

На правах рукописи

БАКАРАЕВА МАЛИКА МОВСАРОВНА

**ДЕЙСТВИЕ ПОЛИАЗОЛИДИНАММОНИЯ, МОДИФИЦИРОВАННОГО
ГИДРАТ-ИОНАМИ ЙОДА, НА УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ
МИКРООРГАНИЗМЫ И ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК**

03.02.03 – микробиология

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.» на кафедре «Экология»

Научный руководитель: **Нечаева Ольга Викторовна**, кандидат биологических наук

Научный консультант: **Тихомирова Елена Ивановна**, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Маннапова Рамзия Тимергалеевна**, доктор биол. наук, профессор
ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева», профессор кафедры микробиологии и иммунологии

Щербаков Анатолий Анисимович, доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова», профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск

Защита диссертации состоится «25» декабря 2015 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский район, пос. Оболенск.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, www.obolensk.org

Автореферат диссертации разослан «___»_____2015 г.

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский район, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ, Диссертационный совет.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Проблема возникновения и распространения антибиотикорезистентных штаммов условно-патогенных микроорганизмов в настоящее время приобретает глобальный характер (Сидоренко, 2002; Данилевская, Пименов, 2005; Соловьева, 2006; Забровская и др., 2011; Aubry-Damon et al., 2004; Collignon, 2009; Hopkins et al., 2010). Широкое применение антисептиков и дезинфектантов в лечебных и ветеринарных учреждениях, профильных лабораториях биотехнологических и пищевых производств, а также в повседневной жизни граждан обеспечивает выраженное селективное действие на популяции микроорганизмов и способствует отбору резистентных штаммов. Бактерии с множественной лекарственной устойчивостью выделяются из воды практически всех рек Европы (Flemming et al., 2000; Beaudreau et al., 2001; Gunten, 2003). В работах ряда авторов приводятся сведения о выделении таких микроорганизмов из рек Российской Федерации, из объектов санитарно-ветеринарного надзора и окружающей среды (Менча, 2006; Шорникова, Куяров, 2007; Савилов и др., 2008; Drucker, Panasyuk, 2006).

Еще одним адаптивным механизмом, повышающим устойчивость микроорганизмов к действию неблагоприятных факторов (в том числе химических агентов), является их способность к формированию на различных поверхностях биопленок, которые представляют собой совокупность активно метаболизирующих и покоящихся форм клеток, заключенных в экзополимерный матрикс (Ермолов, 1998; Ильина и др., 2004; Афиногенова и др., 2011; Маянский и др., 2011; Романова и др., 2011; Costerton et al., 2003; Hall-Stoodley et al., 2009).

С целью преодоления формирования микробных биопленок разрабатываются новые методы, направленные на дезорганизацию биопленки и уничтожение клеток-персистеров. К значительному изменению архитектуры микробной биопленки и уменьшению количества экзополисахаридов в матриксе приводит использование кларитромицина (Yasuda, 1993, 1994; Wozniak, 2004). Модификация антимикробных препаратов, а также использование новых способов доставки, например, в составе липосом, позволяет обеспечить более эффективное проникновение препаратов в микробную биопленку (Smith, 2008).

Одной из перспективных групп препаратов, характеризующихся антимикробной активностью, являются полимерные соединения. Их использование позволяет повысить локальную концентрацию и устойчивость действующего вещества к ферментам микроорганизмов, а также снизить токсичность и увеличить длительность действия (Nonaka et al., 1997; Tashiro et al., 2001; Jeong et al., 2002; Lee et al., 2002). В настоящее время создаются экспериментальные препараты, представляющие собой модифицированные полимерные соединения – аналоги современных антибиотиков, что позволяет преодолеть возникшую к ним устойчивость микроорганизмов (Дьякова и др., 2012; Серебренникова и др., 2013; Панарин и др., 2014; Monfardini et al., 1998; Shtilman, 2009).

Одним из наиболее эффективных полимерных соединений, характеризующихся антимикробной активностью, является полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (Заярский и др., 2012, 2013). Биологическая активность и экотоксикологическая характеристика данного полимера представлена в работах (Нечаева и др., 2014-2015; Tikhomirova et al., 2014; Веденеева, 2015).

Степень разработанности проблемы

Исследованиями ряда авторов показана перспективность использования различных полимерных соединений в качестве антимикробных средств с целью преодоления развития антибиотикорезистентности микроорганизмов (Падейская, 2006; Воинцева и др., 2009; Еропкин и др., 2009; Соловский и др., 2010; Смирнова и др., 2011; Дьякова и др., 2012; Серебренникова и др., 2013; Панарин и др., 2014; Полимерные кетиминовые

производные ..., 2014; Monfardini et al., 1998; Shtilman, 2009; Smirnova et al., 2011). Особенности формирования микробных биопленок, их устойчивости и роли в возникновении осложнений при лечении инфекционных заболеваний представлены в работах (Бехало и др., 2010; Романова и др., 2011; Лямин и др., 2012; Чеботарь и др., 2012; Vergara-Irigaray et al., 2008; Vu B. et al., 2009; Wolcott R. et al., 2013).

В работах ряда авторов представлены основные направления борьбы с микробными биопленками (Тец, 2006; Честнова и др., 2009; Иванова и др., 2010; Dong et al., 2000; Conlon, 2002; Ehrlich, 2003; Wozniak, 2004; Smith, 2005; Moen et al., 2009).

Однако для разработки и внедрения в практику препаратов с антимикробной активностью в отношении планктонных и биопленочных форм условно-патогенных микроорганизмов необходимо детальное изучение их свойств в зависимости от физико-химических характеристик. При этом важно также решение актуальных задач в области биотехнологии, связанных с разработкой способов применения этих препаратов на клеточном, тканевом и организменных уровнях, оценкой безопасности их использования в качестве медицинских и ветеринарных биопрепаратов.

Цели и задачи

Цель исследования – изучение антимикробной активности нового полимерного соединения – полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в зависимости от его физико-химических характеристик в отношении референс-штаммов и изолятов условно-патогенных и фитопатогенных микроорганизмов и его влияния на процесс образования биопленок.

Задачи исследования:

1. Изучить антимикробную активность в отношении референс-штаммов условно-патогенных и фитопатогенных бактерий полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в зависимости от длины его полимерной цепи и концентрации гидрат-ионов йода.

2. Определить действие полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, на микроскопические грибы и их адгезивные свойства.

3. Проанализировать этапы формирования микробных биопленок монокультурами клинических штаммов условно-патогенных бактерий и микроскопических грибов, а также их ассоциаций.

4. Изучить влияние полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, на процесс формирования микробных биопленок монокультурами бактерий и микроскопических грибов и их ассоциациями в условиях *in vitro*.

5. Обосновать перспективы использования препарата на основе полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, как антисептического и дезинфицирующего средства в медико-биологической и ветеринарной практике.

Научная новизна

Впервые установлена зависимость антимикробной активности полимерного соединения – полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в отношении стандартных штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий и микроскопических грибов от длины полимерной цепи и концентрации гидрат-ионов йода: *Escherichia coli* 113-13 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 проявили чувствительность к варианту полимера с длиной полимерной цепи >100 и 100-200 кДа, а *Staphylococcus aureus* 209 P – 200-350 и 400-500 кДа.

Показано влияние полимера на снижение адгезивной активности стандартных и клинических штаммов микроскопических грибов *Candida albicans*. Изучена динамика формирования микробных биопленок на модели клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий и микроскопических грибов, а также их ассоциаций, *in vitro*. Впервые показано нарушение процесса формирования микробных биопленок клиническими штаммами условно-патогенных микроорганизмов под действием полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода. Установлен

широкий спектр антимикробного действия данного полимера в отношении условно-патогенных и фитопатогенных микроорганизмов, его высокая эффективность в качестве антисептика и компонента регенеративного препарата при лечении полнослойных гнойных ран у экспериментальных животных, а также дезинфицирующая способность при обработке поверхностей оборудования пищевых производств.

Теоретическая и практическая значимость работы

Обобщены и систематизированы данные о биологической активности полимерного соединения – полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, и ее зависимости от физико-химических характеристик. Результаты проведенных исследований являются основанием для выбора наиболее оптимальных комбинаций физико-химических характеристик полимера для повышения антимикробной эффективности и расширения спектра действия.

Полученные результаты открывают перспективы использования полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в качестве активного компонента антисептических препаратов широкого спектра действия с антибиопленочной активностью в медико-биологической и ветеринарной практике.

Методология и методы исследования

Методология настоящей работы соответствовала поставленным целям и задачам. Предметом исследования стало изучение антимикробной активности полимерного соединения – полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода и их зависимости от физико-химических характеристик в отношении условно-патогенных микроорганизмов и их биопленочных форм.

