

А. И. Воробьева¹, Г. Р. Султанова², А. К. Булгаков², В. И. Зайнчковский³,
С. В. Колесов¹

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОПОЛИМЕРОВ НА ОСНОВЕ *N,N*-ДИАЛЛИЛ-*N,N*-ДИМЕТИЛАММОНИЙ ХЛОРИДА

¹ Учреждение Российской академии наук Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия, vorobjeva@anrb.ru;

² Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия;

³ Омский государственный аграрный университет, Омск, Россия

Методом радикальной полимеризации получены сополимеры *N,N*-диаллил-*N,N*-диметиламмоний хлорида с диоксидом серы, малеиновой кислотой, винилацетатом и изучены их биологические свойства. Установлено, что полимеры относятся к 4-му классу малоопасных соединений и проявляют выраженную антимикробную активность в отношении ряда бактерий и грибов.

Ключевые слова: *N,N*-диаллил-*N,N*-диметиламмоний хлорид; диоксид серы; малеиновая кислота; винилацетат; сополимеры; противомикробная активность.

Особое место среди биологически активных полимеров занимают синтетические катионные полиэлектролиты (КПЭ), обладающие антимикробной активностью [1, 2]. Благодаря их хорошей адсорбции на отрицательно заряженных мембранах клеток и мембранотропному действию создается высокая локальная концентрация антимикробного агента на поверхности клетки и повышается проницаемость мембран [1], вследствие чего обеспечивается повышенный транспорт лекарственного препарата в клетку. КПЭ также ингибируют бактериальные ферменты. Отмечается, что их активность возрастает с увеличением числа ионогенных групп в макромолекуле.

В связи с вышесказанным большой интерес в качестве бактерицидов и полимеров-носителей лекарственных средств представляют сополимеры *N,N*-диаллил-*N,N*-диметиламмоний хлорида (АМАХ) с мономерами, содержащими различные функциональные группы. Данная работа посвящена синтезу и исследованию медико-биологических свойств сополимеров АМАХ с диоксидом серы (полисульфонилпирролидиний хлорид — ПСПХ), малеиновой кислотой (МК) и винилацетатом (ВА).

Экспериментальная химическая часть

АМАХ получали из диметиламина и аллилхлорида по известной методике [3]. Чистоту АМАХ контролировали элементным анализом, по содержанию двойных связей и методом ¹³С ЯМР. МК квалификации ч.д.а. очищали перекристаллизацией из ацетона, сушили в вакууме до постоянной массы. ВА квалификации х.ч. очищали от стабилизатора четырехкратной промывкой 7 % водным раствором NaOH, далее промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции, сушили над прокаленным хлористым кальцием и дважды перегоняли. Для сополимеризации использовали фракцию с температурой кипения 73 °С. Диоксид серы сушили пропуская через концентриро-

ванную серную кислоту и свежeproкаленный хлористый кальций.

Мономеры, инициаторы — динитрил азобисизомасляной кислоты и персульфат калия, а также растворители, используемые в работе, после очистки общепринятыми методами [4, 5] по своим характеристикам соответствовали литературным данным.

Сополимеризацию АМАХ с диоксидом серы, МК и ВА проводили по известным методикам [6 – 8]. Чистоту полученных сополимеров контролировали методом ЯМР-спектроскопии (табл. 1).

Полисульфонилпирролидиний гидроксид (ПСПГ) получали из ПСПХ методом ионной хроматографии на сильно основном анионите АВ-17-8 по методу, описанному в работе [9]. ¹³С ЯМР-спектр ПСПГ приведен в табл. 1.

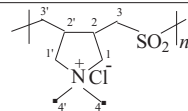
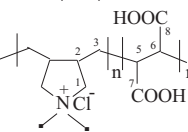
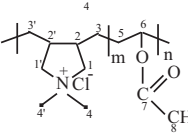
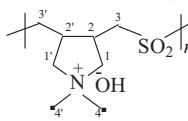
ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре фирмы “Bruker AM-300” с рабочей частотой 75,5 МГц с широкополосным подавлением по протонам и в режиме JMOD. Растворитель — D₂O, внутренний стандарт — 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфокислота.

Экспериментальная биологическая часть

Параметры острой токсичности образцов сополимеров определяли на белых беспородных мышах и крысах обоего пола массой 18 – 22 г и 150 – 200 г соответственно при пероральном однократном введении соединения в виде водных растворов по методам Литчфилда — Уилкоксона [10] и Прозоровского [11]. Каждую дозу исследовали на 6 животных.

