (полиальдегида). Известно, что полиальдегиды различных полисахаридов благодаря комплексу уникальных свойств считаются практически идеальными носителями лекарственных препаратов, в связи с чем довольно часто применяются для создания физиологически активных полимеров прививочного типа [13–15].

**Целью настоящей работы** был синтез гуанидинсодержащих производных пектина с различными физико-химическими характеристиками и установление влияния структурных вариаций, полученных образцов на проявление антимикробных свойств.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован коммерческий цитрусовый пектин, выделенный из кожуры цитрусовых (Sigma-Aldrich, США), со степенью этерификации 65 % и молекулярной массой  $160 \pm 2$  кДа; гуанидин углекислый квалификации х.ч.; бор гидрид натрия (Sigma-Aldrich, США) – белый кристаллический порошок с массовой

долей основного вещества  $\geq 99$  %; натрий йоднокислый мета (ТУ 6-09-02-54-74) квалификации ч.д.а.

УФ-спектры водных растворов образцов были сняты на спектрофотометре UV-1280 (Shimadzu, Япония), в диапазоне  $\lambda = 180–400$  нм. ИК-спектры записывали на спектрометре Vector 22 в области длин волн  $400–4000$   $\text{см}^{-1}$  в таблетках KBr (3 мг образца / 300 мг KBr). Молекулярно-массовые характеристики синтезированных производных определяли методом высокоэффективной гельпроникающей хроматографии на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity. Контроль процесса анализа осуществляли с помощью рефрактометрического детектора с использованием хроматографической колонки PL aquagel-ОН MIXED длиной 300 мм и внутренним диаметром 7,5 мм (Waters, США). В качестве элюента использовали 0,1 н водный раствор нитрата натрия. Объемная скорость потока элюента составляла 0,8 мл/мин.

Содержание азота (N, %) в образцах определяли на элементном анализаторе марки Eura EA (Italy). Затем по содержанию азота вычисляли степень замещения (СЗ) каждого образца. Количество гуанидина в синтезированных соединениях найдено методом ацидиметрического титрования.

Значения рКа в конечных продуктах реакции вычисляли следующим образом: 50 мг образца растворяли в воде, затем к образовавшемуся раствору добавляли 0,1 н HCl и доводили pH до 3. После этого при постоянном перемешивании проводили титрование, добавляя аликвоты 0,1 н раствора NaOH. Величину pH раствора контролировали с помощью pH-метра (SevenCompact S220-Basic, Mettler Toledo, Германия). Значение рКа устанавливали по величине pH, при котором находилась середина плато на кривой титрования, как описано в работе [16].

**Периодатное окисление пектина.** На начальном этапе требовалось получение полиальдегидпектина с различной степенью окисления. Для этого в склянку из темного стекла емкостью 500 мл помещали 0,01 моль пектина, приливали 200 мл ацетатного буфера с pH 4,25 и оставляли перемешиваться до полного растворения полисахарида. Далее добавляли 0,2 н раствора  $\text{NaIO}_4$  при молярном соотношении пектин: $\text{IO}_4^- = 1:1,5$ . Процесс периодатного окисления пектина продолжался 1–5 ч, при температуре 20 °С. По окончании реакции периодатного окисления продукты осаждали ацетоном. Выпавшие осадки собирали на фильтре Шотта, промывали 70 % этиловым спиртом до отрицательной реакции на ионы  $\text{IO}_4^-$  и  $\text{IO}_3^-$  (контроль по реакции с раствором азотнокислого серебра) и сушили в темноте под вакуумом над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Степень окисления ( $\gamma_{\text{ок}}$ ) функционализированного пектина, вычисленная методом обратного йодометрического титрования [17], составила 18–47 моль%.