При изложении материала и проведении исследования автором были применены общенаучные методы: анализ литературных данных, эмпирические методы исследования (эксперимент, измерение, оценка и описание). Применение перечисленных методов, а также детальный статический анализ полученных значений позволил обеспечить объективность и достоверность результатов и выводов.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования явились стандартные и клинические штаммы грамположительных и грамотрицательных условно-патогенных и фитопатогенных бактерий, микроскопические грибы, характеристика которых представлена в таблицах 1-4.

Таблица 1 - Характеристика стандартных штаммов микроорганизмов

Штамм	Источник получения
<i>Escherichia coli</i> 113-13	ГИСК им. Л.А. Тарасевича, г. Москва
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ГИСК им. Л.А. Тарасевича, г. Москва
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	Музей кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им. В.И. Разумовского
<i>Candida albicans</i> 13108	Музей кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им. В.И. Разумовского
<i>Phoma fungicola</i>	Коллекция кафедры микробиологии и физиологии растений СГУ им. Н.Г. Чернышевского
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Коллекция кафедры микробиологии и физиологии растений СГУ им. Н.Г. Чернышевского
<i>Fusarium tricinctum</i>	Коллекция кафедры микробиологии и физиологии растений СГУ им. Н.Г. Чернышевского
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Коллекция ризосферных бактерий ИБФРМ РАН
<i>Rhizobium radiobacter</i>	Коллекция ризосферных бактерий ИБФРМ РАН
<i>Xantomonas campestris</i>	Коллекция ризосферных бактерий ИБФРМ РАН

Таблица 2 - Характеристика клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*

№ штамма	Дата выделения	Место получения
№№ 1 – 4	2012	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2
№№ 5 - 12	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2

Таблица 3 - Характеристика клинических штаммов *Staphylococcus aureus*

№ штамма	Дата выделения	Место получения	Характеристика штамма
№№ 1 – 4	2012	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	MSSA
№ 5	2012	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	MRSA
№ 6	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	MRSA
№№ 7 -10	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	MSSA
№№ 11-12	2014	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	MSSA

Примечание: MSSA – метицилинчувствительный; MRSA – метицилинрезистентный.

Таблица 4 - Характеристика клинических штаммов *Candida albicans*

№ штамма	Дата выделения	Место получения	Характеристика штамма
№ 1	2014	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	am ^s flu ^s
№ 2	2014	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2	am ^r flu ^r
№ 3	2014	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2	am ^s flu ^s
№ 4	2014	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2	am ^r flu ^r
№№ 5 – 7	2014	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2	am ^s flu ^s
№ 8	2014	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2	am ^r flu ^r
№ 9	2014	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2	am ^s flu ^s
№ 10	2014	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2	am ^r flu ^r

Примечание: «am^sflu^s» – штамм, чувствительный к амфотерицину В и флуконазолу, «am^rflu^r» – штамм, устойчивый к амфотерицину В и флуконазолу

В работе использовали полимерное соединение – полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат ионами йода (ПААГ-М), его модифицированные аналоги, а также его комплексы с растительными биофлавоноидами, которые для исследования были предоставлены научно производственным объединением «Альтернатива».

ПААГ-М представляет собой биосовместимый полимер, относящийся к IV классу токсичности. Работу проводили с различными вариантами ПААГ-М, отличающиеся

физико-химическими свойствами: длиной полимерной цепи (>100, 100-200, 200-350 и 400-500 кДа) и содержанием гидрат-ионов йода (табл. 5).

Биологическую активность исследуемых соединений изучали с использованием метода серийных разведений (МУК 4.2.1890-04.) с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) каждого варианта препарата в мкг/мл – для бактерий и мг/мл – для грибов. Разведение образцов различных вариантов полимера готовили в стерильной дистиллированной воде до получения рабочей 2 %, а затем получали ряд двойных разведений в мясопептонном бульоне (МПБ).

Таблица 5 – Модификации полимера ПААГ-М с различным содержанием гидрат-ионов йода

Лабораторный шифр варианта полимера	Содержание гидрат-ионов йода, мкг/мл
ПААГ-М ₆	6
ПААГ-М _{12,5}	12,5
ПААГ-М ₂₅	25
ПААГ-М ₅₀	50
ПААГ-М _{0,25}	250
ПААГ-М _{0,5}	500
ПААГ-М ₁	1000
ПААГ-М _{1,5}	1500

Для количественного учета интенсивности пленкообразования проводили моделирование процесса в ячейках плоскодонных стерильных полистирольных 96-ти луночных планшетов по стандартной методике (Тец и др., 2004).

Адгезивную способность бактериальных клеток определяли при помощи методов В.И. Брилис и соавт. (1986) и С.С. Гизатулиной и соавт. (1991). Опытные образцы предварительно инкубировали с добавлением сублетальных концентраций ПААГ-М в течение 6 часов.

Экспериментальные гнойные раны животным моделировали по методике П.И. Толстых (1976). В экспериментах использовали 40 белых беспородных крыс (самок), массой 200±20 г, которые содержались на стандартном рационе вивария. Все эксперименты выполнены в соответствии с требованиями Федерального закона от 01.01.1997 г. «О защите животных от жестокого обращения» и предписаниями Женевской конвенции «International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990). Для оценки эффективности лечения с использованием препарата на основе ПААГ-М рассчитывали ежесуточное уменьшение площади ран в % (Кузин, Костюченков, 1990). Состояние экспериментальных животных оценивали по основным биохимическим показателям крови: содержанию глюкозы, общего белка, альбумина, мочевины, креатинина, мочевой кислоты, холестерина, аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, креатинкиназы, лактатдегидрогеназы, кислой и щелочной фосфатазы, определяемых по стандартным методикам (Гавриш, 2003; Краснов и др., 2005; Волков и др., 2006; Волкова, 2006; Орехов, 2008).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0 (for Windows; «Stat Soft Inc.», США), Statgraph (Version 2.6; Coulter), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP). Статистические результаты считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Внедрение в практику

Зарегистрирована заявка на патент «Антисептическое средство» (2015 103 595 от 03.02.15 г.).

Материалы диссертации используются в учебном процессе (лекции и практические занятия) кафедры экологии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.», кафедры микробиологии и физиологии растений

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского», ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского»; в работе отдела функциональных и клинико-экспериментальных исследований ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Антимикробная активность полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, зависит от физико-химических характеристик препарата: варианты полимера с молекулярной массой >100 и 100-200 кДа более эффективны в отношении грамотрицательных бактерий, а варианты полимера с молекулярной массой 200-350 и 400-500 кДа – в отношении грамположительных бактерий. Эффективность антимикробного действия полимера зависит от концентрации гидрат-ионов йода. Действие полимера на условно-патогенные и фитопатогенные бактерии и грибы носит дозозависимый характер.

2. 0,5 %-ный раствор полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, снижает адгезивную активность микроскопических грибов.

3. Предварительная обработка лунок полистирольного планшета и образцов уретрального катетера 0,5 %-ным раствором полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, приводит к нарушению процесса формирования *in vitro* микробных биопленок условно-патогенными микроорганизмами.

4. Препарат, содержащий наноагрегаты флавоноидов, стабилизированные полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода, характеризуется ранозаживляющим и антимикробным действием, что привело к сокращению сроков заживления экспериментальных гнойных ран в 2,2 раза по сравнению с контролем.

5. Широкий спектр антимикробного действия полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, обуславливает его использование в качестве дезинфицирующего средства для обработки поверхностей, контаминированных условно-патогенными микроорганизмами.

Личный вклад автора

Анализ литературы по теме диссертации, определение цели и задачи, планирование исследования, проведение исследования работы, выбор методов исследования, статистический анализ результатов и написание диссертации выполнены лично автором.

Степень достоверности и апробация работы

Высокая степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждается использованием общепринятых и современных биологических, микробиологических, биохимических методов исследований и обработки информации. Все исследования проведены с применением аттестованных методик и поверенного оборудования на базе научной биологической лаборатории кафедры экологии СГТУ имени Гагарина Ю.А., микробиологической лаборатории кафедры микробиологии с вирусологией и иммунологией СГМУ им. В.И. Разумовского и биохимической лаборатории ФГНУ «Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт» ФОНО.

Материалы диссертации были представлены и обсуждены на следующих научных конференциях и форумах: I Кавказском Международном Экологическом форуме (Грозный, 2013); Всероссийской молодежной научной конференции «Актуальные проблемы разработки и применения новых материалов и технологий» (Саратов, 2013); III Всероссийской заочной научной конференции для молодых ученых «Актуальные вопросы биомедицинской инженерии» (Саратов, 2013); Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве» (Саратов, 2013); XXVII Международной научной конференции «Математические методы в технике и технологиях – ММТТ-27» (Саратов, 2014); VI и VII Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Экологические проблемы промышленных городов» (Саратов, 2013, 2015); Международных симпозиумах «Ökologische, technologische und rechtliche aspekte der lebensversorgung» в рамках конгрессов «EURO ECO» (Ганновер,

Германия, 2013, 2014); «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues» BIONANOTOX 2014 (Греция, 2014); Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы» (Саратов, 2014); IV Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014); Российско-Китайской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии «XVIII Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2015).

