

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.»

На правах рукописи

ВАКАРАЕВА МАЛИКА МОВСАРОВНА

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

Специальности 03.02.03 – микробиология
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Нечаева Ольга Викторовна,
кандидат биологических наук

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

Саратов – 2015

Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов.....	11
1.2 Микробные биопленки как способ сохранения микроорганизмов	15
1.3 Пути преодоления формирования микробных биопленок.....	23
1.4 Проблемы контаминации продуктов питания условно-патогенными и фитопатогенными микроорганизмами.....	28
1.5 Перспективы использования полимерных соединений в медико-биологической и ветеринарной практике.....	31
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	37
2.1 Экспериментальные модели	37
2.2 Химические соединения, использованные в работе.....	39
2.3 Методы микробиологических исследований.....	41
2.3.1 Методика формирования экспериментальной полнослойной гнойной раны	43
2.3.2 Биохимические методы исследования	44
2.3.3 Методы статистической обработки экспериментальных данных.....	47
ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИАЗОЛИДИНАММОНИЯ, МОДИФИЦИРОВАННОГО ГИДРАТ-ИОНАМИ ЙОДА, В ОТНОШЕНИИ ПЛАНКТОННЫХ ФОРМ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	48
3.1 Зависимость проявлений биологической активности полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, от его физико-химических характеристик.....	48
3.2 Изучение биологической активности полимерного соединения в отношении клинических штаммов возбудителей оппортунистических микозов.....	51
3.3 Влияние полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, на адгезивные свойства <i>Candida albicans</i>	54
ГЛАВА 4 ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК СТАНДАРТНЫМИ И КЛИНИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ УСЛОВНО-	

ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ И ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ ПОЛИАЗОЛИДИНАММОНИЯ, МОДИФИЦИРОВАННОГО ГИДРАТ-ИОНАМИ ЙОДА, НА ПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ.....	57
4.1 Динамика формирования <i>in vitro</i> микробных биопленок.....	57
4.2 Особенности процесса формирования микробных биопленок <i>in vitro</i> при действии полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода	62
ГЛАВА 5 ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИАЗОЛИДИНАММОНИЯ, МОДИФИЦИРОВАННОГО ГИДРАТ-ИОНАМИ ЙОДА, В МЕДИКО–БИОЛОГИЧЕСКОЙ И ВЕТЕРИНАРНОЙ ПРАКТИКЕ.....	66
5.1 Влияние препарата наноагрегатов флавоноидов, стабилизированных полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода, на заживление экспериментальных гнойных ран лабораторных животных.....	66
5.2 Оценка действия препарата наноагрегатов флавоноидов, стабилизированных полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода, на метаболические процессы в организме лабораторных животных	68
5.3 Изучение активности полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в отношении фитопатогенных микроорганизмов	75
5.4 Использование полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в качестве дезинфицирующего средства для обработки холодильных камер пищевого производства	77
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	84
ВЫВОДЫ	91
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	93
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	94

ВВЕДЕНИЕ

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; Beaudeau 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 (Drucker, Panasyuk, 2006; Менча, 2006; Шорникова, Куяров, 2007; Савилов и др., 2008).

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 (Monfardini et al., 1998; Shtilman, 2009; Дьякова и др., 2012; Серебренникова и др., 2013; Панарин и др., 2014).

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; Веденева, 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 (Wozniak, 2004; Smith, 2008; 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.

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 полиазолидин-аммония, 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 ком-

понента 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.

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, загрязненных условно-патогенными микроорганизмами.

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.

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).

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 анти-септического препарата широкого спектра действия на основе наноструктурированного биосовместимого полимерного соединения».

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.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов

В настоящее время проблема развития антибиотикорезистентности микроорганизмов приобретает глобальный характер. Устойчивость к антимикробным препаратам представляет собой естественную биологическую реакцию, которая возникает как результат естественного отбора для сохранения жизнеспособности микробной популяции (Сидоренко, 2002; Цибулевский, Соколов, 2008). Описаны случаи размножения потенциально патогенных микроорганизмов в растворах, предназначенных для дезинфекции, адаптации к терапевтическим дозам антибиотиков и полирезистентности к десяткам антимикробных средств. Вследствие нерационального и не всегда аккуратного или неквалифицированного использования антибиотиков и дезинфицирующих средств число резистентных штаммов постоянно возрастает, а полирезистентные возбудители инфекционных заболеваний имеют тенденцию к распространению во внешней среде.

Устойчивость микроорганизмов к антимикробным препаратам может быть природной или приобретенной (Семенов, 2004; Супотницкий, 2011; Туркутюков, 2011). Первый вид устойчивости характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени для действия антимикробного препарата или ее недоступностью. Приобретенная устойчивость возникает в результате воздействия на микроорганизмы антимикробных препаратов, особенно в их низких концентрациях, путем возникновения мутаций хромосомной ДНК или в результате горизонтального переноса генов устойчивости (Bennett, 2008; Mariani-Kurkdjian, 2012; Warnes, 2012).

Наиболее распространены и изучены четыре основные биохимические механизмы устойчивости бактерий к антимикробным препаратам:

1. энзиматическая инактивация антимикробного препарата;
2. модификация молекулы-мишени действия препарата;
3. активное выведение препарата из микробной клетки;
4. изменение проницаемости внешней мембраны микробной клетки.

В последние годы ведется активное изучение других механизмов устойчивости: формирование метаболического «шунта», связанного с приобретением микробной клеткой генов альтернативного метаболического пути, имитация молекулы-мишени и сверхэкспрессия молекулы-мишени (Hegde et al., 2005; Nikaido, 2009; Hoek et al., 2011). Кроме того, устойчивость даже к одному антибиотику зависит от действия многих генов, что и определяет возможность одновременного использования целого комплекса механизмов защиты в отношении одного антимикробного препарата.

Было установлено, что клинические штаммы бактерий проявляли устойчивость к β -лактамам за счет наличия фермента DD-транспептидазы, с помощью которого снижалась аффинность мишени, а также благодаря генам, кодирующим белки, инактивирующие препараты, что значительно снижало восприимчивость микроорганизма к данной группе антибиотиков (Davies, 1994).