Противомикробную активность сополимеров определяли методом “диффузии в агар” и двукратных серийных разведений в питательном бульоне. Предварительно готовили раствор, содержащий 100 мг в 1 мл мясоептонного бульона, с последующим разведением до рабочей концентрации соединения 12,5 мг/мл. В ряд пробирок с последовательными двукратноубы-

Спектры ЯМР ^{13}C сополимеров

Соединение	Стере- изомер	Значения хим. сдвигов и мультиплетность сигналов атомов (δ , м.д.)							
		C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈
	цис- транс-	70,48 т	34,25 д	53,88 т	54,79 56,35 к				
	цис- транс-	71,74 72,31 т	38,91 40,08 д	28,09 32,43 т	53,65 55,54 к	48,36 49,25 д	48,36 49,25 д	177,20 с	177,20 с
	цис- транс-	71,58 72,30 т	40,13 44,94 д	28,05 33,99 т	55,49 56,12 к	32,26 т	74,64 д	172,63 с	21,33 к
	цис- транс-	70,91 т	34,09 д	53,16 т	56,37 54,79 к				

вающими концентрациями соединения (АМАХ с SO_2 , МК и ВА) в бульоне вносили тестовые культуры микроорганизмов, в качестве которых использовали клинические штаммы: *E.coli*, *B.anthracooides*, *St.aureus*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiellae spp.*, *Ps.aeruginosa*, *Shigellae spp.*, *Vibrion*, *S.marcesncens*. Микробная нагрузка составляла $2,0 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Посевы инкубировали при 37°C в течение 72 ч и при 25°C — 48 ч. О противомикробной активности сополимеров судили по отсутствию роста культур через 1, 2, 3 и 5 сут. Для определения бактериостатической активности осуществляли дополнительный высев с жидких питательных сред, в которых визуальное рост бактерий не регистрировался, на мясопептонный агар и в пробирки с мясопептонным бульоном. Дополнительно посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 3 сут с учетом результатов через 24, 48 и 72 ч.

Антифунгальную активность изучали в 3 сериях экспериментов. В качестве объектов использовали штаммы условно-патогенных дрожжеподобных и

плесневых грибов. Грибы высевали на плотные и жидкие среды Сабуро, содержащие водный раствор сополимера в различных концентрациях. Результаты проверки учитывали на 2 – 12 сут культивирования в термостате при 28°C по отсутствию или задержке роста грибов в сравнении с контрольными посевами (среды без препаратов).

Результаты и их обсуждение

Исследование острой токсичности сополимеров АМАХ с МК показало, что при введении препарата в желудок мыши до 5000 мг/кг не было обнаружено каких-либо признаков интоксикации. Дальнейшее увеличение дозы не проводилось ввиду явной нетоксичности соединения. При введении сополимера АМАХ с ВА, начиная с дозы 3000 мг/кг, у животных отмечены явления интоксикации, LD_{50} составляет 4850 (4188 – 5616) мг/кг.

Исследование токсичности ПСПХ показало, что при введении препарата в желудок мыши LD_{50} составляет 6200 мг/кг (крыс — 17000 мг/кг). При длительном введении сополимера в желудок крыс в дозе 850 мг/кг в течение 1 мес детоксицирующая активность печени не угнетается, функция почек не изменяется. Весовые коэффициенты внутренних органов, масса тела, гематологические показатели периферической крови у животных, получивших препарат, были аналогичны показателям контрольной группы животных.

При исследовании противомикробной активности установлено, что сополимеры АМАХ с МК и АМАХ с ВА обладают антибактериальным действием в отношении всех указанных в экспериментальной части микроорганизмов. Минимально подавляющая концентрация сополимеров АМАХ с МК составляет 1,2 – 1,5 мг/мл, АМАХ с ВА — ~ 100 мг/мл.

Таблица 2
Антифунгальная активность ПСПХ и ПСПГ в отношении разных видов грибов

Грибы	Штаммы	Концентрация, вызывающая полное угнетение роста грибов, мг/мл	
		ПСПХ	ПСПГ
Условно-патогенные	<i>Candida albicans</i>	10	8
	<i>Penicillium spp.</i>	10	4
	<i>Aspergillus niger</i>	10	8
Патогенные	<i>Phialophora verrucosa</i>	15	9
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	4	10
	<i>Trichophyton quinacnum</i>	4	8
	<i>Trichophyton rubrum</i>	20	10
	<i>Microsporium canis</i>	5	10

ПСПХ испытывался в Омском ветеринарном институте при лечении телят с острыми бактериальными энтеритами. ПСПХ в виде 20 % водного раствора в дозе 5 – 10 мл 2 раза в день выпаивался с молоком в течение 4 дней при совмещении со временем кормления. Дальнейшее его применение является нецелесообразным, т.к. выздоровление наступает после 2 – 3-кратного применения в дозе, не превышающей 10 мл. Гибели животных и нарушения функций организма не происходило.