Публикации

Основное содержание диссертационной работы отражено в 27 публикациях, из которых 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных перечнем ВАК РФ, 22 публикации в сборниках, трудах и материалах Всероссийских и международных научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов, глав экспериментальных исследований, заключения и выводов, а также списка использованной литературы из 231 наименования.

Работа выполнена в рамках персонального гранта Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «У.М.Н.И.К» (2014–2015) на выполнение НИР «Создание инновационного антисептического препарата широкого спектра действия на основе наноструктурированного биосовместимого полимерного соединения».

Результаты исследования

Зависимость проявлений биологической активности полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, от его физико-химических характеристик

Была изучена антимикробная активность ПААГ-М в зависимости от длины полимерной цепи. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

Было установлено, что стандартные штаммы грамотрицательных бактерий проявили высокую чувствительность к варианту полимера с наименьшей молекулярной массой. Так для *E. coli* 113-13 значения МПК ПААГ-М₆ с длиной полимерной цепи >100 кДа составили 16 мкг/мл, а с длиной полимерной цепи 100-200 кДа – 32 мкг/мл. Для *P. aeruginosa* ATCC 27853 значения МПК данных вариантов полимера составили 32 мкг/мл в обоих случаях. Увеличение молекулярной массы полимера приводило к снижению его антимикробной активности в отношении грамотрицательных бактерий. Стандартный штамм *S. aureus* 209 P проявил большую чувствительность к варианту полимера с молекулярной массой 200-350 и 400-500 кДа, значения МПК для которых составили 16 и 32 мкг/мл соответственно.

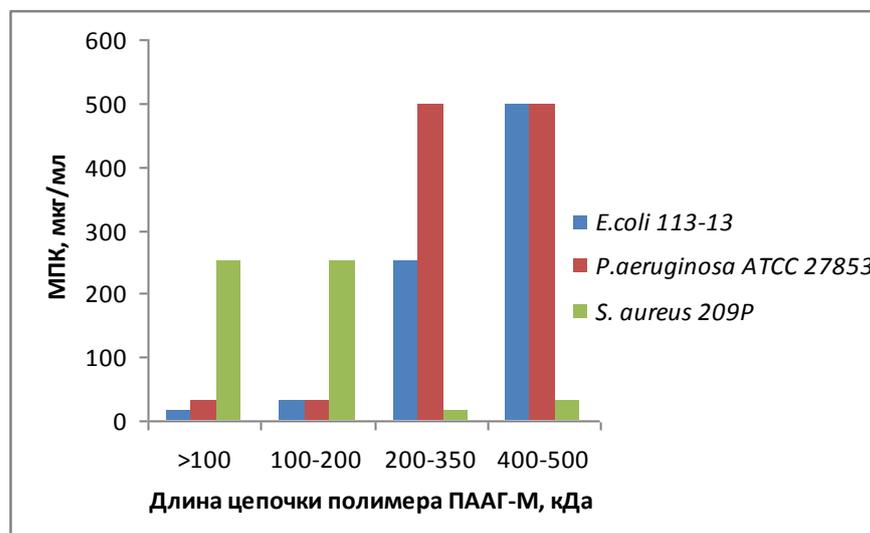


Рисунок 1 – Зависимость биологической активности ПААГ-М от длины полимерной цепи

Большая эффективность вариантов полимера с низкой молекулярной массой в отношении грамотрицательных бактерий связана с особенностями строения их клеточной стенки. Единственным местом проникновения в клетку различных веществ являются пориновые каналы, представляющие собой систему интегральных белков, через которые способны проходить химические соединения только с определенной молекулярной массой и пространственной организацией.

Для грамположительных бактерий важнейшим условием взаимодействия соединений с микробной клеткой является способность функционально-активных групп к межмолекулярной ассоциации с компонентами клеточной стенки. В составе исследуемых вариантов ПААГ-М основным действующим компонентом являются гидрат-иона йода.

Сильное дестабилизирующее действие на мембраны клеток оказывают низкомолекулярные катионные поверхностно-активные вещества (ПАВ), к которым относятся варианты ПААГ-М с молекулярной массой >100 и 100-200 кДа.

Увеличение концентрации гидрат-ионаов йода в составе полимера приводило к повышению эффективности антимикробного действия всех вариантов ПААГ-М, что выражалось в снижении показателей МПК (рис. 2). Однако общая тенденция избирательного характера действия на грамположительные и грамотрицательные бактерии в зависимости от величины молекулярной массы сохранялась для всех вариантов полимера.

Наименьшая эффективность полимерного соединения ПААГ-М была отмечена в отношении стандартного штамма микроскопических грибов *C. albicans* 13108. В ходе проведенного исследования нам не удалось установить зависимость противогрибковой активности ПААГ-М от длины полимерной цепи: варианты полимера ПААГ-М₆ и ПААГ-М_{12,5} не обладали противогрибковой активностью даже при использовании самых высоких рабочих концентраций препаратов.

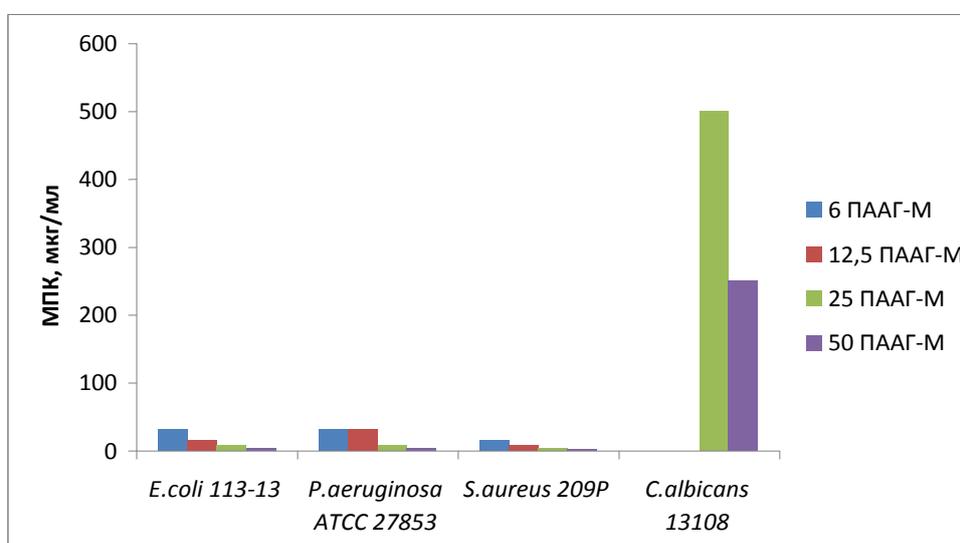


Рисунок 2 – Зависимость антимикробной активности ПААГ-М от концентрации гидрат ионов йода

Однако установлено, что противогрибковая активность ПААГ-М зависела от концентрации гидрат-ионов йода в составе препарата: ПААГ-М₆ и ПААГ-М_{12,5} не проявили антимикробной активностью в отношении *C. albicans* 13108, повышение концентрации гидрат ионов йода до 25 и 50 мкг/мл в составе препаратов ПААГ-М₂₅ и ПААГ-М₅₀ приводило к появлению противогрибковой активности исследуемых препаратов, хотя значения МПК были достаточно высокими и составили 500 и 250 мкг/мл соответственно.

Таким образом, полученные результаты позволяют осуществлять выбор наиболее эффективных препаратов, характеризующихся антимикробной активностью, с заданными физико-химическими характеристиками, что обеспечит большую избирательность их действия.

Изучение биологической активности полимерного соединения в отношении клинических штаммов возбудителей оппортунистических микозов

Поскольку наименьшая чувствительность к ПААГ-М была отмечена в отношении клеток микроскопических грибов, представляло интерес подобрать оптимальный вариант полимера, характеризующегося противогрибковой активностью в отношении клинических штаммов *C. albicans*.

С целью повышения эффективности препарата, исходное полимерное соединение насыщали гидрат-ионами йода, после чего была определена их антимикробная активность. Установлено, что через сутки культивирования, независимо от отношения к противогрибковым препаратам, во всех опытных разведениях образцов полимера отсутствовал видимый рост исследуемых штаммов микроскопических грибов, в отличие от контрольных образцов. Полученные результаты представлены на рисунке 3.