**Химическая модификация гуанидина полиальдегидпектином.** Взаимодействие окисленного пектина с гуанидином проводили в водной среде по методике, которая состояла в следующем. В стакан объ-

емом 500 мл, помещали 0,01 моль функционализированного пектина с различной степенью окисления, затем добавляли 100–200 мл воды, после полного растворения активированного полисахарида, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке, вливали раствор, содержащий 0,35 моль  $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{NH} \times 1/2 \text{H}_2\text{CO}_3$ . Реакция протекала при 20 °С, значении pH 8,8–9,0 и в течение 2 часов. Стабилизация азометиновых связей ( $-\text{C}=\text{N}-$ ) проводилась боргидридом натрия. Восстанавливающего реагента брали в 2-кратном мольном избытке в расчете на 1 моль гуанидинсодержащего элементарного звена пектина. Химическая трансформация азометиновых связей в аминные связи продолжалась 10 ч, при  $t = 20^\circ\text{C}$  и постоянном перемешивании. В конце добавляли 0,5 М раствор HCl (или  $\text{HNO}_3$ , HI, HF,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}-(\text{CHOH})_4-\text{COOH}$ ) и доводили pH раствора до 6,5–6,8. Полученный раствор диализовали против дистиллированной воды в течение 24 часов (с трехкратной сменной диализной воды). Диализат подвергали сублимационной сушке.

**Исследование острой токсичности.** Острую токсичность гуанидинсодержащих производных пектина исследовали согласно «Методическим указаниям по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [18]. Расчет однократной полулетальной дозы ( $\text{LD}_{50}$ ) при пероральном введении проводили на мышах по экспресс-методу Прозоровского. Для постановки эксперимента было использовано 150 беспородных белых мышей самцов массой тела 19–22 г в возрасте 10–12 недель к моменту введения исследуемых образцов. Мышей выдерживали на карантине в течение 14 дней до проведения эксперимента. Состояние мышей оценивали в течение первого часа, а также через 1, 3, 7 и 14 суток после введения. У экспериментальных мышей регистрировали такие показатели как поведение, дыхание, состояние слизистых покровов, изменение массы тела, характер фекалий, потребление пищи и воды.

**Определение антимикробной активности гуанидинсодержащих производных пектина в условиях *in vitro*.** В качестве тестовых культур для определения антимикробной активности гуанидинсодержащих производных пектина нами были выбраны следующие микроорганизмы: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*. Антимикробное действие синтезированных соединений исследовано при концентрации 200 мкг/мл, методом диффузии в агар, основанном на способности изучаемых веществ диффундировать в питательную среду, на которую производится высеивание тест-культур, и подавлять рост микроорганизмов (мм). Диаметр зон задержки роста микроорганизмов меньше 10 мм оценивали, как отсутствие антимикробной активности, 10–15 мм – слабая активность, 15–20 мм – умеренно выраженная активность, свыше 20 мм – выраженная активность. Каждый образец испытывался в трех параллельных опытах. Полученные данные обрабатывали статистически с учетом критерия Стьюдента [19].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанный метод химической модификации гуанидина полиальдегидпектином интересен тем, что при одинаковых условиях реакции, но различной степени окисления полисахарида удается фиксировать в полимерную цепь заданное количество катионных фрагментов и тем самым оказывать влияние на характеристики конечных продуктов. Как видно из ниже представленной таблицы 1, степень замещения образцов составляет 30–90 моль%, содержание гуанидина 8,0–24,7 %, значение  $\text{pK}_a$  8,2–9,2  $\pm 0,1$  и молекулярная масса 26 000–10 000 Да. Эти данные доказывают возможность получения катионного пектина с различной молекулярной массой, составом и содержанием физиологически активных азотсодержащих группировок.