Главным способом защиты микроорганизмов от аминогликозидов является их энзиматическая модификация (Mingeot-Leclercq, 1999). Для этого микробные клетки используют три класса ферментов, модифицирующие аминогликозиды: N-ацетилтрансферазы (AAC), использующие в качестве донора ацетил-коэнзим А и изменяющие функции аминогруппы, O-нуклеотидилтрансферазы (ANT) и O-фосфотрансферазы (APH), влияющие на функции гидроксильных групп и использующие в качестве донора АТФ. С помощью AAC может происходить ацетилирование 1-, 3-, 6-, и 2-аминогруппы, а для ANT и APH мишенью становятся гидроксильные группы аминогликозида, что и приводит к энзиматической инаktivации антибиотика.

Проблема антибиотикорезистентности среди клинически значимых микроорганизмов уходит своими корнями в сложные экологические и эволюционные отношения между самими микроорганизмами, сложившиеся задолго до появления человека как биологического вида. Огромный потенциал генов антибиотикорезистентности накоплен в суперинтегронах, еще не вовлеченных в генетический обмен среди встречающихся в клинике микроорганизмов. Несмотря на значительные успехи клинической микробиологии, этиотропная терапия, по крайней

мере, на начальном этапе остается эмпирической, основой режимов которой являются данные о природной чувствительности к антибактериальным препаратам наиболее вероятных возбудителей. Однако проблема значительно усложняется распространением, как во внебольничных, так и особенно в госпитальных условиях приобретенной резистентности.

Лекарственная устойчивость возбудителей инфекционных заболеваний имеет огромное медицинское и социально-экономическое значение, связанное с использованием новых более дорогостоящих препаратов, а также увеличением сроков лечения пациентов. Поэтому поиск путей преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов представляет собой актуальную проблему.

Один из возможных способов преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов является химическая модификация молекул антимикробных веществ, направленная на создание новых препаратов, активных в отношении антибиотикорезистентных микроорганизмов (Гольцева, 2013). Таким образом были получены полусинтетические пенициллины и цефалоспорины, устойчивые к действию β -лактамаз: метициллин, оксациллин, диклоксациллин, цефамандол, цефуроксим, цефсулодин и ряд других. Однако спустя некоторое время после начала использования новых препаратов вновь происходит распространение детерминант резистентности к ним в плазмидах и транспозонах, что ведет к снижению эффективности препаратов и необходимость синтеза все новых антимикробных средств.

Еще одним перспективным методом борьбы с распространением антибиотикорезистентности служит использование соединений, подавляющих определенные механизмы устойчивости в бактериальной клетке. Наибольшее применение нашли неконкурентные ингибиторы β -лактамаз, например, клавулановая кислота, которая характеризуется слабой антибактериальной активностью и способна необратимо ингибировать пенициллиназы грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов (Карпов, 2005; Finlay, 2003; Casellas, 2005).

Возможное решение проблемы антибиотикорезистентности связано с применением фосфогликолипидных антибиотиков, которые взаимодействуют с половыми пилиями микроорганизмов и подавляют клетки-доноры, несущие R-плазмиды.

Пока данная группа препаратов используется в животноводстве и птицеводстве, что позволяет значительно снизить количество антибиотикорезистентной микрофлоры в желудочно-кишечном тракте сельскохозяйственных животных (Василькевич, 2014; Лопатнюк, 2014; Мутенко, 2014).

Эффективным подходом борьбы с лекарственной устойчивостью микроорганизмов является использование соединений, обеспечивающих удаление R-плазмид бактерий и действующих на детерминанты лекарственной устойчивости. Одним из способов, ведущих к элиминации плазмид из микробной клетки, стало применение ДНК-тропных веществ. Акрифлавин и хинакрин вызывают элиминацию R-факторов из сальмонелл, шигелл и эшерихий (Субботин, 2000; Lee, 2002). ДНК-тропные соединения замедляют развитие резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам за счет снижения частоты мутаций. Так, акрихин и акрифлавин подавляют развитие антибиотикорезистентных штаммов бактерий к пенициллину, ампициллину, неомицину, рифампицину и стрептомицину. Использование таких препаратов, как бромистый этидий, неомицин, рифампицин и представители нитрофуранов подавляют процесс переноса факторов устойчивости при конъюгации и трансдукции бактерий.

Одним из наиболее перспективных способов, ограничивающих появление и распространение устойчивых штаммов микроорганизмов, является использование комбинации антимикробных препаратов (Мишин, 1999; Никонов, 2004; Абдалкин, 2011). Например, использование изониазида со стрептомицином предупреждает развитие резистентных к антибиотику штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. Кроме того, рационально подобранные сочетания антибактериальных препаратов могут воздействовать на устойчивые штаммы микроорганизмов с помощью подавления ферментов. Так, при комбинировании левомецетина с ампициллином и окситетрациклина с пенициллином удается воздействовать на штаммы *Haemophilus influenzae* и *Staphylococcus spp.*, продуцирующие β -лактамазы, что приводит к восстановлению чувствительности этих микроорганизмов к β -лактамным антибиотикам.

В настоящее время в практической медицине в качестве противовоспалительных, антибактериальных, противогрибковых, противовирусных, противоопухолевых, антисептических средств широко применяют синтетические гетероциклические соединения (Kaminskyu, Zimenkovsky, Lesyk, 2009).

1.2 Микробные биопленки как способ сохранения микроорганизмов

Для выживания и размножения в организме человека и животных микроорганизмы применяют разнообразные стратегические приемы, одним из которых является формирование особой структурно-функциональной их организации в сообществах, получившее название биопленки.

Биопленка (англ. biofilm) – это высокоорганизованные, подвижные, непрерывно изменяющиеся гетерогенные сообщества, которые состоят из активно функционирующих клеток, так из покоящихся форм, 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). Для большинства бактерий состояние биопленки является базовым, выработанным в течение миллионов лет под влиянием естественного отбора в меняющихся экологических условиях.

Согласно современным представлениям микробные биопленки включают в себя три обязательных компонента:

1. Поверхность (интерфаза), на которой локализуется биопленка;
2. Совокупность микроорганизмов;
3. Внеклеточный матрикс, объединяющий микроорганизмы в единую систему.

Биопленки могут состоять из одного или нескольких видов микроорганизмов (Ермолов, 1998; Ильина и др., 2004; Афиногенова и др., 2011).

С появлением понятия «биопленка» в учении об инфекции началось качественное переосмысление, как базовых механизмов инфекционного процесса, так и практических подходов к терапии и профилактике биопленочной патологии.