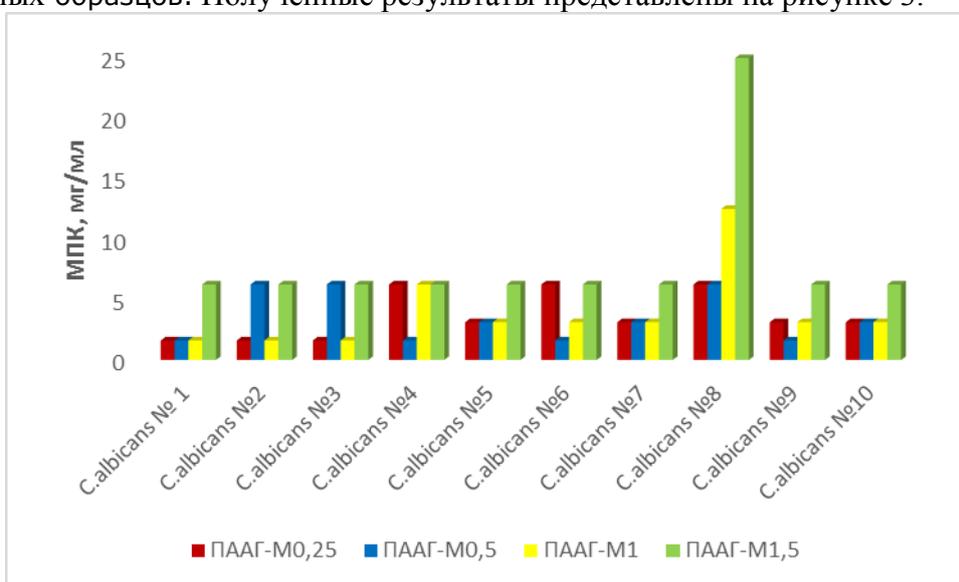


Рисунок 3 – Противогрибковая активность модификаций полимерного соединения в отношении клинических штаммов *C. albicans*

Через сутки культивирования значения МПК ПААГ-М_{0,25} для клинических изолятов *C. albicans* №№ 1,2,3 составляли 1,6 мг/мл, для №№ 5,7,9,10 – 3,1 мг/мл, №№ 4,6,8 – 6,2 мг/мл. Показатели МПК ПААГ-М_{0,5} для изолятов №№ 2 и 3 по сравнению с показателями для ПААГ-М_{0,25} были в 4 раза выше (6,2 мг/мл), а изоляты №№ 4 и 6, наоборот, проявили большую чувствительность к ПААГ-М_{0,5}. Для остальных клинических изолятов *C. albicans* значения МПК данных образцов были сопоставимы и не зависели от концентрации гидрат-ионов йода в составе полимера. МПК ПААГ-М₁ и ПААГ-М_{0,25} также практически не отличались между собой для всех изолятов. ПААГ-М_{1,5} по сравнению с остальными образцами согласно значениям МПК проявил меньшую активность в отношении подавляющего большинства штаммов. Следует отметить, что среди 4 устойчивых к амфотерицину и флуконазолу изолятов только один (№ 8) проявил низкую чувствительность к ПААГ-М (МПК ПААГ-М₁ – 12,4, ПААГ-М_{1,5} – 24,8 мг/мл). Согласно значениям МПК₅₀ для каждого из образцов полимера, которые составили соответственно для ПААГ-М_{0,25} – 2,2, ПААГ-М_{0,5} – 2,04, ПААГ-М₁ – 2,2 и ПААГ-М_{1,5} – 4,8 мг/мл, отмечено преобладание антимикотической активности первых трех образцов над ПААГ-М_{1,3} с максимальной концентрацией гидрат-ионов йода.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что вариант полимера с повышенным содержанием гидрат-ионов йода обладает противогрибковой активностью в отношении клинических штаммов *C. albicans*. Отсутствующая взаимосвязь между отношением к флуконазолу и амфотерицину и чувствительность к исследуемому полимеру доказывают различные механизмы их действия. Известно, что с S-H-группами белковых молекул взаимодействуют гидрат-ионы йода, в связи с этим можно предположить, что происходит инактивация этих групп данным полимерным соединением. Принимая во внимание, что в составе полимера присутствует йод, не исключено, что вследствие окисления основных компонентов, оказывается повреждающее действие на мембрану микроскопических грибов. По сравнению с другими образцами препарата, ПААГ-М с максимальным содержанием гидрат-ионов йода обладает меньшей активностью в отношении исследуемых клинических штаммов *C. albicans*, что может быть связано с экранирующим эффектом молекул полимера. Очевидно, что молекулы полимера при взаимодействии с клетками микроскопических грибов претерпевают конформационные изменения, частично ослабляя окислительную активность части гидрат-ионов йода. Эти предположения, безусловно, требуют дальнейшего изучения. Необходимо отметить, что полученные значения МПК различных образцов ПААГ-М достаточно высоки по сравнению с МПК противогрибковых препаратов для энтерального и парэнтерального применения. Однако эти значения не превышают концентрации рабочих растворов широко применяемых антисептиков и дезинфектантов. Благодаря отсутствию раздражающего эффекта, препараты ПААГ-М с содержанием гидрат-ионов йода 0,25, 0,5 и 1,0 мг/мл могут рассматриваться в качестве перспективных антисептических и дезинфицирующих средств с противогрибковой активностью.

Влияние полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, на адгезивные свойства *C. albicans*

Адгезия микроорганизмов является начальным этапом взаимодействия как с клетками макроорганизма, так и с инертными поверхностями изделий медицинского назначения, что обеспечивает начальные этапы формирования биопленок и способствует развитию катетерассоциированных инфекций. Поэтому представляло интерес оценить влияние сублетальных концентраций ПААГ-М на адгезивные свойства стандартного и клинических штаммов *C. albicans*. Было установлено, что исходно по показателям ИАМ стандартный штамм *C. albicans* 13108 характеризовался как среднеадгезивный, а все клинические штаммы – как высокоадгезивные (рис. 4).

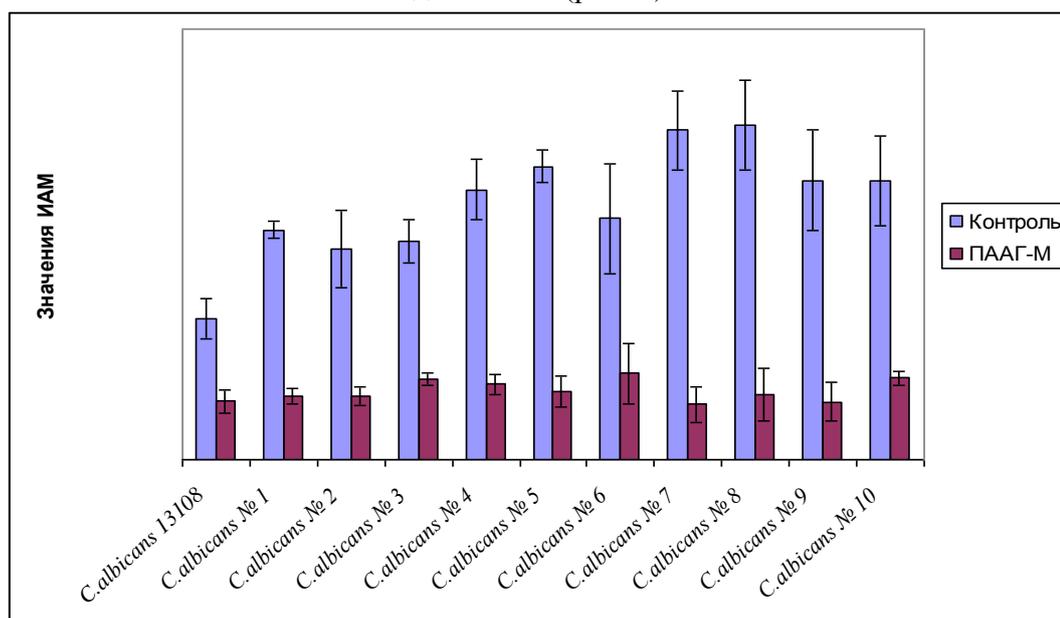


Рисунок 4 – Показатели адгезивной активности микроорганизмов при действии ПААГ-М

Обработка клеток ПААГ-М приводила к снижению адгезивных свойств стандартного и клинических штаммов *S. albicans* до неадгезивного уровня. Вероятно, это связано с влиянием ПААГ-М на клеточную стенку микроскопических грибов и блокировкой гликопротеиновых фибрилл, обеспечивающих процесс неспецифической адгезии.

Динамика формирования *in vitro* микробных биопленок стандартными и клиническими штаммами условно-патогенных микроорганизмов

Поскольку возникновение осложнений и хронизацию инфекционного процесса связывают с формированием микробных биопленок, представляло интерес изучить динамику пленкообразования стандартными и клиническими штаммами условно-патогенных микроорганизмов при моделировании данного процесса *in vitro*.

При культивировании микробных биопленок, образуемых стандартным штаммом *S. aureus* 209 P в лунках иммунологического планшета, содержащих МПБ, на 1-е сутки происходило увеличение связывания красителя в 3,65 раза по сравнению с контролем ($p < 0,01$) (рис. 5). На 2-е и 3-и сутки культивирования биопленок достоверных различий в интенсивности связывания красителя микробной биопленкой выявлено не было ($p > 0,05$).