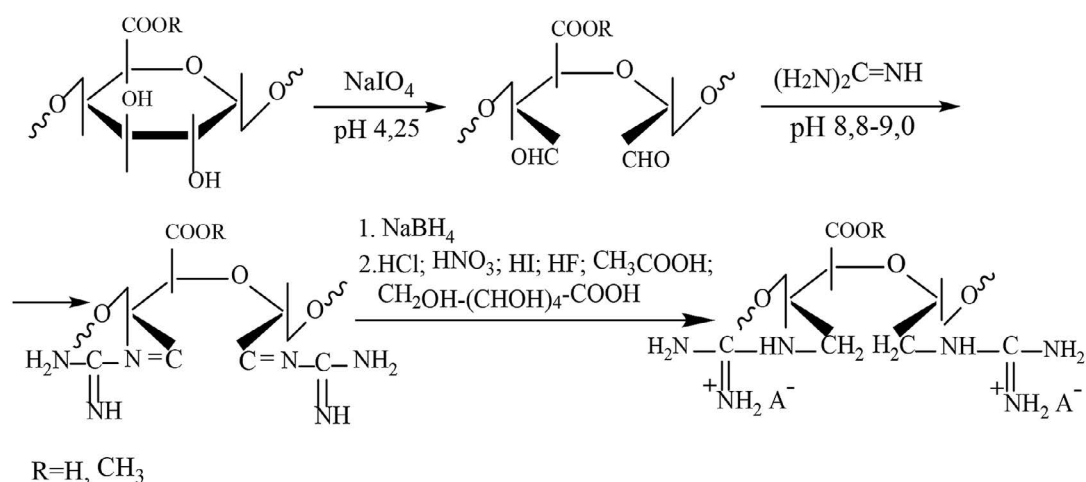


Рисунок 1. Общая схема синтеза гуанидинсодержащих производных пектина

Figure 1. General scheme for the synthesis of guanidine-containing pectin derivatives

**Таблица 1.** Основные характеристики синтезированных образцов

**Table 1.** Main characteristics of synthesized samples

| У <sub>ок</sub> ПАП, моль%<br>У <sub>ок</sub> РАР, mol% | Содержание азота, %<br>Nitrogen content, % | Степень замещения, моль%<br>Degree of substitution, mol% | Содержание гуанидина, %<br>Guanidine content, % | Значение рКа<br>pKa value | [η]*, дЛ/г<br>[η]*, dL/g | М*, Да<br>M*, Da |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------|
| 18                                                      | 6,5                                        | 30                                                       | 8,0                                             | 8,2 ± 0,1                 | 0,23                     | 26 000           |
| 26                                                      | 9,2                                        | 44                                                       | 11,8                                            | 8,5 ± 0,1                 | 0,20                     | 21 000           |
| 35                                                      | 12,1                                       | 60                                                       | 16,2                                            | 8,8 ± 0,1                 | 0,15                     | 15 000           |
| 42                                                      | 15,3                                       | 78                                                       | 21,5                                            | 9,0 ± 0,1                 | 0,13                     | 13 000           |
| 47                                                      | 16,8                                       | 90                                                       | 24,7                                            | 9,2 ± 0,1                 | 0,09                     | 10 000           |

**Примечание.** [η]\* – характеристическая вязкость образцов, вычислена в 0.1 н растворе ацетата натрия в воде при 25 °С; М – молекулярная масса.

**Note.** [η]\* – intrinsic viscosity of the samples, calculated in a 0.1 N solution of sodium acetate in water at 25 °C; M – molecular weight.

Присутствие гуанидина в структуре пектина подтверждено методом УФ-спектроскопии. В водных растворах гуанидина и его полимерной формы наблюдалась интенсивная полоса поглощения в области  $\lambda_{\text{max}} = 195$  нм, что доказывало наличие гуанидиновых фрагментов в полученных соединениях.

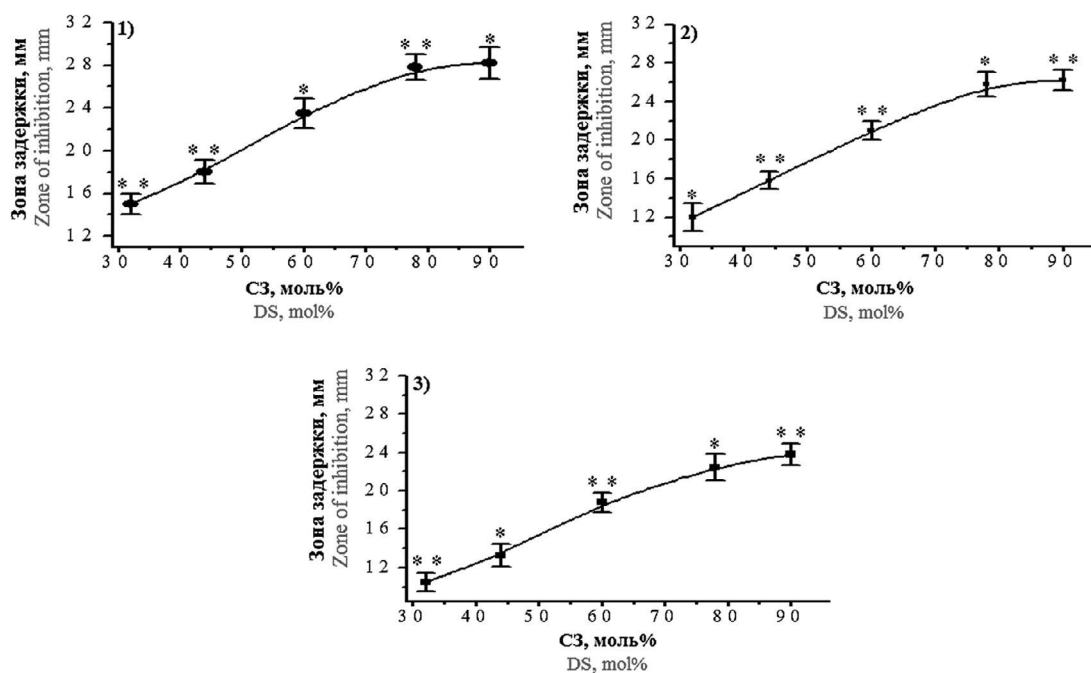
В ИК-спектре продуктов реакции присутствовали полосы поглощения в области 3400–3390 см<sup>-1</sup> ν(OH), 3270–3250 см<sup>-1</sup> (—NH<sub>2</sub>), 2945–2930 см<sup>-1</sup> ν(CH), 1610–

