

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-30-34>  
УДК 547.458



Оригинальная статья/Research article

## Антимикробная активность *N*-арилиден(алкилиден)гидразидов карбоксиметилальгиновой кислоты

Д. Н. Косарева<sup>1\*</sup>, Е. П. Ананьева<sup>1</sup>, А. А. Иозеп<sup>1</sup>

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, лит. А

\*Контактное лицо: Косарева Дарья Николаевна. E-mail: kutkinadaria@gmail.com

Статья получена: 03.06.2019. Статья принята к печати: 11.07.2019

### Резюме

**Введение.** В настоящее время из-за появления новых антибиотиков широкого спектра действия и синтетических химиотерапевтических средств использование препаратов нитрофуранового ряда существенно снизилось. При этом они сохраняют значение для лечения неосложненных инфекций мочевыводящих путей и кишечных инфекций, а также в качестве местных антисептиков. Однако низкая растворимость в воде, возможность возникновения нежелательных реакций, а также отсутствие пролонгированного действия значительно ограничивают их использование. Известно, что включение биологически активных веществ в молекулу полисахарида позволяет совершенствовать уже известные лекарственные препараты, при этом изменяя их свойства. Так, при введении 5-нитрофуранового цикла в нативную альгиновую кислоту и некоторые её производные привело к появлению антифунгальной активности и улучшению растворимости. Однако сведения об антимикробной активности *N*-арилиден(алкилиден)гидразидов карбоксиметилальгиновой кислоты в литературе практически отсутствуют.

**Цель.** Синтез и изучение антимикробной активности *N*-арилиден(алкилиден)гидразидов карбоксиметилальгиновой кислоты при различном содержании биологически активного фрагмента.

**Материалы и методы.** Для доказательства строения синтезированных веществ были использованы ИК- и УФ-спектроскопия, антимикробная активность была анализирована методом двукратных серийных разведений на тест-культурах *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*.

**Результаты и обсуждение.** При введении 5-нитрофурфура и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина в молекулу карбоксиметилальгиновой кислоты были получены образцы с антимикробной активностью, чей спектр действия отличается от фурацилина. Так, в полимерном ацилгидразоне β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина обнаружено высокое противогрибковое действие в отношении *C. albicans*, фунгистатическое и фунгицидное действие достигает 1,8 и 3,6 мкг/мл, соответственно.

**Заключение.** Синтезированные образцы полимерных ацилгидразонов 5-нитрофурфура и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина обладают антимикробным действием, и в отличие от фурацилина (препарат сравнения) хорошо растворимы в воде и не оказывают раздражающего действия на кожу и слизистые. Выявлено содержание 5-нитрофуранового фрагмента, при котором достигается максимальная антимикробная активность.

**Ключевые слова:** карбоксиметилполисахариды, *N*-арилиденгидразиды карбоксиметилполисахаридов, нитрофураны, противогрибковая и противобактериальная активность.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Авторы Косарева Д. Н. и Иозеп А. А. придумали и разработали эксперимент. Косарева Д. Н. синтезировала образцы, провела исследование их структуры и определение степени замещения, а также провела исследования по микробиологической активности. Косарева Д. Н., Иозеп А. А., Ананьева Е. П. участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

**Для цитирования:** Косарева Д. Н., Ананьева Е. П., Иозеп А. А. Антимикробная активность *N*-арилиден(алкилиден)гидразидов карбоксиметилальгиновой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 30–34.