При культивировании микробных биопленок клинических изолятов *S. aureus* на 1-е сутки регистрировали увеличение накопления кристаллического фиолетового в 6,16 раз по сравнению с контролем ($p < 0,001$), на 2-е сутки – в 1,95 раза по сравнению с 1-ми сутками ($p < 0,001$), на 3-и сутки – в 2,61 раза по сравнению с 2-ми сутками ($p < 0,001$).

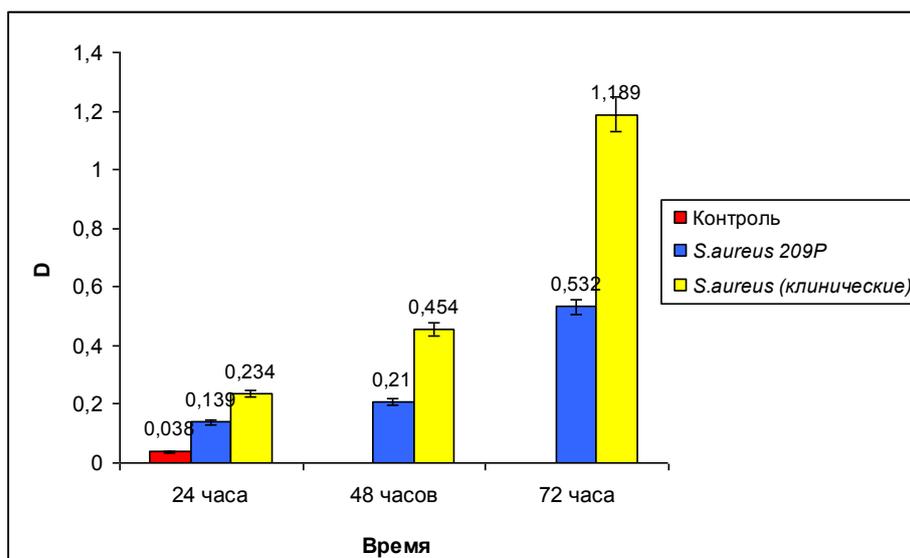


Рисунок 5 – Динамика величин связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками, образованными стандартным и клиническими штаммами *S. aureus* (n=12)

При культивировании биопленок стандартного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 в лунках планшета через 24 часа происходило увеличение накопления кристаллического фиолетового биопленкой микроорганизмов в 8,9 раз по сравнению с контролем ($p < 0,001$) (рис. 6). Через 48 часов культивирования достоверных изменений в связывании красителя по сравнению с предыдущими сутками выявлено не было ($p > 0,05$). Через 72 часа культивирования биопленок происходило резкое увеличение накопления красителя в 15 раз по сравнению со 2-ми сутками ($p < 0,001$).

При культивировании биопленок клинических штаммов *P. aeruginosa* в первые 24 часа наблюдалось накопления кристаллического фиолетового в 9,6 раз по сравнению с контролем ($p < 0,001$), через 48 часов – изменения в накоплении красителя были незначительными, а через 72 часа наблюдалось возрастание интенсивности накопления кристаллического фиолетового в 2,3 раза по сравнению с предыдущими сутками ($p < 0,001$).

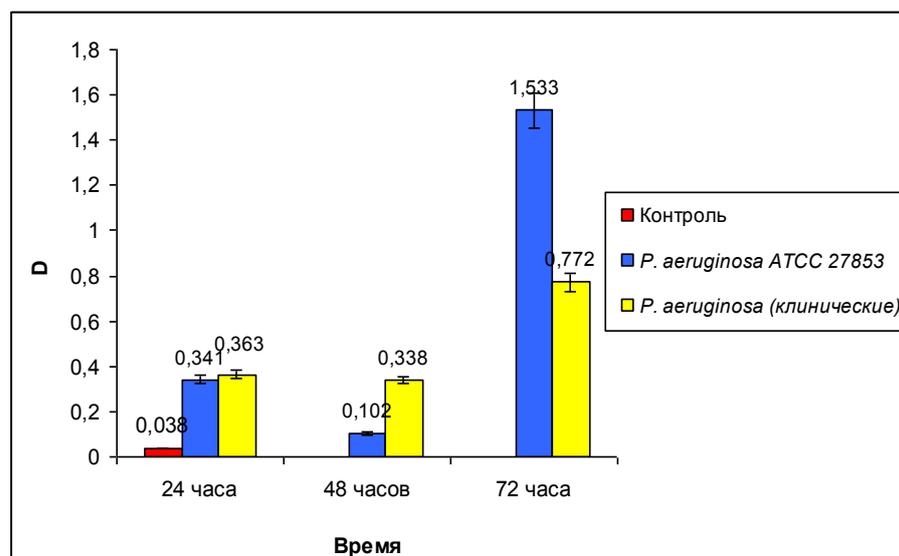


Рисунок 6 – Динамика величин связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками, образованными стандартным и клиническими штаммами *P.aeruginosa* (n=12)

При культивировании биопленок клинических штаммов *C. albicans* через 24 часа отмечалось увеличение интенсивности связывания красителя в 16,6 раза по сравнению с контролем ($p_1 < 0,01$) (рис. 7). Через 48 часов культивирования происходило достоверное увеличение связывания красителя кандидозной биопленкой по сравнению с предыдущими сутками в 1,44 раза ($p_2 < 0,01$). Через 72 часа моделирования микробных биопленок клиническим штаммами микроскопических грибов наблюдалось дальнейшее увеличение связывание красителя в 1,61 раза по сравнению со вторыми сутками культивирования ($p_3 < 0,01$).

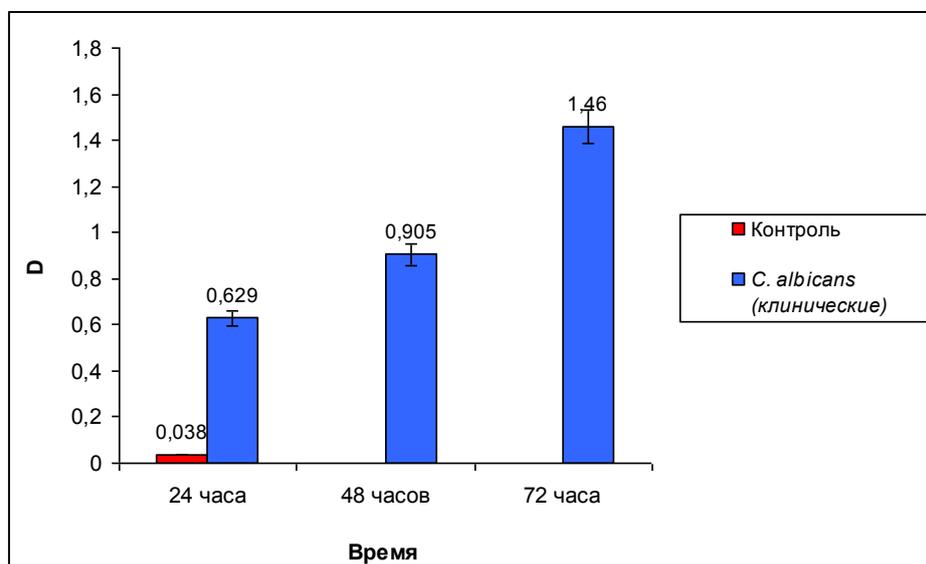


Рисунок 7 – Динамика величин связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками, образованными клиническими штаммами *C. albicans* (n=12)

При культивировании микробных биопленок, образованных ассоциацией клинических штаммов *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans* было установлено увеличение связывание красителя в первые сутки культивирования в 9,9 раза по сравнению с контролем (рис. 8). На вторые сутки культивирования биопленок происходило увеличение интенсивности связывания красителя в 1,94 раза, на третьи – в 1,77 раза по сравнению с предыдущими сутками.