Это связано с тем, что бактерии в составе биопленки имеют принципиальные отличия от бактерий, которые находятся в планктонном (плавающем) состоянии, которые могут усиливать патогенность биопленочных бактерий, а также обеспечивать развитие устойчивости к эффекторам иммунной системы и антимикробным препаратам (Бехало и др., 2010; Чеботарь и др., 2012). Это может приводить к хронизации инфекционного процесса, развитию осложнений и неэффективности антибиотикотерапии (Смирнова и др., 2010; Романова и др., 2011; Лямин и др., 2012; Donlan et al., 2002; Aparna et al., 2008; Wolcott et al., 2013). Ситуация усугубляется тем, что при лабораторной оценке эффективности антимикробного воздействия до настоящего времени все исследования выполняются на чистых культурах бактерий, выращенных в богатых питательными веществами средах в планктонном виде. Такие условия далеки от реальных, в которых бактерии персистируют в организме пациентов с тяжелыми септическими процессами (Donlan, 2002).

Инфекции, патогенез которых детерминирован микробными биопленками, называются биопленочными инфекциями (Lynch, et al., 2008; Rumling, et al., 2012). Многие хронические заболевания связаны с биопленочными инфекциями – патология зубов, околозубных тканей, средний отит, муковисцидозная пневмония, остеомиелит, инфекции мочевыводящих путей (Лямин, и др., 2012; Donlan, et al., 2002).

Образование биопленок – это сложный комплексный динамический процесс, состоящий из нескольких этапов (рис.1.2.1):

1. Обратимое прикрепление к поверхности и перераспределения клеточной массы. Чаще всего микроорганизмы существуют в виде свободно плавающих масс или единичных (например, планктонных) колоний. Однако в нормальных условиях большинство микроорганизмов стремится прикрепиться к поверхности и, в конечном счете, образовать биопленку.

2. Перманентное прилипание к поверхности. На этом этапе происходит активное деление клеток для создания клеточных кластеров. По мере размножения бактерий они более прочно прилипают к поверхности, дифференцируются, обмениваются генами, что обеспечивает их выживаемость.

3. Формирование слизистого защитного экзополимерного матрикса биопленки. Устойчиво прикрепившись, бактерии начинают образовывать экзополисахаридный окружающий матрикс, известный как внеклеточное полимерное вещество (extracellular polymeric substance). Это предохранительный матрикс или «слизь» (EPS-matrix). Мелкие колонии бактерий затем образуют первоначальную биопленку (Афиногенова и др., 2011; Donlan et al., 2002).



Рисунок 1.2.1 – Схема процесса формирования бактериальных биопленок (Афиногенова, 2011)

Экспериментальные лабораторные исследования показали, что планктонные бактерии, например, стафилококки, стрептококки, псевдомонады, кишечная палочка обычно присоединяются друг к другу в течение нескольких минут (Афиногенова и др., 2011). В течение 2-4 часов бактерии образуют прочно соединенные микроколонии, вырабатывают внеклеточные полисахариды, что делает их значительно толерантными к действию биоцидов, например, антибиотиков, антисептиков и дезинфектантов. В течение 6-12 часов формируются зрелые колонии биопленки, микроорганизмы которых проявляют высокую устойчивость к биоцидам. Такие биопленки быстро восстанавливаются после механического разрушения и вновь формируют зрелую форму в течение 24 часов. В зависимости от ви-

дов бактерий и условий роста в течение 2-4 дней уменьшается количество планктонных бактерий.

Изначальное прикрепление микробной клетки к поверхности субстрата осуществляется за счет действия электростатических, гидрофобных сил, сил Ван дер Ваальса, неспецифической адгезии (Pace et al., 2006). Наблюдения *in vitro* показали, что степень адгезии с последующим формированием биопленок наиболее выражена к таким материалам, как латекс, силикон, поливинилхлорид (Darouiche, 2001). Адгезия к тефлону, полиуретану, нержавеющей стали и титану проявляется в меньшей степени. Все эти материалы широко применяются в медицинской практике, что является дополнительным риском появления биопленок. Адгезия к биологическим поверхностям (к клеткам тканей, стенкам сосудов) обуславливается специфическим взаимодействием белков-адгезинов или лектинов фимбрий экзоплазматического компартмента бактериальной клетки с рецепторами или определенными доменами поверхности мембран хозяйских клеток.

Важнейшим элементом в процессе адгезии стафилококков является PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin) – полисахарид, который участвует как в клеточной субстратной адгезии, так и в последующем формировании клеточных кластеров (клеточно-клеточная адгезия). PIA инициирует гемагглютинацию и препятствует фагоцитозу за счет активации бактериальной агрегации (Vergara-Irigaray et al., 2008; Vu et al., 2009). Еще один изученный компонент экзоплазматического компартмента это α -токсин стафилококков, кодируемый геном *hla*. α -токсин, помимо основной своей функции – образования поровых каналов в мембранах клеток эукариот (один из факторов вирулентности), – обладает еще и свойствами адгезина (Pace et al., 2006). Мутанты с нарушенным биогенезом α -токсина и / или PIA не способны формировать полноценные биопленки (Gotz, 2002; Yao et al., 2005). Также на первых стадиях формирования биопленок стафилококков значительную роль играют ВАР-белки (biofilm associated protein), n-ацетилглюкозамин, тейхоевые кислоты (Tormo et al., 2005; 2007). За процессы адгезии, синтеза PIA и прочих структурных компонентов матрикса биопленок отвечает *ica*-оперон, находящийся в сложной системе генетической регуляции, охватывающей также экспрессию фак-

торов вирулентности (Cho et al., 2002; Li et al., 2004; Petrelli et al., 2008; Diamond-Hernandez et al., 2010).

У многих видов стафилококков, а также среди некоторых других грамположительных микроорганизмов обнаружен *icaADBC*-локус (Qin et al., 2007; Collery et al., 2008; Smith et al., 2008). Все вышеперечисленные синтезируемые компоненты специфически взаимодействуют с субстратами, они осуществляют якорную функцию и инициируют дальнейшие процессы образования биопленки.