## Antimicrobial Activity of *N*-aryliden(alkylidene)hydrazides of Carboxymethylalginic Acid

Daria N. Kosareva<sup>1\*</sup>, Elena P. Ananieva<sup>1</sup>, Anatolii A. Iozep<sup>1</sup>

1 – Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University of the Ministry of Healthcare of Russia, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

\*Corresponding author: Daria N. Kosareva. E-mail: kutkinadaria@gmail.com

Received: 03.06.2019. Accepted: 11.07.2019

### Abstract

**Introduction.** Nowadays, due to the emergence of new broad-spectrum antibiotics and synthetic chemotherapeutic agents, the use of nitrofurans has significantly decreased. At the same time, they remain important for the treatment of urinary tract infections and intestinal infections, as well as local antiseptics. However, low solubility in water, the possibility of undesirable reactions, as well as the absence of prolonged action significantly limit their use. It is known that the inclusion of biologically active substances in the polysaccharide molecule allows improving the already known drugs while changing their properties. Thus, the introduction of the 5-nitrofur cycle in native alginic acid and some of its derivatives led to the emergence of antifungal activity and improved solubility. However, the information about the antimicrobial activity of *N*-aryliden(alkylidene)hydrazides of carboxymethylalginic acid in the literature are practically absent.

**Aim.** Synthesis and study of antimicrobial activity of *N*-aryliden(alkylidene)hydrazides of carboxymethylalginic acid with different content of a biologically active fragment.

**Materials and methods.** For the proof of the structure of the synthesized substances were used IR- and UV-spectroscopy, antimicrobial activity was analyzed by double serial dilution on the test-cultures *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*.

**Results and discussion.** With the introduction of 5-nitrofur and β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein into the carboxymethylalginic acid, samples with antimicrobial activity were obtained, whose spectrum of action differs from furacilin. Thus, in the polymer acylhydrazones β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein of alginic acid, a high antifungal action against *C. albicans* was found, the fungistatic and fungicidal action reaches 1,8 and 3,6 μg/ml.

**Conclusion.** The synthesized samples of polymer acylhydrazones 5-nitrofur and β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein have antimicrobial action, and unlike furacilin are highly soluble in water and do not irritate the skin and mucous membranes. The content of 5-nitrofur fragment, at which the maximum antimicrobial activity is achieved, is revealed.

© Косарева Д. Н., Ананьева Е. П., Иозеп А. А., 2019

© Kosareva D. N., Ananieva E. P., Iozep A. A., 2019

**Keywords:** carboxymethylpolysaccharides, *N*-arilidenhydrazide of carboxymethylpolysaccharides, nitrofurans, antifungal and antibacterial activity.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Authors Daria N. Kosareva and Anatolii A. Iozep invented and developed an experiment. Daria N. Kosareva synthesized samples, conducted a study of their structure and determination of the degree of substitution, as well as conducted studies on microbiological activity. Daria N. Kosareva, Anatolii A. Iozep, Elena P. Ananieva participated in the writing of the article. All authors participated in the discussion of the results.

**For citation:** Kosareva D. N., Ananieva E. P., Iozep A. A. Antimicrobial activity of *N*-ariliden(alkylidene)hydrazides of carboxymethylalginic acid. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 30–34.

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из современных подходов к получению физиологически активных полимеров (ФАП) является включение различных БАВ в молекулы полисахаридов. Такая модификация позволяет синтезировать новые и совершенствовать уже известные лекарственные препараты, снижая их токсичность, пролонгируя действие, изменяя фармакокинетику, растворимость в воде и некоторые другие свойства.

С этой целью разработаны различные схемы химической модификации полисахаридов (карбоксиметильная, карбоксиэтильная и некоторые другие), от правильности выбора которых зависит сохранение активности введенного в полисахарид конкретного БАВ.

Препараты нитрофуранового ряда нашли применение еще в середине прошлого века. Не смотря на появление новых химиотерапевтических средств, они используются в урологии для лечения инфекции мочевыводящих путей и желчевыделительных органов, для очищения и промывания ран (при этом они не теряют действие при наличии гноя), используются при ожогах, пролежнях и мелких повреждениях кожи. Главными недостатками препаратов нитрофуранового ряда является появление нежелательных реакций организма и низкая растворимость активного вещества в воде [1].