1650 см<sup>-1</sup> (—C=O), 1550–1570 см<sup>-1</sup> (—NH—), 1410–1425 см<sup>-1</sup> δ<sub>as</sub>(—OCH<sub>3</sub>).

При проведении токсикологических исследований было установлено, что значение ЛД<sub>50</sub> для всех синтезированных соединений составляет порядка 3000–3700 мг/кг. Эти результаты позволяют отнести их к разряду практически не токсичных веществ (V-й класс).

В некоторых исследованиях [20, 21] доказано, что величина антимикробного эффекта катионных макромолекул зависит от количественного содержания положительно заряженных группировок, точнее общего заряда синтезированного полимера. Исходя из этих сведений, первоначально требовалось провести сравнительное исследование образцов с различной степенью замещения и соответственно значением рКа.

Представленные на рисунке 2 результаты микробиологических исследований подтверждают гипотезу о различном уровне антимикробной активности синтезированных соединений. Видно, что зона задержки роста микробных культур коррелирует со степенью замещения образцов. Так, например, образец со степенью замещения 30 моль% обладает наименьшим противомикробным действием в отношении патогенных культур. С увеличением количественного содержания гуанидиновых группировок закономерно начинает возрастать выраженность антимикробного действия. Здесь можно увидеть, что для образца с предельным содержанием гуанидиновых групп



**Рисунок 2.** Влияние содержания гуанидиновых группировок в образцах (в виде гидрохлоридов) на антимикробную активность. 1 – *S. aureus*; 2 – *P. aeruginosa*; 3 – *C. albicans* (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01; n = 3–4)

**Figure 2.** Influence of the content of guanidine groups in samples (in the form of hydrochlorides) on antimicrobial activity. 1 – *S. aureus*; 2 – *P. aeruginosa*; 3 – *C. albicans* (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01; n = 3–4)

(90 моль%) зона задержки роста в отношении *S. aureus* составляет  $28 \pm 1,6$  мм, *P. aeruginosa*  $26 \pm 1,2$  мм и *C. albicans*  $23 \pm 1,6$  мм соответственно.

Нужно также добавить, что низкомолекулярный гуанидин практически не обладал антимикробной активностью. При концентрации мономера 200 мг/мл зона подавления роста *S. aureus* составила  $10 \pm 0,6$  мм, *P. aeruginosa*  $8 \pm 1,2$  мм и *C. albicans*  $8 \pm 0,5$  мм. При этом, его химическая фиксация в элементарные звенья полисахарида даже в наименьшем количестве, обеспечивало полимерным соединениям соответствующую активность. Эти сравнительные данные подтверждают необходимость присутствия множества физиологически активных гуанидиновых группировок в цепи полисахарида для проявления наиболее высокого уровня антимикробной активности.