После необратимой адгезии популяция микроорганизма начинает интенсивно пролиферировать с образованием многоклеточных слоев и синтезировать компоненты экзополимерного матрикса EPS-matrix, что является одним из ключевых моментов образования биопленок (Гостев и др., 2010). Применение лазерной конфокальной микроскопии, сканирующей электронной микроскопии, позволило установить, что биопленки имеют сложную трехмерную структурную организацию (Flemming et al., 2000). Состав матричной слизи варьирует в зависимости от присутствующих в нем микроорганизмов и включает полисахариды, белки, гликолипиды и бактериальную ДНК. При этом основным компонентом являются полисахариды (декстран, гиалуроновая кислота, целлюлоза и другие). По данным разных авторов эта фракция составляет от 40 до 95 % от общей массы биопленки; содержание других химических веществ значительно варьирует и зависит от таксономической единицы бактерии, образующей биопленку (Pace et al., 2006). Доля белков в биопленке может составлять до 60 %, липидов до 40 % и нуклеиновых кислот 1-20 % (Гостев и др., 2010; Pace et al., 2006). Порядка 80-90 % объёма биопленок занимает вода, поэтому все ее составляющие находятся в гидротированном состоянии. Матрикс биопленки разделен каналами, наполненными водой, а также имеет полости. Через каналы транспортируются питательные вещества и проходят конвективные потоки кислорода от внешних к внутренним частям биопленки, одновременно с этим выводятся метаболиты бактериальных клеток (Гостев и др., 2010).

Формирование, рост, миграция планктонных форм клеток для колонизации в биопленках регулируются на уровне популяции посредством механизмов меж-

клеточной коммуникации – «Quorum sensing» (QS) – это процесс коллективной координации экспрессии генов в популяции бактерий, опосредующий специфическое поведение клеток (Гостев и др., 2010). Механизм работы QS основан на сложной иерархической регуляции целевых локусов генома бактериальной клетки. При этом регуляция осуществляется на разных уровнях воздействия: транскрипционном, трансляционном, посттрансляционном. На конкретный клеточный сигнал клетки в популяции отвечают специфическим ответом. На сегодняшний день установлено, что клеточно-клеточные взаимосвязи влияют на внутривидовую дифференцировку клеток, на экспрессию генов вирулентности, регулируют ростовые процессы, характер и направление подвижности (таксис), а также бактериальный апоптоз и токсинообразование. Работу QS можно сравнить с гормональной регуляцией функциональной активности различных органов и тканей в многоклеточном организме. Грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы используют различные сигнальные системы и разные химические передатчики сигналов.

Из многочисленных свойств биопленки клиническое значение имеют высокая устойчивость к факторам естественной резистентности организма, к разнообразным внешним воздействиям, к антибактериальным средствам (Ильина и др. 2004; Афиногенова и др., 2011). Было установлено, что чувствительность микроорганизмов к антибиотикам в планктонной фазе в 10–1000 раз выше, чем у микроорганизмов в составе биопленки (Mah, 2001).

Значительная резистентность к антибиотикам микроорганизмов в составе биопленок по сравнению с планктонными формами обусловлена способностью бактерий накапливать в матриксе внеклеточные ферменты, разрушающие антибиотики и химиотерапевтические препараты, и агрегационной природой биопленок, связанной с уменьшением площади открытой поверхности клеток, что приводит к их физической недоступности. Также особую роль играет резистентный фенотип клеток и сниженный метаболизм микроорганизмов в биопленке, который достигается за счет их многослойной топографии и приводит к снижению антибиотикочувствительности. Строение биопленок идеально способствует процессам

обмена генетической информацией, в том числе резистентности к антимикробным химиопрепаратам, за счет тесного контакта и стабильной пространственной локализацией клеток. Исследования *in vitro* показали, что уровень конъюгации в биопленках гораздо выше, по сравнению с планктонными формами бактерий (Гостев и др., 2010; Афиногенова и др., 2011). Более того, процессы конъюгации могут регулироваться на популяционном уровне за счет бактериальной коммуникации, например, вирулентные энтерококки для передачи генетической информации используют сигнальные системы.

Кроме того, по данным ряда авторов, повышение резистентности биопленочных форм связано с 4 главными факторами (Huang, 1998; Mah, 2001; Ren, 2004; Jenal, 2006):

1. Матрикс биопленки может препятствовать диффузии, выполняя барьерную функцию;

2. Создание различных условий внутри микробного сообщества, например, уменьшение концентрации кислорода в глубинных слоях биопленки, приводит к образованию медленнорастущих микроорганизмов; изменение pH в глубинных слоях приводит к изменению концентрации ионизированной и неионизированной форм антибиотика, что влечет за собой изменение в степени его воздействия на клетки;

3. Дифференцирование микроорганизмов приводит к возникновению клеток-персистеров с пониженной чувствительностью к антибиотикам. Показано, что клетки-персистеры выживали после терапии некоторыми фторхинолонами (Kaldalu, 2004);

4. У микроорганизмов в составе биопленки происходит экспрессия специализированных генов, отвечающих за резистентность, которые не экспрессируются у планктонных форм. Например, ген *ndvB* у *P. aeruginosa* обеспечивает резистентность к тобрамицину за счет кодирования фермента, участвующего в синтезе циклического глюкана, который связывается с тобрамицином и не позволяет реализовать бактерицидное действие (Mah, 2003). Было доказано, что экспрессия этого гена наблюдается только у бактерий в составе биопленки. В ряде работ было показано, что индуцированная резистентность реализуется совместно с природными генетиче-

скими механизмами и приводит к экспрессии ряда генов (Whiteley, 2001; Bagge, 2004).

Одним из основных требований к имплантируемым медицинским изделиям является их соответствие необходимым биологическим свойствам. Так, в случае протезов кровеносных сосудов, дренажей, катетеров, искусственных хрусталиков глаза, биосенсоров и др. взаимодействие поверхности изделия с биологической средой должно быть минимально, а для ортопедических и стоматологических имплантатов, напротив, требуется прорастание окружающей ткани в объем изделия (Ремеева, 2008).

Формирование биопленок возможно на изделиях медицинского назначения, таких как катетеры, эндотрахеальные трубки, внутриматочные спирали, контактные линзы и др. (Афиногенова и др., 2011; Pascual, 2002; Hall-Stoodley et al., 2009). Это является этиопатогенетической основой развития так называемых девайс-ассоциированных инфекций. В Германии, одной из немногих стран, где ведется статистический учет девайс-ассоциированных инфекции, количество подобных заболеваний превышает 100000 случаев в год (Mashburn-Warren et al., 2006; Trampuz et al., 2006). В США и Западной Европе ежегодно регистрируется более 500000 случаев катетер – ассоциированных инфекций (Бережанский и др., 2006). Каждое осложнение в виде катетер-ассоциированной инфекции удорожает лечение одного больного на сумму от 33000 до 65000 долларов США (Pittet et al., 1994; Orsi et al., 2002). В итоге на лечение и борьбу с осложнениями биопленочных катетер-ассоциированных инфекций система здравоохранения США вынуждена тратить около 2 миллиардов долларов в год (Dimick et al., 2001; Rogers et al., 2009). В настоящее время установлено, что биопленки являются основным фактором патогенеза заболеваний, характеризующихся хроническим воспалением (Товмасын 2009; Афиногенова и др., 2011;). Их обнаруживают более чем в 80 % случаев хронических инфекционных заболеваний, что позволило выдвинуть концепцию хронических болезней как болезней биопленок (Гостев и др., 2010; Афиногенова и др., 2011).