Ранее нами [2] была предложена схема введения 5-нитрофурилового фрагмента в альгиновую кислоту (АК), используя карбоксиэтильную схему модификации полисахаридов. При этом оказалось, что полученные производные АК (полимерные ацилгидразоны 5-нитрофурфуrolа и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина) обладают антимикробной активностью и в отличие от препаратов нитрофуранового ряда хорошо растворимы в воде. Синтезированные образцы ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина обладают высокой фунгицидной и фунгистатической активностью и в 2 раза превосходят препарат сравнения в отношении грамположительных бактерий.

Эти результаты подтверждают и более ранние исследования активности полимерных аналогов фурацилина: 5-нитрофурфурилен- и 3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропенилиденгидразидов сульфатированной, карбоксиметилированной и на-

тивной альгиновой кислот [3]. В связи с этим интересно было сравнить активность полимерных БАВ от содержания нитрофуранового цикла в карбоксиметилальгиновой кислоте.

Поэтому целью нашей работы был синтез и изучение антимикробной активности *N*-арилиден(алкалиден)гидразидов карбоксиметилальгиновой кислоты, а также сравнение их активности с активностью *N*-арилиден(алкалиден)гидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали альгиновую кислоту (CAS № 9005-32-7, Acros Organics, США). При помощи гель-хроматографии на колонке К-16/40 («РЕАНАЛ», Венгрия) (1,6×40 см) с сефадексом марки G-200 (CAS № 9041-36-5, Sigma Aldrich, США) было установлено [4], что она состоит из полисахаридных фракций с молекулярной массой до 200 000 Да, которые в целом сохраняются после алкилирования. Содержание карбоксильных групп после переосаждения – 97%, а после очистки водной щелочью – 100%.

По разработанным ранее методикам из полисахаридов получали соли их карбоксиметилпроизводных и сами поликислоты [5], этиловые эфиры карбоксиметилальгиновой кислоты ( $C_{\text{км}}=1,3$ ;  $C_{\text{эз}}=0,3-0,48$ ) [5], которые использовали в дальнейшем в реакциях с биологически активными альдегидами.

*N*-арилиден(алкалиден)гидразидов карбоксиметилальгиновой кислоты получали по методике из статьи [2].

Строение полученных соединений доказано ИК- и УФ-спектроскопией [6].

## Метод определения антимикробной активности

Противомикробную активность изучали на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава РФ [7]. В качестве тест-культур были использованы *Staphylococcus aureus* штамм ATCC 6538-P, *Escherichia coli* штамм ATCC 25922, а также *Candida albicans* штамм ATCC 10231. Изучение антимикробной активности проводили методом двукратных серийных разведений. Взвесь тест-микроорганизмов готовили по стандарту мутности Мак-Фарланда ( $2 \cdot 10^8$  КОЕ/мл). Мик-

робная нагрузка составляла  $10^5$  КОЕ/мл для бактерий и  $10^4$  КОЕ/мл для дрожжеподобных грибов. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали наименьшую концентрацию препарата, вызывающего задержку размножения (МИК<sub>ст</sub> – минимальная статическая концентрация) или гибель тест-культуры (МИК<sub>ц</sub> – минимальная цидная концентрация).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектами микробиологического исследования являлись *N*-арилиден(алкилиден)гидразиды карбоксиметилальгиновой кислоты (КМАК) с различным содержанием 5-нитрофуранового цикла, полученные по схеме, разработанной в СПХФУ (рисунок 1) [6].

Полисахариды карбоксиметилировали хлоруксусной кислотой в изопропиловом спирте в присутствии щелочи. Образцы Na-соли КМАК (II) пропускали через колонку с катионитом КУ-2-8 (H<sup>+</sup>) для получения поликислот (III). Синтез сложных эфиров (IV) проводили в кипящем этиловом спирте в условиях автокатализа. Гидразиды карбоксиметилполисахарида (V) получали при выдержке этиловых эфиров поликислот в среде гидразин гидрата в течение суток.