Местного раздражающего действия препарата на слизистую оболочку желудка не наблюдалось. При рубое выздоровевших телят после применения препарата слизистые оболочки сычуга и тонкого кишечника были бледно-розового цвета. При лечении отмечается восстановление болевой чувствительности, усиливаются пищевые и двигательные рефлексы. Отрицательного воздействия на центральную нервную и сердечно-сосудистую системы не обнаружено. Напротив, улучшалась частота пульса, его наполнение, тоны сердца становились более ритмичными и ясными. Препарат не обладает гемолитическим действием, не оказывает побочного влияния на кровь и её функции. Уровень гемоглобина, количество эритроцитов и лейкоцитов в процессе лечения имеют тенденцию к нормализации.

ПСПХ и ПСПГ обладают выраженными антифунгальными свойствами — при концентрации 4 – 15 мг/мл происходит полная задержка развития условно-патогенных (дрожжеподобных, плесневых) и патогенных грибов (табл. 2).

Получение частично сшитых, набухающих в воде сополимеров на основе АМАХ, обладающих противомикробной активностью, позволит расширить воз-

можности их применения в медицине при лечении раневых и ожоговых поверхностей, а также в биотехнологии.

Таким образом, сополимеры АМАХ с SO₂, МК и ВА являются нетоксичными соединениями (IV класс опасности), обладают выраженной бактерицидной и антифунгальной активностью и являются перспективными в производстве лекарственных препаратов и биотехнологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы по госконтракту № 02.740.11.0648.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Ф. Панарин, Г. Е. Афиногенов, *Ж. всеюзн. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева*, **30**(4), 378 – 386 (1985).
2. М. Н. Горбунова, А. И. Воробьева, Г. А. Александрова, И. Н. Кирьянова, *Хим.-фарм. журн.*, **43**(12), 13 – 16 (2009).
3. S. Narada and K. Arai, *Makromol. Chem.*, **107**, 64 – 77 (1967).
4. А. М. Торопцева, К. Б. Белгородская, В. М. Бондаренко, *Лабораторный практикум по химии и технологии высокомолекулярных соединений*, Химия, Ленинград (1972).
5. А. Гордон, Р. Форд, *Спутник химика*, Мир, Москва (1976).
6. А. И. Воробьева, Е. В. Васильева, Х. А. Гайсина и др., *Высокомолек. соедин.*, **38**(10), 1663 – 1667 (1996).
7. А. И. Воробьева, Д. Р. Сагитова, С. В. Колесов, Ю. Б. Монаков, *Ж. приклад. химии*, **82**(6), 989 – 994 (2009).
8. А. И. Воробьева, Д. Р. Сагитова, С. В. Колесов, Ю. Б. Монаков, *Ж. приклад. химии*, **82**(8), 1361 – 1367 (2009).
9. А. И. Воробьева, Д. Р. Сагитова, С. В. Колесов и др., *Ж. приклад. химии*, **81**(2), (2008).
10. М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Медгиз, Ленинград (1963).
11. В. Б. Прозоровский, М. П. Прозоровская, В. М. Демченко, *Фармакол. и токсикол.*, № 4, 497 – 502 (1978).

Поступила 25.07.11

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF COPOLYMERS BASED ON *N,N*-DIALLYL-*N,N*-DIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

A. I. Vorob'eva^{1*}, G. R. Sultanova², A. K. Bulgakov², V. I. Zainchkovskii³, and S. V. Kolesov¹

¹ Institute of Organic Chemistry, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, Russia

² Bashkir State Medical University, Ufa, Bashkortostan, Russia;

³ Omsk State Agricultural University, Omsk, Russia

* e-mail: vorobjeva@anrb.ru;

Copolymers of *N,N*-diallyl-*N,N*-dimethylammonium chloride with sulfur dioxide, maleic acid, and vinyl acetate have been synthesized by radical polymerization and their biological properties have been studied. It is established the obtained copolymers belong to class IV low-toxicity substances and exhibit pronounced antimicrobial activity with respect to some bacterial and fungal species.

Key words: *N,N*-Diallyl-*N,N*-dimethylammonium chloride; sulfur dioxide; maleic acid; vinyl acetate; copolymers; antimicrobial activity