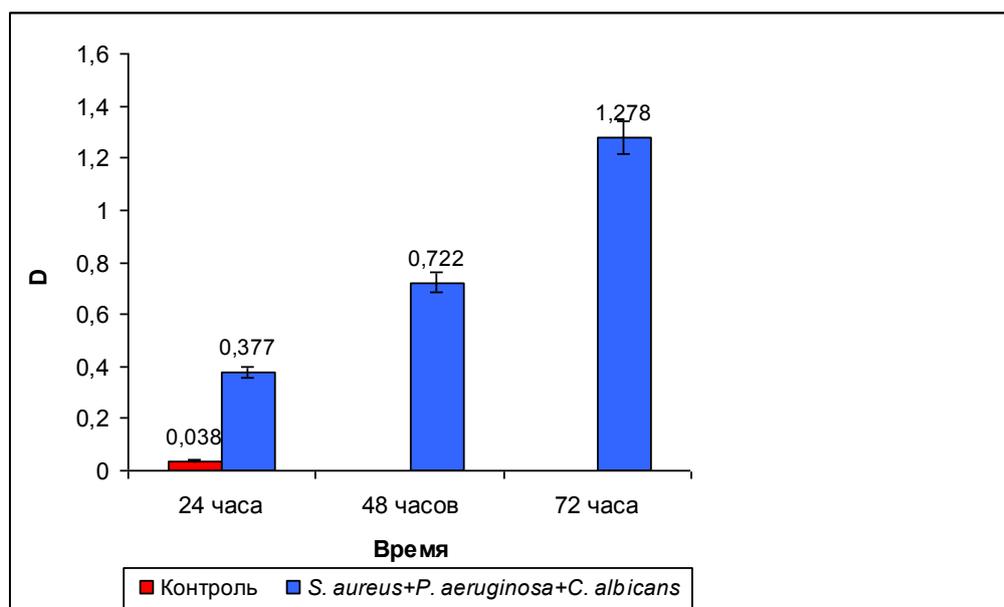


Рисунок 8 – Динамика величин связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками, образованными ассоциациями клинических штаммов *S. aureus* + *P. aeruginosa* + *C. albicans* (n=12)

При изучении пленкообразования у стандартного и клинических штаммов золотистого стафилококка наблюдалось увеличение накопления красителя 1-х по 3-и сутки инкубации в лунках иммунологических планшетов с МПБ. Вероятно, что в этот период происходит созревание и дифференцировка стафилококковой биопленки. В этот период микробные клетки характеризуются высоким уровнем метаболической кооперации и активно продуцируют факторы, отвечающие за процесс неспецифической адгезии. Критическая масса микробных биопленок, образованных стандартным штаммом и клиническими изолятами *S. aureus* была достигнута через 72 часа культивирования, что связано с достаточным количеством питательного субстрата и доступностью питательных веществ для микробных клеток.

При культивировании *in vitro* микробных биопленок стандартного штамма *P. aeruginosa* было установлено, что накопление красителя происходит в две фазы. Вероятно, первый пик накопления красителя совпадал со стадией созревания микробной биопленки, а, следовательно, характеризовался высокой метаболической активностью. Интенсивное снижение связывания кристаллического фиолетового через 48 часов культивирования, возможно, связано с гибелью части клеточной популяции из-за нехватки питательных веществ. Однако, через 72 часа культивирования биопленки наблюдался второй пик связывания красителя, что, вероятно, связано с использованием погибших клеток в качестве питательного субстрата.

При оценке особенностей формирования биопленок клиническими изолятами *P. aeruginosa* было установлено, что происходит удлинение фазы их созревания. Поскольку клинические штаммы при культивировании *in vitro* характеризуются низкой метаболической активностью, то в первые 48 часов культивирования процесс накопления кристаллического фиолетового был незначительным и носил монотонный характер. Через 72 часа культивирования происходило достоверное увеличение интенсивности накопления красителя по сравнению с предыдущими сутками, что, вероятно, соответствовало стадии дифференцировки микробной биопленки.

Полученные результаты позволили установить, что наибольшая скорость формирования биопленок клиническими штаммами *C. albicans* была зафиксирована в первые 24 часа моделирования. Вероятно, это время совпадает со стадией созревания биопленки, для которой характерны высокий уровень клеточного метаболизма. Резкое

снижение интенсивности накопления красителя через 48 и 72 часа культивирования возможно связано с накоплением токсических продуктов метаболизма, а также нехваткой питательных веществ для развития клеток микроскопических грибов. Однако незначительное нарастание количества микробных клеток, вероятно, происходит за счет использования в качестве питательного субстрата компонентов погибших клеток.

При оценке динамики микробной биопленки, содержащей ассоциации клинических штаммов микроорганизмов, было установлено, что максимальная скорость их формирования фиксировалась в первые сутки культивирования. Снижение скорости накопления красителя в последующие сутки, вероятно, связано с различной метаболической активностью ассоциантов и нехваткой питательного субстрата для их развития.

Особенности процесса формирования микробных биопленок *in vitro* на фоне действия полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода

Поскольку предварительные исследования позволили установить, что созревание микробной биопленки происходит в первые сутки ее моделирования, представляло интерес изучить влияние ПААГ-М на процесс формирования биопленок условно-патогенных бактерий, микроскопических грибов, а также их ассоциаций. Полученные результаты представлены на рисунке 9.

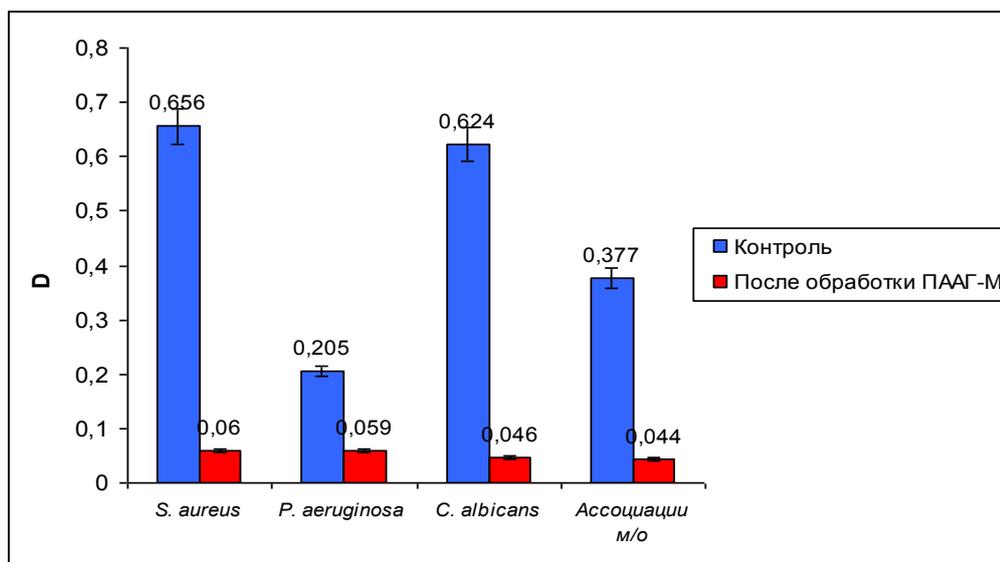


Рисунок 9 – Интенсивность связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками

Предварительная обработка лунок планшета сублетальными концентрациями ПААГ-М приводила к уменьшению связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками всех исследованных микроорганизмов, а также их ассоциаций.

Отмечено снижение накопления красителя биопленками, образованными клиническими штаммами *S. aureus* в 10,93 раза, *P. aeruginosa* – в 3,48 раза, а *C. albicans* – 13,57 раза по сравнению с контролем. Сходные результаты были отмечены в отношении биопленки, сформированной ассоциацией микроорганизмов: происходило снижение интенсивности связывания красителя в 8,57 раза по сравнению с контролем.

Нарушение процесса формирования микробных биопленок, вероятно, связано с нарушением ПААГ-М процессов неспецифической адгезии микроорганизмов, что позволяет рассматривать его в качестве эффективного антибиопленочного препарата для обработки катетеров, дренажных систем и других изделий медицинского назначения.

Для подтверждения данного предположения в качестве объекта исследования был выбран уретральный катетер для животных, изготовленный из полиуретана. Фрагменты

катетера помещали в МПБ, содержащий суточные культуры исследуемых микроорганизмов в концентрации 2×10^5 м.к./мл с целью формирования микробной биопленки. Опытные образцы были предварительно обработаны 1 % раствором ПААГ-М. Контрольные и опытные образцы инкубировали в течение суток при температуре 37°C , а затем оценивали процесс пленкообразования с использованием атомно-силовой микроскопии. Было установлено, что все исследуемые монокультуры и ассоциации микроорганизмов к концу первых суток культивирования были адгезированы на полиуретановой поверхности и образовывали зрелые биопленки с интенсивно выраженным экзополимерным матриксом.

Предварительная обработка уретрального катетера ПААГ-М вызывала выраженную дисперсию микробных биопленок, что вероятно, связано с нарушением процесса адгезии клеток микроорганизмов. Полученные результаты позволяют рекомендовать ПААГ-М для предварительной обработки изделий медицинского назначения с целью предотвращения формирования микробных биопленок.

Перспективы использования препаратов на основе полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в медико-биологической и ветеринарной практике

Для обоснования возможности использования полимера в ветеринарной практике была проведена серия экспериментов по моделированию полнослойных гнойных ран у белых лабораторных крыс с последующим их лечением. Все животные были разделены на 4 группы: в 1-й группе (контроль) раны ничем не обрабатывали; животным других групп ежедневно на поверхность раны наносили исследуемые препараты: 2-й группе – 0,5 %-ный раствор хлоргексидина (по стандартной методике), 3-й группе – водную суспензию наноагрегатов флавоноидов, 4-й группе – препарат, содержащий наноагрегаты флавоноидов, стабилизированные ПААГ-М. Течение раневого процесса у экспериментальных животных оценивали по изменению площади поверхности раны каждые 2 суток (рис. 10).