Для получения гидразонов (VI) к натриевой соли гидразида в уксусной кислоте прибавляли 1-5-кратный избыток этанольного раствора 5-нитрофурфурола или β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина, реакционную массу перемешивали при 40 °С в течение 1 ч [6]. Продукт осаждали этиловым спиртом, переосаждали из воды этанолом и сушили в вакууме.

Все синтезированные образцы хорошо растворимы в воде в отличие от препаратов нитрофуранового ряда, что облегчает их дальнейшее использование.

Полученные вещества характеризовали процентным содержанием 5-нитрофуранового фрагмента.

В качестве препарата сравнения использовали фурацилин, структура которого наиболее близка к строению синтезированных образцов. Также были проанализированы исходные субстраты: 5-нитрофурфурол и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеин. Во всех исследуемых веществах рассчитывали содержание 5-нитрофуранового фрагмента.

Микробиологический анализ гидразида поликислоты (V), используемой в синтезе полимерных гидразонов, показал, что он не активен в отношении выбранных тест-микроорганизмов (таблица 1).

Как и ожидалось, фурацилин эффективен в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Однако дрожжеподобные грибы *C. albicans* не входят в спектр действия данного средства. При этом оказалось, что исходные субстраты 5-нитрофурфурол и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеин эффективны в отношении *S. aureus*, но проявляют меньшую активность в отношении *E. coli*. В то же время данные соединения в отличие от фурацилина обладают высоким фунгицидным и фунгистатическим действием.

Следует отметить, что 5-нитрофурфурол и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеин токсичны, вызывают раздражение кожи и слизистых. Как и фурацилин, они плохо растворяются в воде при комнатной температуре.

Введение в молекулы карбоксиметилальгиновой кислоты 5-нитро-2-фурильного фрагмента, также как и в случае карбоксиэтилальгиновой кислоты [2], привело к образованию полимерных гидразонов с антимикробной активностью, но спектр действия и минимальные ингибирующие концентрации (МИК) полу-

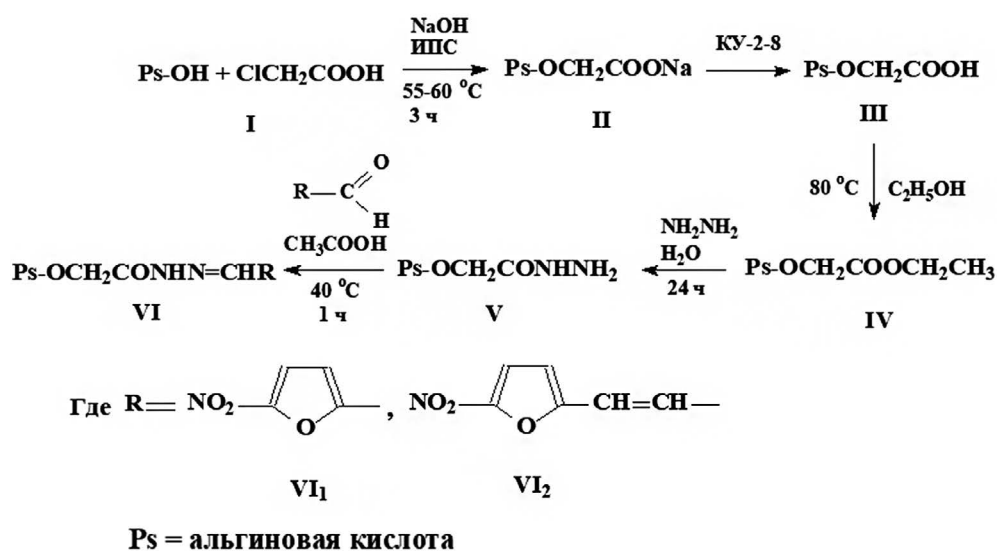


Рисунок 1. Схема химической модификации альгиновой кислоты

Figure 1. Scheme of chemical modification of alginic acid

**Таблица 1.** Противомикробная активность исходных веществ, препарата сравнения и N-арилиден(алкилиден)гидразидо в карбоксиметилальгиновой кислоты**Table 1.** Antimicrobial activity of the original substance, furacilin and N-arylidene(alkylidene)hydrazides of carboxymethylalginic acid