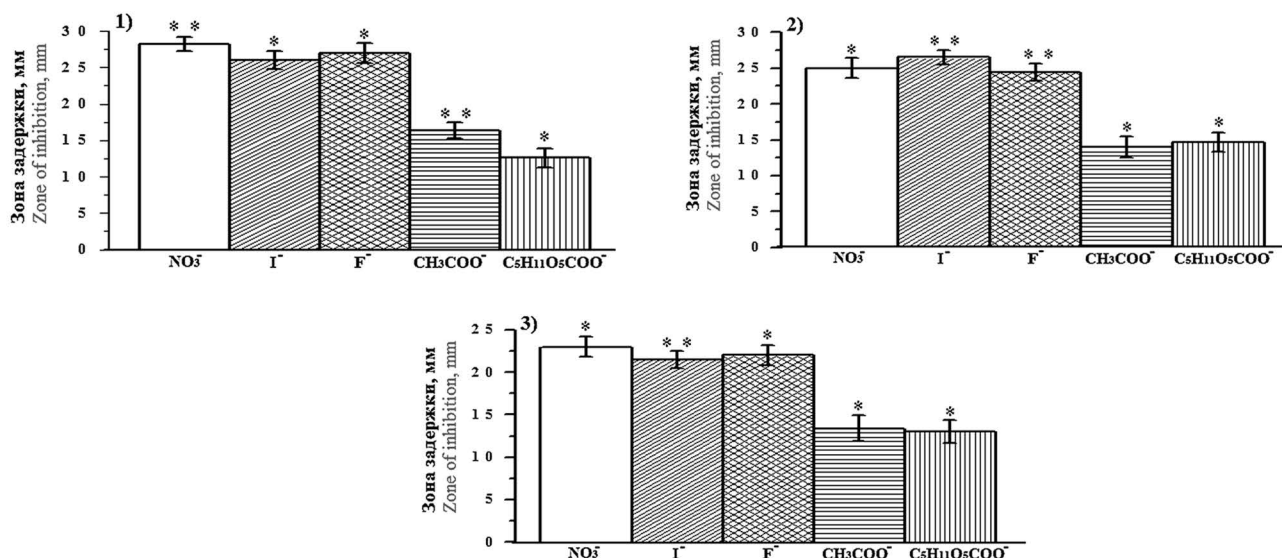
Важное значение в определении антимикробной активности и токсичности катионных соединений играют низкомолекулярные противоионы, функция которых заключается в компенсации положительных зарядов, расположенных в макромолекулярной цепи [22, 23]. Синтезированные гуанидинсодержащие производные пектина являются положительно заряженными полимерными соединениями. Эти сведения позволяют сделать заключение, что при одинаковых физико-химических характеристиках катионных полимеров, но различных противоионах величина антимикробного воздействия может сильно варьировать. В связи с этим представлялось важным исследовать влияние противоионов на уровень активности гуанидинсодержащих производных пектина.

Результаты исследования (рисунок 3) показали, что природа противоиона существенно влияет на антимикробные свойства гуанидинсодержащих про-

изводных пектина. Полимерные соли исследуемых образцов, полученные нейтрализацией гуанидиновых групп сильными неорганическими кислотами, обладали практически одинаковым уровнем антимикробной активности. Однако протонирование гуанидиновых фрагментов карбоксилат-анионами органических кислот, приводило к снижению противомикробной эффективности. С большой вероятностью, такая закономерность обусловлена донорно-акцепторными свойствами противоионов, в последствии оказывающих влияние на перераспределение электронной плотности в гуанидиновых группировках, расположенных вдоль основной макроцепи пектина.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный анализ гуанидинсодержащих производных пектина с различными характеристиками показал, что выраженность антимикробного действия синтезированных соединений в отношении бактерий и грибов рода *Candida* зависит от количественного содержания катионных группировок и природы противоиона. Так, было выявлено, что наибольшей активностью обладает образец со степенью замещения 90 моль% и значением  $pK_a$   $9,2 \pm 0,1$ . Нейтрализация гуанидиновых групп карбоксилсодержащими кислотами приводит к снижению антимикробной активности полимерных солей. Эти данные позволяют прогнозировать создание наиболее подходящей структуры, обладающей требуемой антимикробной активностью. При этом, несомненно возникают вопросы, охватывающие зависимость антимикробной активности от молекулярных характеристик образцов.



**Рисунок 3.** Влияние противоионов на антимикробные свойства гуанидинсодержащих производных пектина (C3 = 90 моль%).

1 – *S. aureus*; 2 – *P. aeruginosa*; 3 – *C. albicans* (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ;  $n = 3-4$ )

**Figure. 3.** The effect of counterions on the antimicrobial properties of guanidine-containing pectin derivatives (DS = 90 mol%).