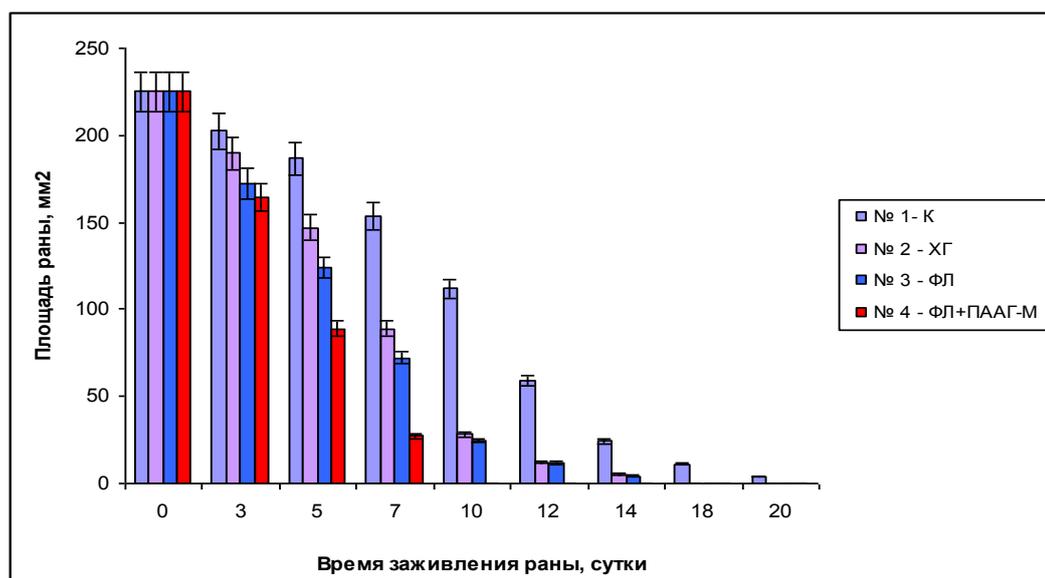


Рисунок 10 – Динамика изменения площади экспериментальных гнойных ран

Показано, что обработка гнойных ран препаратом на основе наноагрегатов флавоноидов, стабилизированных ПААГ-М, приводила к достоверному сокращению сроков их заживления в 2,2 раза по сравнению с контролем и в 1,5 раза при использовании стандартного антисептика или водной суспензии наноагрегатов флавоноидов с выраженной регенеративной активностью. Кроме того, на фоне действия исследуемого

препарата в организме экспериментальных животных не происходили достоверно значимые изменения основных показателей метаболических процессов, что свидетельствовало об отсутствии признаков интоксикации. Следовательно, препарат, содержащий наноагрегаты флавоноидов, стабилизированные ПААГ-М, эффективно сочетает в себе антисептические и регенеративные свойства.

Установленная антимикробная активность ПААГ-М в отношении широкого спектра условно-патогенных бактерий и грибов позволила предположить его эффективность и в отношении фитопатогенных микроорганизмов. В качестве экспериментальной модели в исследованиях использовали фитопатогенные бактерии – *Pectobacterium carotovorum*, *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* из коллекции ризосферных бактерий ИБФРМ РАН, и грибы – *Aspergillus tubingensis*, *Phoma fungicola*, *Fusarium tricinctum*, выделенные из пораженных плодовых культур семейства Розоцветных. Было установлено, что наибольшую чувствительность к полимеру проявили *P. carotovorum* и *X. campestris*, значения МПК для которых составили 8 мкг/мл, в меньшей степени *R. radiobacte*, МПК для которого составила 32 мкг/мл.

Противогрибковую активность ПААГ-М определяли методом серийных разведений на плотной среде ВДА, в состав которой вносили определенные концентрации полимера. Было установлено, что фитопатогенные грибы также чувствительны к ПААГ-М, однако значения МПК были выше по сравнению с исследуемыми бактериями: Так для *F. tricinctum* показатели МПК составили 125 мкг/мл, а для *P. fungicola* и *A. tubingensis* – 250 мкг/мл. Полученные результаты позволили сделать заключение о перспективности использования ПААГ-М в качестве антимикробного средства против фитопатогенов.

Ранее в работах Веденеевой с соавторами (2013, 2015) была показана эффективность использования ПААГ-М в качестве дезинфектанта в системах очистки загрязненных поверхностных вод. Нами были проведены исследования по использованию этого полимерного соединения в качестве дезинфицирующего средства при обработке холодильных камер, используемых на различных технологических этапах при производстве колбасных изделий на производственной базе компании «Генеральские колбасы» (г. Саратов). Было установлено, что, изначально обильно обсемененные поверхности, после обработки 1 % раствором ПААГ-М сохраняли стерильность в течение недели при обычном режиме работы предприятия. Единичные колонии микроорганизмов появились в смывах, полученных после 10-14 дней экспозиции, а достоверно значимое увеличение количества КОЕ происходило только через 20-23 дня после обработки. Полученные результаты подтверждают перспективы использования полимера в качестве эффективного дезинфицирующего средства.

Таким образом, в результате проведенных исследований была установлена зависимость антимикробной активности ПААГ-М от длины полимерной цепи, а также от концентрации гидрат-ионов йода в его составе, что позволяет осуществлять выбор наиболее эффективного препарата с заданными физико-химическими характеристиками и обеспечить тем самым его большую избирательность действия. Нарушение процесса пленкообразования условно-патогенными микроорганизмами открывает перспективы использования ПААГ-М в качестве эффективного антибиопленочного препарата для обработки изделий медицинского назначения. Широкий спектр антимикробного действия и высокая эффективность полиазаолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, открывает перспективы его применения в медико-биологической и ветеринарной практике в качестве антисептического и дезинфицирующего средства, а также компонента регенеративных препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Установлена зависимость проявления антимикробной активности полиазаолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, от его физико-химических характеристик: в отношении грамотрицательных бактерий наибольшую активность проявили варианты с низкой молекулярной массой полимерной цепи (>100 и

100-200 кДа), а в отношении грамположительных бактерий – варианты с большей молекулярной массой (200-350 и 400-500 кДа). Действие полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в отношении клеток микроскопических грибов не зависело от его молекулярной массы.

2. Выявлена прямая зависимость антимикробной активности полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, от концентрации в его составе гидрат-ионов йода в отношении условно-патогенных микроорганизмов. Показана высокая чувствительность фитопатогенных микроорганизмов к исследуемому полимеру, наиболее выраженная в отношении бактериальных видов.

3. Установлено снижение адгезивной способности клеток микроскопических грибов в результате их обработки 0,5%-ным раствором полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, что обеспечивало нарушение процесса формирования *in vitro* микробных биопленок условно-патогенных бактерий и микроскопических грибов при действии полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода.

4. Обработка экспериментальных гнойных ран лабораторных животных препаратом, содержащим полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода и наноагрегаты флавоноидов, приводила к сокращению сроков их заживления в 2,2 раза по сравнению с необработанными ранами, и не влияла на основные показатели углеводного, белкового, липидного и минерального обмена организма животных.

5. Использование 1% раствора полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, при обработке поверхности холодильных камер, используемых на различных технологических этапах пищевого производства, приводило к сохранению их стерильности в течение недели при обычном режиме работы предприятия.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в журналах из списка рекомендованных ВАК РФ:

1. Нечаева, О.В. Биологическая активность соединений ряда енаминов и их модифицированных аналогов в отношении референс-штамов и клинических изолятов бактерий / О.В. Нечаева, Н.Ф. Шуршалова, Д.А. Заярский, Е.И. Тихомирова, В.В. Сорокин, **М.М. Вакараева**, Н.В. Веденева // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 12, Ч.1. – С. 127–130.

2. Нечаева, О.В. Создание инновационных препаратов на основе гетероциклических соединений и полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов / О.В.Нечаева, Е.И. Тихомирова, Д.А. Заярский, **М.М. Вакараева** // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 6 (4). – С. 506–511.

3. Нечаева, О.В. Оценка антимикробной активности биосовместимого полимерного соединения в отношении возбудителей оппортунистических микозов / О.В. Нечаева, О.Г. Шаповал, **М.М. Вакараева**, Д.А. Заярский, Н.Ф. Шуршалова // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. – 2014. – № 4. – С. 80–83.

4. Нечаева, О.В. Антимикробная активность полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода / О.В. Нечаева, Е.И. Тихомирова, Д.А. Заярский, **М.М. Вакараева** // *ЖМЭИ*. – 2015. – № 3 – С. 88-92.

5. Шуршалова, Н.Ф. Разработка испытание лабораторных образцов инновационных биологически активных препаратов на основе структур «ядро–оболочка» / Н.Ф. Шуршалова, О.В. Нечаева, **М.М. Вакараева**, Е.И. Тихомирова // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. – 2015. – № 3, Т. 15. – С. 76–80.