Образец		Содержание БАВ масс. %	Тест-микроорганизмы					
			<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
			МИК <sub>сг</sub> , мкг/мл	МИК <sub>ц</sub> , мкг/мл	МИК <sub>сг</sub> , мкг/мл	МИК <sub>ц</sub> , мкг/мл	МИК <sub>сг</sub> , мкг/мл	МИК <sub>ц</sub> , мкг/мл
Гидразид КМАК			Не активен в отношении выбранных тест-культур					
5-нитрофурфурол			1,2	4,9	4,7	19,9	0,6	1,2
β -(5-нитро-2-фурил)-акролеин			1,1	4,3	4,3	17,4	0,14	0,54
Фурацилин (препарат сравнения)			2,8	5,7	2,8	5,7	>500	-
VI <sub>1</sub>	4,6	5,5	21,9	Не активны в отношении <i>E.coli</i>		43,7	87,4	
	7,9	2,2	17,8			35,6	71,1	
	11,6	6,9	27,6			55,1	110,2	
	14,8	18,5	37,0			74	148	
VI <sub>2</sub>	5,0	6,6	13,1	Не активны в отношении <i>E.coli</i>		3,0	6,0	
	11,6	0,9	1,8			1,8	3,6	
	13,5	1,05	2,1			2,1	4,2	
	14,7	2,3	4,6			2,3	4,6	

ченных веществ несколько отличаются от активности фурацилина и исходных альдегидов (таблица 1). При этом синтезированные полимеры обладают хорошей растворимостью в воде, а также благодаря полисахаридной основе не оказывают раздражающего действия.

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что активность синтезированных производных полисахаридов зависит от содержания нитрофуранового фрагмента в образце. К сожалению, четкой закономерности влияния концентрации активного вещества в полимере на его ингибирующий эффект не выявлено. Однако отмечаются определенные концентрации БАВ, при которых антимикробная активность образца максимальная, и увеличение или уменьшение содержания активного компонента в полисахаридном образце приводит к снижению эффективности антимикробного действия.

Эта закономерность наблюдается для всех исследуемых нами модифицированных полисахаридов и микроорганизмов. Так, в полимерном ацилгидразоне  $\beta$ -(5-нитро-2-фурил)-акролеина (VI<sub>2</sub>) при содержании активного вещества 5,0% МИК<sub>ц</sub> составляет 13,1 мкг/мл в отношении *S. aureus* и 6,0 мкг/мл в отношении *C. albicans*. При увеличении концентрации 5-нитрофуранового цикла до 11,6% МИК<sub>ц</sub> снижается до 1,8 мкг/мл для грамположительных бактерий и 3,6 мкг/мл для дрожжеподобных грибов. При дальнейшем увеличении содержания активного вещества до 14,7% происходит уменьшение антибактериальной и антифунгальной активности. Подобная закономерность наблюдается и для N-арилиден(алкилиден)гидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты [2] и в

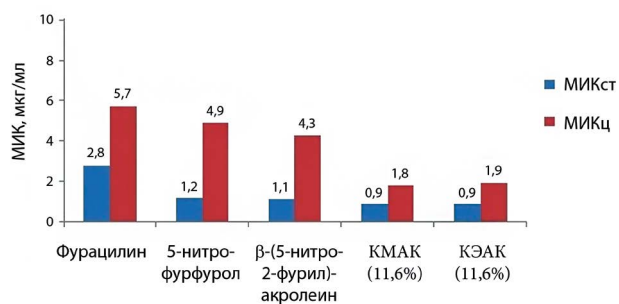
случае 5-нитрофурфуриденгидразидов карбокси-метилхитина [8].