1.3 Пути преодоления формирования микробных биопленок

Большинство современных исследований направлено на поиск путей по преодолению устойчивости микробных биопленок к антимикробным препаратам, связанных с разработкой новых методов лечения, направленных на дезорганизацию биопленки и уничтожение клеток-персистеров (Comrans et al., 2003). Все предлагаемые в настоящее время направления для решения данной проблемы можно объединить в следующие:

- ингибиторы системы Quorum Sensing (QS), что приводит к нарушению межклеточного обмена информацией;
- ингибиторы, реализующие эффект не через систему QS;
- блокирование синтеза или разрушение полимерного матрикса;
- препараты, влияющие на адгезию;
- механическое (физическое) воздействие.

Кроме того, использование бактерицидных агентов, действующих на структуру или функции биопленок, может оказаться более эффективным, чем стандартная антибактериальная терапия.

Одним из перспективных методов, препятствующих формированию микробных биопленок, является сочетанное применение этиотропного антибактериального препарата в комбинации с кларитромицином (антибиотик из группы макролидов). Было установлено, что кларитромицин, к которому *P. aeruginosa* характеризуется природной устойчивостью, приводил к редукции пилей и ингибировал подвижность синегнойной палочки, а также изменял архитектуру биопленки (Wozniak, 2004). Было показано, что сочетанное действие кларитромицина приводило к уменьшению содержания экзополисахаридов в матриксе биопленок, уменьшалось количество альгината, гексозы, истончался гликокаликс, повышалась концентрация гексоз внутри клеток, что способствовало повышению проникновения в клетки *P. aeruginosa* офлоксацина (Yasuda, 1993, 1994).

Показано, что в матриксе биопленок различных, неродственных микроорганизмов находятся фрагменты внеклеточной ДНК, содержащей гены бактериальной хромосомы и плазмид, которые представляют собой новую мишень для воздействия на бактерии с целью повышения эффективности антибиотикотерапии. Показано, что разрушение внеклеточной ДНК ферментом ДНКазой растущей и зрелой биопленки грамотрицательных и грамположительных бактерий приводит к необратимому изменению таких важных свойств, как уменьшение биомассы и снижение количества антибиотикоустойчивых клеток, поскольку наблюдается частичное угнетение передачи плазмидных генов, контролирующих антибиотикоустойчивость. В результате такого воздействия отмечается повышение эффективности действия различных антибактериальных препаратов на биопленочные формы бактерий. Таким образом, использование ДНК матрикса, как дополнительной мишени при терапии, позволяет повысить эффективность действия различных антибиотиков на неродственные микробы, находящиеся в биопленках, снизить вероятность возникновения, распространения и сохранения устойчивости к лечебному агенту, сократить общую продолжительность терапии, уменьшить сроки пребывания больных в стационаре и снизить частоту рецидивов заболевания.

Еще одним перспективным направлением борьбы с микробными биопленками является клиническое использование бактериофагов, которые помимо непосредственного литического действия индуцируют продукцию деполимераз в микробных биопленках. Установлено, что положительный клинический результат после аэрозольного применения антисинегнойного бактериофага больным муковисцидозом связан с эффектом активной деградации экзополисахаридного компонента биопленочного матрикса, который возникает при проникновении бактериофагов во внутренние слои микробной биопленки (Azeredo et al., 2008).

В работе Carson L. et al. (2010) использованы литические бактериофаги для лечения и предотвращения образования биопленок *Proteus mirabilis* и *Escherichia coli* на урологических устройствах и катетерах у урологических больных. Наблюдалось предотвращение формирования биопленок на биоматериалах катетеров после их импрегнации с гидрогель-связанными бактериофагами. В ре-

зультате применения фагов биопленочная ассоциация была редуцирована на 3–4 lg. При этом по сравнению с необработанным контролем происходило отчетливое в 90% случаев подавление образования биопленок госпитальными штаммами *Proteus mirabilis* и *Escherichia coli*.

Для подавления формирования биопленок, образованных *S. epidermidis* в катетерах, также были использованы бактериофаги (Curtin et al., 2006). Из поисковых работ, направленных на выявление препаратов и материалов, активно ингибирующих образование биопленочных консорциумов, интерес представляет работа, согласно результатам, которой миноциклин – EDTA (M-EDTA) предотвращает микробную колонизацию катетеров. Работа интересна тем, что определения проводили как на свежееобразованной, так и на зрелой биопленке. Каждый из сегментов катетеров был инкубирован с различными дозами следующих растворов – стрептокиназой, гепарином, ванкомицином, ванкомицином-гепарином, EDTA, M-EDTA. Эффект редукции колонизации *S. epidermidis*, *S. aureus* или *Candida albicans* раствором M-EDTA оказался в значительной степени более выраженным в сравнении с прочими препаратами. Важно отметить, что эффект подавления наблюдался в отношении как свежей, так и зрелой биопленки (Raad et al., 2003).

Новый способ борьбы с биопленками условно-патогенной микрофлоры, в частности образованных *P. aeruginosa*, демонстрирует возможность фотодинамической эрадикации планктонных и биопленочных культур. Этот способ называют фотодинамической дезинфекцией возбудителей бактериальных инфекций. *P. aeruginosa* – является проблемным оппортунистическим патогеном с множественной антибиотикорезистентностью для хирургических стационаров и способностью продуцировать защитный биопленочный матрикс. В экспериментах *in vitro* осуществлена экспозиция планктонных клеток с фотосенсибилизатором, связанным с метиленовым синим. Результаты исследования (Street et al., 2009) показали, что облучение планктонных клеток с фотосенсибилизатором при использовании 670 нм нетермального диодного лазера, проводимое в условиях однократной экспозиции, определяло эффект 100% эрадикации микрофлоры. В настоящее

время разрабатываются другие новые подходы к преодолению толерантности микробов в биопленках путем поиска различных препаратов, а также сочетаний антибиотиков, способных проникать через матрикса биопленки, растворять его или воздействовать другими путями, способными предупреждать развитие микробных биопленок (Караев и др., 2010; Голуб, 2011; Balestrino et al., 2009). В эксперименте получена дезорганизация биопленок *Staphylococcus aureus* и *CNS* метаболитами лактобацилл (Бондаренко и др., 2010). Комбинация ципрофлоксацина или линезолида с рифампицином оказывает подавляющий эффект *in vitro* на биопленку, образованную *E. faecalis*. Предлагается рассматривать данную комбинацию для применения у людей с ранней инфекцией протеза, вызванной этим микробом (Holmberg et al., 2012).