Тезисы докладов международных и всероссийских конференций:

6. **Vakaraeva, M.M.** Developing and testing the application of innovative antiseptic medication for disinfecting drainage systems of medical purpose / M.M. Vakaraeva, O.V. Nechaeva,

E.I. Tikhomirova // Ökologische, technologische und rechtliche aspekte der lebensversorgung: abst das internat. symp. – Hannover, 2013. – P. 141–142.

7. Tikhomirova, E.I. Properties of poly azolidine ammonium modified by hydrate halogen ions and biological products on its basis / E.I. Tikhomirova, O.V. Nechaeva, D.A. Zayarsky, **M.M. Vakaraeva** // Biomaterials and Nanobiomaterials: recent advances safety-toxicology and ecology issues: 5th internat. cong. – Heraklion, 2014. – P. 21.

8. Nechaeva, O.V. Toxicity assessment of a polymer compound with antimicrobial properties / O.V. Nechaeva, **M.M. Vakaraeva**, E.I. Tikhomirova, D.A. Zayarsky // Ökologische, technologische und rechtliche aspekte der lebensversorgung: abst das internat. symp. – Hannover, 2014. – P. 123–124.

9. Нечаева, О.В. Влияние биосовместимого полимерного соединения на выживаемость возбудителей инвазивных микозов / О.В. Нечаева, В.Ю. Ульянов, Д.А. Заярский, Е.И. Тихомирова, **М.М. Вакараева** // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – № 2, Т. 6. – С. 106.

10. **Вакараева, М.М.** Зависимость антимикробной активности полиазолидинаммония, модифицированного (ПААГ–М) от физико–химических характеристик полимерного соединения / М.М. Вакараева, О.В. Нечаева, Е.И. Тихомирова, В.Ю. Ульянов, И.О. Лунева, Д.А. Заярский // Проблемы медицинской микологии. – 2015. – № 2, Т. 17. – С. 50–51.

11. Нечаева, О.В. Влияние полимерного соединения на адгезивные свойства *Candida albicans* / О.В. Нечаева, О.Г. Шаповал, **М.М. Вакараева**, В.Ю. Ульянов, Е.И. Тихомирова // Проблемы медицинской микологии. – 2015. – № 2, Т. 17. – С. 117–118.

12. Нечаева, О.В. Нарушение процесса формирования биопленок *in vitro* клиническими штаммами условно–патогенных микроорганизмов / О.В. Нечаева, В.Ю. Ульянов, С.В. Определенцева, **М.М. Вакараева**, О.Г. Шаповал, Е.И. Тихомирова, Д.А. Заярский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – № 2, Т.17.– С.37.

13. **Вакараева, М.М.** Биологическая активность наноразмерных агрегатов флавоноидов, стабилизированных полидиметил–диаллиламмонием йодид сахарозы / М.М. Вакараева, О.В. Нечаева, Д.А. Заярский, Г.М. Шуб, Н.В. Беспалова // Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве: матер. Междунар. науч.-практ. конф. – Саратов: КУБиК, 2013. – С. 13–15.

14. **Вакараева, М.М.** Создание комплексного антисептического препарата широкого спектра действия для обработки дренажных систем медицинского назначения / М.М. Вакараева, О.В. Нечаева, Е.И. Тихомирова, Д.А. Заярский // Математические методы в технике и технологиях ММТТ-26: сб.тр. XXVI междунар. научн. конф. – Саратов: СГТУ, 2013. – С. 288.

15. **Вакараева, М.М.** Лабораторные испытания инновационного антимикробного препарата с регенеративной активностью / М.М. Вакараева, О.В. Нечаева, Д.А. Заярский, Е.И. Тихомирова // Биотехнология: реальность и перспективы: матер. Междунар. науч. – практ. конф. – Саратов, 2014. – С. 106–109.

16. Нечаева, О.В. Биологическая характеристика инновационных антимикробных препаратов для ветеринарной медицины / О.В. Нечаева, Е.И. Тихомирова, **М.М. Вакараева**, Д.А. Заярский // Биотехнология: реальность и перспективы: матер. междунар. науч. –практ. конф. – Саратов, 2014. – С. 178–180.

17. **Вакараева, М.М.** Создание лабораторной модели ранозаживляющего средства на основе наноагрегатов флавоноидов, стабилизированных биосовместимым полимером / М.М. Вакараева, Д.А. Заярский, О.В. Нечаева // Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: сб. труд. IV междунар. науч.-практ. конф. – Казань, 2014. – С. 148.

18. **Вакараева, М.М.** Разработка инновационного антисептического препарата широкого спектра действия на основе наноструктурированного биосовместимого полимерного соединения / М.М. Вакараева, О.В. Нечаева, Е.И. Тихомирова, Д.А. Заярский // Математические

методы в технике и технологиях ММТТ-27: сб.тр. XXVII Междунар. научн. конф. – Саратов: СГТУ, 2014. – С. 285.

19. **Вакараева, М.М.** Влияние полидиметилдиаллиламмония йодида сахарозы на выживаемость коагулазоположительных стафилококков / М.М. Вакараева, О.В. Нечаева, Д.А. Заярский // Экологические проблемы промышленных городов: сб. науч. трудов 6-й Всерос. науч.–практич. конф. с междунар. участием – Саратов, 2013. – Т.2. – С. 40–42.

20. **Вакараева, М.М.** Обоснование и применение нового антисептического препарата широкого спектра действия для обработки дренажных систем медицинского назначения / М.М. Вакараева, О.В. Нечаева, Е.И. Тихомирова, Д.А. Заярский // Актуальные проблемы разработки и применения новых материалов и технологий: сб. матер. Всерос. молодеж. науч. конф. – Саратов, 2013. – С. 687–691.

21. **Вакараева, М.М.** Разработка и обоснование применения инновационного антисептического препарата для обработки дренажных систем медицинского назначения / М.М. Вакараева, Е.И. Тихомирова, О.В. Нечаева, Д.А. Заярский // I Кавказский экологический форум: сб. матер. – Чеченская республика, Грозный, 2013. – С. 50–52.

22. **Вакараева, М.М.** Изучение ранозаживляющих свойств инновационного препарата, созданного по технологии «ядро оболочка» на основе наноагрегатов флавоноидов и биосовместимого полимера / М.М. Вакараева, Е.И. Тихомирова, О.В. Нечаева, Д.А. Заярский // Актуальные вопросы биомедицинской инженерии: сб. матер. III Всерос. науч. конф. для молодых ученых и студентов. – Саратов, 2013. – С. 527.

23. Нечаева, О.В. Характеристика биологической активности полиазолидин-аммония, модифицированного гидрат ионами галогенов / О.В. Нечаева, Е.И. Тихомирова, **М.М. Вакараева**, Д.А. Заярский // Человек, экология, культура: современные практики и проблемы: сб. науч. труд. / Под ред. Е.И. Тихомировой. Саратов: СГТУ, – 2014. – С. 156.

Публикации в других изданиях:

24. Нечаева, О.В. Изучение биологической активности полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов, и его модификаций в отношении микроорганизмов / О.В. Нечаева, Д.А. Заярский, **М.М. Вакараева**, Н.В. Веденева, Е.И. Тихомирова // Вестник развития науки и образования. – 2014. – № 1. – С. 32–36.

25. Ульянов, В.Ю. Биологическая кинетика пленкообразования эталонными и клиническими штаммами *Staphylococcus aureus* / В.Ю. Ульянов, С.В. Определенцева, Д.А. Заярский, О.В. Нечаева, **М.М. Вакараева**, Е.И. Тихомирова // Sworld: сб. науч. труд. – 2014. – Т. 35, №1. – С. 40–42.

26. Нечаева, О.В. Исследование зависимости биологической активности полимерных соединений от концентрации гидрат-ионов йода / О.В. Нечаева, **М.М. Вакараева**, Е.И. Тихомирова, Д.А. Заярский, В.Ю. Ульянов, С.В. Определенцева // Sworld: сб. науч. труд. – 2014. – Т. 37, № 1. – С. 81–84.

27. Ульянов, В.Ю. Динамика формирования микробных биопленок клиническими штаммами грибов рода *Candida* / В.Ю. Ульянов, О.В. Нечаева, С.В. Определенцева, **М.М. Вакараева**, О.Г. Шаповал, Е.И. Тихомирова, Д.А. Заярский // Успехи микологии в России. – 2015.– Т. 4. – С. 90-92.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор глубоко признателен своему научному руководителю – к.б.н., доценту кафедры экологии Нечаевой Ольге Викторовне и научному консультанту – заведующей кафедрой экологии СГТУ имени Гагарина Ю.А. д.б.н., профессору Е.И. Тихомировой, а также всем сотрудникам кафедры экологии за всестороннюю помощь в работе. Выражаю искреннюю благодарность директору Саратовского НИВИ, Заслуженному ветеринарному врачу РФ Ласкавому В.Н. за возможность проведения исследований на базе института и ценные консультации.