Следовательно, для достижения максимальной активности модифицированного полисахарида необходимо вводить в его молекулу строго определенное количество биологически активного фрагмента. Например, в продукте реакции  $\beta$ -(5-нитро-2-фурил)-акролеина с КМАК в полисахариде должно быть 11–12% нитрофуранового цикла.

Не смотря на то, что исходные альдегиды (5-нитрофурфурол и  $\beta$ -(5-нитро-2-фурил)-акролеин) имеют примерно одинаковую антимикробную активность, синтезированные образцы полимерных ацилгидразонов  $\beta$ -(5-нитро-2-фурил)-акролеина (VI<sub>2</sub>), также как и соответствующие ацилгидразоны на основе карбоксиэтилальгиновой кислоты [2], оказались значительно более активными, чем ацилгидразоны 5-нитрофурфуrolа (VI<sub>1</sub>). Они имеют сильно выраженный бактерицидный и бактериостатический эффект в отношении *S. aureus* превосходящий препарат сравнения в 2 раза (рисунок 2) и сопоставимый с активностью исходного альдегида. В отношении *E.coli* все синтезированные соединения оказались не эффективны.

Как мы и ожидали, основываясь на исследовании N-арилиден(алкилиден)гидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты [2], полученные образцы производных карбоксиметилальгиновой кислоты проявляют высокую противогрибковую активность в отношении *C. albicans*, в отличие от фурацилина. Как и по отношению к *S. aureus* наибольшей антимикробной активностью обладают продукты реакции гидразида КМАК с  $\beta$ -(5-нитро-2-фурил)-акролеином, фунгистатическое и фунгицидное действие которых достигает 1,8 и 3,6 мкг/мл, соответственно (рисунок 3). Следует так же

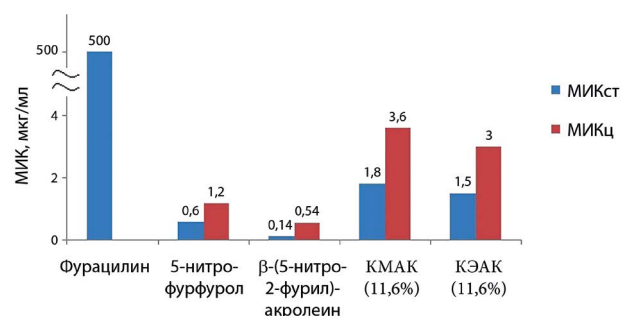




**Рисунок 2.** Антибактериальная активность фурацилина, 5-нитрофурурола, β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина и ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина по отношению к *S. aureus*

**Figure 2.** Antibacterial activity of furacilin, 5-nitrofurfural, β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein and acylhydrazones β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein of alginic acid on *S. aureus*

отметить, что соответствующие *N*-арилден(алкилиден) производные гидразидов карбоксиметил- и карбоксиэтилальгиновой кислоты имеют примерно одинаковое фунгистатическое и фунгицидное действие 1,5–1,8 и 3,0–3,6 мкг/мл, соответственно (рисунок 3).



**Рисунок 3.** Антифунгальная активность фурацилина, 5-нитрофурурола, β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина и ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина по отношению к *C. albicans*

**Figure 3.** Antifungal activity of furacilin, 5-nitrofurfural, β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein and acylhydrazones β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein of alginic acid on *C. albicans*

Механизм бактерицидного действия нитрофуранов связан с восстановлением нитрогрупп препаратов до токсичных продуктов, которые нарушают процесс клеточного дыхания. Модифицированные полисахариды имеют 5-нитрофурановые центры, которые способны создавать высокие концентрации биологически активного вещества в клетке, таким образом, проявляя выраженное антимикотическое действие.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение гидразонов 5-нитрофурурола и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина на основе карбоксиметилальгиновой кислоты показало, что синтезированные вещества обладают антимикробной активностью

и, в отличие от фурацилина и исходных альдегидов, хорошо растворимы в воде и не оказывают раздражающего действия.