1 – *S. aureus*; 2 – *P. aeruginosa*; 3 – *C. albicans* (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ;  $n = 3-4$ )

Эти вопросы, еще не изучены, но от их решения несомненно будет зависеть создание нового класса высокоэффективных и низкотоксичных антимикробных полимеров.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Aslam B., Wang W., Arshad M. I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M. H. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*. 2018;11:1645–1658. DOI: 10.2147/idr.s173867.
2. Ergene C., Yasuhara K., Palermo E. F. Biomimetic antimicrobial polymers: recent advances in molecular design. *Polymer Chemistry*. 2018;9:2407–2427. DOI: 10.1039/C8PY00012C.
3. Babutan I., Lucaci A., Botiz I. Antimicrobial Polymeric Structures Assembled on Surfaces. *Polymers*. 2021;13(10):1552. DOI: 10.3390/polym13101552.
4. Namivandi-Zangeneh R., Wong E. H., Boyer C. Synthetic Antimicrobial Polymers in Combination Therapy: Tackling Antibiotic Resistance. *ACS Infectious Diseases*. 2021;7(2):215–253. DOI:10.1021/acsinfectdis.0c00635.
5. Mortazavian H., Foster L. L., Bhat R., Patel S., Kuroda K. Decoupling the functional roles of cationic and hydrophobic groups in the antimicrobial and hemolytic activities of methacrylate random copolymers. *Biomacromolecules*. 2018;19:4370–4378. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b01256.
6. Molotkovsky R. J., Galimzyanov T. R., Ermakov Yu. A. Heterogeneity in Lateral Distribution of Polycations at the Surface of Lipid Membrane: From the Experimental Data to the Theoretical Model. *Materials*. 2021;14:6623. DOI: 10.3390/ma14216623.
7. Yanez-Macías R., Munoz-Bonilla A., De Jesus-Tellez M. A., Maldonado-Textle H., Guerrero-Sánchez C., Schubert U. S., Guerrero-Santos R. Combinations of Antimicrobial Polymers with Nanomaterials and Bioactives to Improve Biocidal Therapies. *Polymers*. 2019;11(11):1789. DOI: 10.3390/polym11111789.
8. Григорьева М. Н., Стельмах С. А., Астахова С. А., Центр И. М., Базарон Л. У., Батоев В. Б., Могнонов Д. М. Синтез сополимеров гидрохлоридов полиалкилгуанидинов и их антибактериальная активность в отношении условно-патогенных микроорганизмов *Bacillus cereus* и *Escherichia coli*. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(2):29–33. DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-2-29-33.
9. Qian L., Guan Y., He B., Xiao H. Modified guanidine polymers: Synthesis and antimicrobial mechanism revealed by AFM. *Polymer*. 2008;49(10):2471–2475. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.03.042.
10. Zhang Z., Peng P., Wu Q., Zhang J., Wu M., Liu J., Yang J. Preparation and antibacterial properties of poly(hexamethylene guanidine hydrochloride) modified ionic waterborne polyurethane. *Progress in Organic Coatings*. 2021;156:106246. DOI: 10.1016/j.porgcoat.2021.106246.
11. Chen S., Li C., Hou T., Cai Y., Liang L., Chen L., Li M. Polyhexamethylene guanidine functionalized chitosan nanofiber membrane with superior adsorption and antibacterial performances. *Reactive and Functional Polymers*. 2019;145:104379. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104379.
12. Ахмедов О. Р., Шомуротов Ш. А., Тураев А. С. Особенности синтеза и антимикробные свойства гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы. *Химия растительного сырья*. 2021;3:73–82. DOI:10.14258/jcprm.2021038705.
13. Шомуротов Ш. А., Ахмедов О. Р., Тураев А. С., Мамадуллаев Г. Х. Противотуберкулезная активность и фармакокинетика полимерных конъюгатов изониазида и этамбутола. *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;6:67–71. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-6-23-27.
14. Keshk S. M. A. S., Bondock S., El-Zahhar A. A., Haija M. A. Synthesis and characterization of novel Schiff's bases derived from dialdehyde cellulose-6-phosphate. *Cellulose*. 2019;26:3703–3712. DOI: 10.1007/s10570-019-02360-w.
15. Zhang L., Yan P., Li Ya., He X., Dai Yu., Tan Z. Preparation and antibacterial activity of a cellulose-based Schiff base derived from dialdehyde cellulose and L-lysine. *Industrial Crops & Products*. 2020;145:112126. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112126.
16. Rawlinson L. B., Ryan S. M., Mantovani G., Syrett J. A., Haddleton D. M., Brayden D. J. Antibacterial Effects of Poly(2-(dimethylamino ethyl)methacrylate) against Selected Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Biomacromolecules*. 2010;11(2):443–453. DOI: 10.1021/bm901166y.
17. Туник Т. В., Немченко У. М., Ганенко Т. В., Юринова Г. В., Джоиев Ю. П., Сухов Б. Г., Злобин В. И., Трофимов Б. А. Синтез и спектральная охарактеризация новых биоразлагаемых производных арабиногалактана для диагностики и терапии. *Известия Российской академии наук. Серия физическая*. 2019;83(3):408–414. DOI: 10.1134/s0367676519030268.
18. Хабриева Р. У., ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: ОАО «Издательство «Медицина»; 2005. 832 с.
19. Гланц С. Медико-биологическая статистика М.: Практика; 1999. 459 с.
20. Munoz-Bonilla A., López D., Fernández-García M. Providing Antibacterial Activity to Poly(2-Hydroxy Ethyl Methacrylate) by Copolymerization with a Methacrylic Thiazolium Derivative. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(12):4120–4133. DOI: 10.3390/ijms19124120.
21. Timofeeva L. M., Kleshcheva N. A., Moroz A. F., Didenko L. V. Secondary and Tertiary Polydiallylammonium Salts: Novel Polymers with High Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules*. 2009;10(11):2976–2986. DOI: 10.1021/bm900435v.
22. Sharma S. K., Chauhan G. S., Gupta R., Ahn H. Tuning anti-microbial activity of poly(4-vinyl 2-hydroxyethyl pyridinium) chloride by anion exchange reactions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2009;21(2):717–724. DOI: 10.1007/s10856-009-3932-9.
23. Харитонов Е. В., Журавлев О. Е., Червинец В. М., Ворончихина Л. И., Демидова М. А. Синтез и антимикробная активность тетрахлорферратов четвертичного аммония, пиридиния и морфолина. *Химико-фармацевтический журнал*. 2012;46(5):6–8. DOI: 10.30906/0023-1134-2012-46-5-6-8.