Способом улучшения проникновения в микробную биопленку антимикробных препаратов может являться и совершенствование форм их доставки (Smith, 2005). Установлено, что липосомальный комплекс амфотерицина В обладает выраженной активностью по отношению к резистентным биопленкам, продуцируемым *Candida spp.*, что позволяет использовать его при инвазивных системных микозах (Честнова и др., 2009; Иванова и др., 2010).

Многие из известных способов борьбы с биопленками непригодны для применения в медицине, так как могут нанести вред медицинским устройствам или непосредственно организму больного. Однако поиск продолжается, и несколько вариантов могут послужить базой для дальнейших исследований. Blenkinsopp et al (1992) показал, что электрические поля низкого напряжения увеличивали эффективность нескольких коммерческих биоцидов так, что они воздействовали на микроорганизмы даже при концентрациях существенно более низких, чем минимально необходимые для планктонных клеток. В работе Huang et al (1998) показано, что обработка ультразвуком удаляет до 95 % *Pseudomonas diminuta*, адгезированных на ультрафильтрационной мембране и продемонстрирована эффективность ультразвука против биопленки *P.aeruginosa*, адгезированной на стали, более того оказалось, что эта обработка повысила эффективность гентамицина в отношении тех же биопленок. Интересным объектом для воздействия является экзополисахаридный

матрикс как немаловажный фактор для реализации устойчивости микроорганизмов биопленок к биоцидам. Предлагаются различные способы его удаления. Например, в работе Johansen et al (1997) показано, что смесь ферментов была эффективна для подавления жизнедеятельности выращенных *in vitro* биопленок некоторых микроорганизмов. Состав внеклеточного полимерного матрикса биопленок может быть весьма вариабельным, однако предлагается идентифицировать полисахариды для определенных организмов в биопленке и воздействовать на нее ферментами, избирательно разрушающими определенные полисахариды.

Было показано, что альгинатная лиаза способствует более эффективной диффузии гентамицина и тобрамицина через альгинатный полисахарид биопленки *P.aeruginosa*. (O'Toole et al, 2000). Ряд других авторов в качестве объекта воздействия рассматривают некоторые специфические для биопленок сигнальные молекулы (ацил-гомосериновые лактоны) (Conlon, 2002; Dong et al, 2008). Предполагают, что новые виды обработки могли бы базироваться на разрушении этих систем коммуникации между бактериями в биопленках (Miller et al, 2001; Haugo et al, 2002), однако конкретных решений пока не найдено.

Используя данные о том, что молодые биопленки более восприимчивы к антибактериальным агентам, чем старые, предлагается развивать новые неинвазивные методы диагностики по раннему (доклиническому) обнаружению биопленок во внутренней среде. В свою очередь, это даст возможность более эффективно воздействовать на молодые биопленки. Большое количество лабораторий в настоящее время пытается выявить гены, которые экспрессируются или наоборот репрессированы во время начального формирования биопленки (Duan, 2003; Harriott et al, 2010), что также может служить отправной точкой для появления диагностических тестов или выработки стратегии подавления биопленок на генном уровне. Реально в медицине только начинают понимать значение микробных сообществ, организованных в биопленки. Очевидно, что бактериальные клетки могут объединяться в специфические дифференцированные трехмерные структуры, показывая слаженное поведение, что радикально меняет представления, господствовавшие в медицинской микробиологии. Только на начальном этапе находится

процесс создания реалистичных моделей естественных микробных сообществ в лабораторных условиях (Сидеренко, 2001; Miller et al, 2001).

На данный момент наиболее перспективными представляются следующие направления борьбы с биопленками:

- предотвращение первичного инфицирования имплантата,
- минимизация начальной адгезии микробных клеток,
- разработка методов проникновения через матрикс биопленки различных биоцидов с целью подавления активности связанных биопленкой клеток
- разрушение матрикса

1.4 Проблемы контаминации продуктов питания условно-патогенными и фитопатогенными микроорганизмами

Пищевые продукты – это, как правило, нестерильные объекты (Ловкис и др., 2008; Петухова и др., 2008). Они содержат большое количество питательных веществ и являются благоприятной средой для существования и размножения микрофлоры. Каждый пищевой продукт включает комплекс питательных субстратов, используемый теми или иными микроорганизмами. В зависимости от потребностей развивающихся микробов и специфического состава продукта создаются условия, благоприятные для определенных групп микроорганизмов.

Микрофлора, которая содержится в продуктах, может быть специфической и неспецифической. Специфическая микрофлора состоит из тех микроорганизмов, которые обуславливают вкусовые и питательные свойства продуктов, например молочнокислые бактерии в молочнокислых продуктах и квашеных овощах.

Неспецифическая микрофлора представлена случайно попавшими в пищевые продукты микроорганизмами из внешней среды. Попадание в пищевые представители неспецифической микрофлоры, например, стафилококков, сальмонелл, а также накопление их метаболитов приводит к возникновению у человека пищевых токсикоинфекций и токсикозов (Нетребенко, Назарова, 1999). Пищевые продукты могут быть факторами передачи возбудителей кишечных ин-

фекций: брюшного тифа и паратифов, дизентерии, холеры, а также бруцеллеза, туберкулеза и других инфекционных заболеваний (Блэкберн, 2008; Роева, 2008; Леонтьев и др., 2013).

В продуктах животного происхождения возможно присутствие различных микроорганизмов, из которых санитарно-эпидемиологическое значение имеют патогенные для человека бактерии: *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella choleraesuis*. В последние годы особый интерес вызывают сапрофитные и условно-патогенные микроорганизмы, способные размножаться в пищевых продуктах и при определенных условиях вызывать развитие инфекционного процесса (Люпье, 2001).