Полученные образцы полимерных ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина обладают высоким фунгицидным и фунгистатическим эффектом, и в 2 раза превосходят препарат сравнения в отношении грамположительных бактерий.

Для достижения максимальной активности модифицированного полисахарида необходимо вводить в его молекулу строго определенное количество биологически активного фрагмента.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кукес В. Г. Клиническая фармакология. – М.: ГЭОТАР-Медиа. 2015: 1024.
2. Косарева Д. Н., Тарадейко Т. И., Галашева С. Н., Ананьева Е. П., Иоэп А. А. Антимикробная активность *N*-арилденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018; 3(24): 92–95.
3. Серебренникова Е. С., Давыдова В. Л., Гурина С. В., Иоэп А. А. Изучение антимикробной активности некоторых производных альгиновой кислоты. *Проблемы медицинской микологии*. 2013; 15(4): 60–62.
4. Серебренникова Е. С., Мороз М. С., Черёмушкин А. И., Иоэп А. А. Реакции карбоксиметилальгиновой кислоты с некоторыми *N*-нуклеофилами. *Бутлеровские сообщения*. 2012; 31(7): 18–23.
5. Серебренникова Е. С., Коломина Е. О., Иоэп А. А. Карбоксиметилальгиновая кислота и её реакции со спиртами. *Бутлеровские сообщения*. 2012; 30(6): 57–62.
6. Тарадейко Т. И., Галашева С. Н., Куткина Д. Н., Щенникова О. Б., Иоэп А. А. Синтез *N*-арилденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018; 2(23): 90–94.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К. 2012: 944.
8. Дударев В. Г., Тихомирова О. М., Иоэп А. А. Синтез и противомикробная активность производных карбоксиметилхитина. *Хим.-фарм. журнал*. 2013; 47(1): 32–35.

## REFERENCES

1. Kukes V. G. Clinical Pharmacology. – M.: GEOTAR-Media. 2015: 1024. (in Russ.).
2. Kosareva D. N., Taradeiko T. I., Galasheva S. N., Ananieva E. P., Iozep A. A. Antimicrobial activity of *N*-arylidenehydrazides of carboxyethylalginic acid. *Drug development & registration*. 2018; 3(24): 92–95.
3. Serebrennikova E. S., Davydova V. L., Gurina S. V., Iozep A. A. The study of the antimicrobial activity of some alginic acid derivatives. *Problems of Medical Mycology*. 2013; 15(4): 60–62 (in Russ.).
4. Serebrennikova E. S., Moroz M. S., Cheremushkin A. I., Iozep A. A. Reactions of carboxymethylalginic acid with some *N*-nucleophiles. *Butlerov messages*. 2012; 31(7): 18–23 (in Russ.).
5. Serebrennikova E. S., Kolomina E. O., Iozep A. A. Carboxymethylalginic acid and its reactions with alcohols. *Butlerov messages*. 2012; 30 (6): 57–62 (in Russ.).
6. Taradeiko T. I., Galasheva S. N., Kut'kina D. N., Shchennikova O. B., Iozep A. A. Synthesis of *N*-arylidenehydrazides of carboxyethylalginic acid. *Drug development & registration*. 2018; 2(23): 90–94 (in Russ.).
7. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part One / Ed. A. N. Mironova. – M.: Grief and K. 2012: 944 (in Russ.).
8. Dudarev V. G., Tikhomirova O. M., Iozep A. A. Synthesis and antimicrobial activity of carboxymethyl-chitin derivatives. *Chem.-farm. journal*. 2013; 47(1): 32–35 (in Russ.).