## REFERENCES

1. Aslam B., Wang W., Arshad M. I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M. H. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*. 2018;11:1645–1658. DOI: 10.2147/idr.s173867.
2. Ergene C., Yasuhara K., Palermo E. F. Biomimetic antimicrobial polymers: recent advances in molecular design. *Polymer Chemistry*. 2018;9:2407–2427. DOI: 10.1039/C8PY00012C.
3. Babutan I., Lucaci A., Botiz I. Antimicrobial Polymeric Structures Assembled on Surfaces. *Polymers*. 2021;13(10):1552. DOI: 10.3390/polym13101552.
4. Namivandi-Zangeneh R., Wong E. H., Boyer C. Synthetic Antimicrobial Polymers in Combination Therapy: Tackling Antibiotic Resistance. *ACS Infectious Diseases*. 2021;7(2):215–253. DOI:10.1021/acsinfectdis.0c00635.
5. Mortazavian H., Foster L. L., Bhat R., Patel S., Kuroda K. Decoupling the functional roles of cationic and hydrophobic groups in the antimicrobial and hemolytic activities of methacrylate random copolymers. *Biomacromolecules*. 2018;19:4370–4378. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b01256.
6. Molotkovsky R. J., Galimzyanov T. R., Ermakov Yu. A. Heterogeneity in Lateral Distribution of Polycations at the Surface of Lipid Membrane: From the Experimental Data to the Theoretical Model. *Materials*. 2021;14:6623. DOI: 10.3390/ma14216623.
7. Yanez-Macías R., Munoz-Bonilla A., De Jesus-Tellez M. A., Maldonado-Textle H., Guerrero-Sánchez C., Schubert U. S., Guerrero-Santos R. Combinations of Antimicrobial Polymers with Nanomaterials and Bioactives to Improve Biocidal Therapies. *Polymers*. 2019;11(11):1789. DOI: 10.3390/polym11111789.