Установлено, что в зависимости от пищевого продукта происходит заражение определенными возбудителями. Так, например, мясо и изделия из него могут быть причиной разнообразных пищевых токсикоинфекций, окорока и колбасы являются благоприятной средой для накопления ботулинического токсина, изделия из фарша, студни могут вызвать заболевания, обусловленные сальмонеллами, шигеллами, патогенными эшерихиями, энтерококками, протеом, энтеротоксигенными стафилококками, клостридиями и бациллами.

Употребление некачественного молока часто вызывает токсикоинфекции, обусловленные наличием сальмонелл, шигелл, энтерококков, стафилококков. Молоко и молочные продукты могут стать источниками заражения бруцеллезом, туберкулезом, дизентерией, ящуром.

С рыбой и водными обитателями могут быть связаны пищевые отравления, вызванные сальмонеллами, протеом, бациллами и, особенно часто, клостридиями и паразитическими вибрионами, которые инфицируют рыбу прижизненно.

При эндогенном заражении из яиц выделяют сальмонеллы, стафилококки, кишечные палочки, протеи, псевдомонады. Особенно опасны в этом отношении яйца водоплавающих птиц.

Кроме возможного присутствия микроорганизмов в пищевых продуктах, их экзогенное инфицирование возможно на различных технологических этапах производства. Поэтому при обследовании пищевых предприятий производят бакте-

риологическое исследование продукта по ходу технологического процесса, начиная с сырья и заканчивая готовым изделием. Одновременно осуществляют контроль санитарного режима производства и санитарного состояния оборудования, инвентаря, рабочих мест и рук персонала методом смывов.

Для обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов в Российской Федерации принят ряд законодательных и нормативных документов: Федеральный закон «О качестве и безопасности пищевых продуктов» (1999), Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (2004), Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.3.2.1078-01 «Продовольственное сырье и пищевые продукты, гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов».

Микроорганизмы являются постоянными спутниками не только человека и животных, но и высших растений (Желдакова и др., 2006). Микроорганизмы поселяются и ведут активный образ жизни, как на поверхности, так и внутри зеленых частей растений, их корней, семян, плодов (Мелентьев, 2007; Голованова и др., 2010). Все микроорганизмы, населяющие растения, можно разделить на две группы:

- 1 – представители нормальной микрофлоры растений;
- 2 – фитопатогенные микроорганизмы – возбудители заболеваний растений.

Фитопатогенные бактерии, попадая на растение различными путями (через почву, воду, воздух, зараженные семена, остатки растений, через насекомых, червей, а затем через устьица, нектарники, небольшие повреждения) и проникая внутрь растения, вызывают их заболевания – бактериозы. Наиболее частыми возбудителями являются представители родов *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*.

Бактериозы проявляются в виде гнилей, некрозов тканей, преждевременного увядания растений, развитию опухолей на различных частях растений.

Один из основных путей распространения бактерий – посадочный материал: семенами, клубнями и др. Обычно бактерии локализуются между семенной оболочкой и эндоспермом, проникают в зародыш (*Pseudomonas syringae*,

Xanthomonas campestris и др.). Фитопатогенные бактерии способны сохраняться в почве, семенах и на растительных остатках. При сохранении фитопатогенных бактерий на поверхности растений или в их тканях, говорят о поверхностной контаминации. В период заражения большинство фитопатогенных бактерий нуждается в повышенной влажности (от 50 до 100 %).

Среди возбудителей болезней растений помимо бактерий определенную роль играют вирусы (например, возбудители мозаичной болезни табака) и грибы (способны вызывать пищевые отравления – микотоксикозы).

Бактериальные, грибковые и вирусные заболевания растений наносят значительный ущерб сельскохозяйственному производству. Фитопатогенные микроорганизмы синтезируют фитотоксины, способные подавлять или задерживать рост растений, а иногда и вовсе приводить к их гибели; могут накапливаться и в плодах (Дунаевский, 2005; Siddiqui, 2005).

С целью борьбы с возбудителями болезней растений в настоящее время большое внимание уделяют биологической защите растений: появляются новые перспективные организмы для биологического контроля фитопатогенов (Штерншис, 2004; Минаева и др., 2008).

Основные меры профилактики распространения фитопатогенных микроорганизмов заключаются в дезинфекции семян и посадочного материала, дезинфекции почвы, опрыскивании растений химическими веществами, уничтожении растительных остатков, переносчиков возбудителей, удалении больных растений и изоляции здоровых. Однако, много нерешенных вопросов остается по методам обработки плодов и семян, как продуктов питания, при длительном хранении с целью профилактики развития фитопатогенов.

1.5 Перспективы использования полимерных соединений в медико-биологической и ветеринарной практике

В связи с быстрой адаптацией микроорганизмов к современным антимикробным препаратам, связанных с природной и приобретенной устойчивостью, а

также высокая частота осложнений, возникающих со стороны макроорганизма при приеме антибиотиков и химиотерапевтических средств, существует необходимость поиска принципиально новых соединений, сочетающих в себе высокую антимикробную активность и безопасное использование.

Наиболее актуальными направлениями при создании новых антимикробных средств являются не только повышение антимикробной активности, но и увеличение длительности и спектра их антимикробного, снижение токсичности, аллергенности и экологическая безопасность.

Использование полимерных соединений, характеризующихся антимикробной активностью, является одним из путей решения проблемы, связанной с распространением резистентности микроорганизмов к действию существующих лекарственных препаратов. Это позволяет повысить локальную концентрацию и устойчивость действующего вещества к ферментам бактерий и грибов, а также снизить его токсичность и увеличить длительность действия. С целью повышения биодоступности и стабильности создаются аналоги химиотерапевтических препаратов ряда нитрофуранов: 5-нитрофурфурилиден- и 3-(5-нитро-2-фурил) -2-пропенилиденгидразидов сульфатированной, карбоксиметилированной и исходной альгиновой кислот (Серебренникова и др., 2013).

Одним из основных ограничивающих факторов использования антибиотиков, относящихся к аминогликозидам, обладающих широким спектром антимикробного действия, является их высокая нефро-, ото- и нейротоксичность (Падейская, 2006). В исследованиях ряда авторов показано снижение токсических свойств данной группы препаратов путем их модификации с использованием полимерных соединений без потери выраженности антимикробного действия (Панарин и др., 2014; Monfardini et al., 1998; Shtilman, 2009). Результаты проведенных исследований (Соловский и др., 2010) позволяют регулировать антибактериальную активность и токсичность полимерных комплексов ионогенных антимикробных веществ и расширяют возможность безопасного использования этих антибиотиков в клинике.