8. Grigor'eva M. N., Stel'makh S. A., Astakhova S. A., Tsenter I. M., Bazarov L. U., Batoev V. B., Mogonov D. M. Synthesis of Polyalkyl-guanidine Hydrochloride Copolymers and Their Antibacterial Activity Against Conditionally Pathogenic Microorganisms *Bacillus Cereus* and *Escherichia Coli*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(2):29–33. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-2-29-33.
9. Qian L., Guan Y., He B., Xiao H. Modified guanidine polymers: Synthesis and antimicrobial mechanism revealed by AFM. *Polymer*. 2008;49(10):2471–2475. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.03.042.
10. Zhang Z., Peng P., Wu Q., Zhang J., Wu M., Liu J., Yang J. Preparation and antibacterial properties of poly(hexamethylene guanidine hydrochloride) modified ionic waterborne polyurethane. *Progress in Organic Coatings*. 2021;156:106246. DOI: 10.1016/j.porgcoat.2021.106246.
11. Chen S., Li C., Hou T., Cai Y., Liang L., Chen L., Li M. Polyhexamethylene guanidine functionalized chitosan nanofiber membrane with superior adsorption and antibacterial performances. *Reactive and Functional Polymers*. 2019;145:104379. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104379.
12. Akhmedov O. R., Shomurotov Sh. A., Turaev A. S. Peculiarities of synthesis and antimicrobial properties of guanidine-containing carboxymethylcellulose derivatives. *Chemistry of plant raw materials* 2021;3:73–82. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2021038705.
13. Shomurotov Sh. A., Akhmedov O. R., Turaev A. S., Mamadullaev G. Kh. Antituberculosis activity and pharmacokinetics of polymer conjugates of isoniazid and ethambutol. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;6:67–71. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-6-23-27.
14. Keshk S. M. A. S., Bondock S., El-Zahhar A. A., Haija M. A. Synthesis and characterization of novel Schiff's bases derived from dialdehyde cellulose-6-phosphate. *Cellulose*. 2019;26:3703–3712. DOI: 10.1007/s10570-019-02360-w.
15. Zhang L., Yan P., Li Ya., He X., Dai Yu., Tan Z. Preparation and antibacterial activity of a cellulose-based Schiff base derived from dialdehyde cellulose and L-lysine. *Industrial Crops & Products*. 2020;145:112126. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112126.
16. Rawlinson L. B., Ryan S. M., Mantovani G., Syrett J. A., Haddleton D. M., Brayden D. J. Antibacterial Effects of Poly(2-(dimethylamino ethyl)methacrylate) against Selected Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Biomacromolecules*. 2010;11(2):443–453. DOI: 10.1021/bm901166y.
17. Tunik T. V., Nemchenko U. M., Ganenko T. V., Yurina G. V., Dzhi-oiev Yu. P., Sukhov B. G., Zlobin V. I., Trofimov B. A. Synthesis and Spectral Characterization of New Biodegradable Arabinogalactan Derivatives for Diagnosis and Therapy. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. 2019;83(3):408–414. (In Russ.) DOI: 10.1134/s0367676519030268.
18. Khabriev R. U., editor. Guidance on the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Moscow: OAO «Izdatel'stvo «Meditsina»; 2005. 832 p. (In Russ.).
19. Glants S. Medical and Biological Statistics. Moscow: Praktika; 1999. 459 p. (In Russ.).
20. Munoz-Bonilla A., López D., Fernández-García M. Providing Antibacterial Activity to Poly(2-Hydroxy Ethyl Methacrylate) by Copolymerization with a Methacrylic Thiazolium Derivative. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(12):4120–4133. DOI: 10.3390/ijms19124120.
21. Timofeeva L. M., Kleshcheva N. A., Moroz A. F., Didenko L. V. Secondary and Tertiary Polydiallylammonium Salts: Novel Polymers with High Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules*. 2009;10(11):2976–2986. DOI: 10.1021/bm900435v.
22. Sharma S. K., Chauhan G. S., Gupta R., Ahn H. Tuning anti-microbial activity of poly(4-vinyl 2-hydroxyethyl pyridinium) chloride by anion exchange reactions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2009;21(2):717–724. DOI: 10.1007/s10856-009-3932-9.
23. Kharitonova E. V., Zhuravlev O. E., Chervinets V. M., Voronchikhina L. I., Demidova M. A. Synthesis and antimicrobial activity of quaternary ammonium, pyridinium, and morpholinium tetrachloroferrates. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;46(5):6–8. DOI: 10.30906/0023-1134-2012-46-5-6-8 (In Russ.).