В работе М.В. Соловского с соавт. (2011) показано, что полученные водорастворимые полимерные производные (эферы) антибиотика цефалоспоринового ряда цефуроксима являются антибактериальными препаратами пролонгированного действия.

Для расширения спектра антимикробного действия препаратов были созданы комплексы сульфосодержащих полимеров (поли-2-акриламидо-2-метилпропансульфокислота) с гентамицином, которые, сохраняя антибактериальную активность, подавляли размножение вирусов гриппа А (H_3N_2) и герпеса HSV1 (Еропкин и др., 2009).

Модификацией полимером 2-аминоэтилметакрилатом антибиотика доксициклина были получены его полимерные кетиминовые производные, что привело к снижению гепатотоксичности исходного препарата и появлению полифункциональных свойств, а виде антимикробной и иммуносупрессорной активности, что может быть использовано при трансплантации органов и тканей осложнённых бактериальной инфекцией (Смирнова и др., 2011; Полимерные кетиминовые производные ..., 2014; Smirnova et al., 2011).

Биологически активные полимеры должны удовлетворять ряду требований (Афиногенов и др., 1993):

- 1) хорошо растворяться в воде и солевых растворах;
- 2) быть биосовместимыми, не обладать высокой токсичностью, не подавлять иммунную систему;
- 3) иметь небольшую скорость выведения и выводиться из организма после выполнения своей функции;

Все это накладывает определенные требования к их структуре, молекулярной массе и молекулярно-массовому распределению.

Клеточные стенки различных микроорганизмов отличаются по строению и поэтому избирательно взаимодействуют с антимикробными веществами, а также обладают неодинаковой устойчивостью к воздействию химических соединений разных классов (Афиногенов и др., 1993). Так, для катионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) мишенями являются карбоксильные группы аминокис-

лот и кислых полисахаридов бактерий, а для анионных ПАВ – кетонные группы белков, аминогруппы соответствующих углеводов и липидов, а также фосфатные группы тейхоевых кислот.

В естественных условиях микробные клетки обладают общим отрицательным зарядом, поэтому наиболее широкое практическое применение нашли катионные ПАВ, которые губительно действуют на грамположительные и грамотрицательные бактерии, дрожжевые и нитчатые грибы. В клетке также имеются молекулы, несущие положительные заряды, поэтому и анионные ПАВ губительно действуют на микроорганизмы, но при более высоких концентрациях.

Имеются различия и в действии ПАВ на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы, а также на прокариотические и эукариотические клетки. Это связано с особенностями структурно-химической организации стенок и мембран клетки, а также ее цитоплазматического содержимого.

Известно, что соединения, содержащие в своем составе гуанидиновую группу, обладают широким спектром бактерицидного действия и используются в качестве лечебных препаратов и фунгицидов, поэтому присутствие в элементарном звене полимеров гуанидиновой группы должно придавать им высокую биоцидную активность (Федорова, 2000).

В настоящее время механизм действия полигуанидинов на микроорганизмы представляют следующим образом:

- гуанидиновые поликатионы адсорбируются на отрицательно заряженной поверхности бактериальной клетки, блокируя тем самым дыхание, питание, транспорт метаболитов через клеточную стенку бактерий (этот эффект зависит от величины ионного заряда поликатиона);
- макромолекулы полигуанидинов диффундируют через клеточную стенку, вызывая необратимые структурные повреждения на уровне цитоплазматической мембраны, нуклеоида, цитоплазмы (этот процесс зависит от величины поверхностной активности, липофильности, растворимости в воде, пространственных характеристик диффундирующей частицы);

- полигуанидины связываются с кислотными фосфолипидами, белками цитоплазматической мембраны, что приводит к ее разрыву (этот эффект зависит от концентрации и молекулярной массы антисептика).

Гуанидиновые производные значительно эффективнее четвертичных аммониевых соединений, являются биоразлагаемыми, поскольку в живом организме имеются ферментные системы, способные вызывать их деградацию и предотвращая кумуляцию, не инактивируются белками, поэтому находят широкое применение в качестве физиологически активных веществ: лекарств, антисептиков, пестицидов (Гембицкий и др., 1998; Гембицкий, 2000; Кудрявцев и др., 2001; Воинцева и др., 2009). Кроме того, полигуанидины эффективнее хлоргексидин биглюконата и других низкомолекулярных катионных ПАВ и относятся к IV классу токсичности.

В работах ряда авторов показано, что полимеры с различным количеством гидроксильных групп, синтезированные на основе спиртов, фенолов и их производных обладают широким спектром антимикробного действия (Nonaka et al., 1997; Tashiro et al., 2001; Jeong et al., 2002; Lee et al., 2002).

Химической модификацией гомо- и сополимеров 4-винилбензилхлорида со стиролом синтезированы полимеры, содержащие фрагменты бензилового спирта и фенолов, которые проявили высокую противогрибковую активность в отношении тест-культур плесневых грибов (Дьякова и др., 2012).

В последние годы ведется активное изучение свойств нового полимерного соединения --полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода (Заярский, 2012). В работах О.В. Нечаевой с соавторами (2014-2015) показана антимикробная активность этого полимера в отношении референс-штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, микроскопических грибов и вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней. Оценка острой и хронической токсичности данного полимера на биотест-объектах (*Chlorella vulgaris* Beijer и *Daphnia magna* Straus) и белых лабораторных мышах позволила отнести его к малоопасным соединениям IV класса токсичности. Показана высокая бактерицидная активность ПААГ-М в отношении санитарно-показательных микроорганизмов воды

и гарантированная дезинфекция при его использовании в комбинированных фильтрующих системах очистки воды (Веденева, 2015).

Таким образом, анализ литературы показал, что для борьбы с распространением антибиотикорезистентных штаммов условно-патогенных микроорганизмов, их планктонных и биопленочных форм, актуален поиск новых биологически активных химических соединений, характеризующихся низкой токсичностью и высокой антимикробной активностью в отношении широкого спектра возбудителей заболеваний человека, животных и растений. Для обоснованного повышения эффективности разрабатываемых медицинских и ветеринарных биопрепаратов необходимо учитывать зависимость их активности от физико-химических характеристик, а также биологические особенности патогенов.

На основании данных литературы обоснована необходимость детальной характеристики свойств различных вариантов нового соединения – полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в отношении как планктонных, так и биопленочных форм условно-патогенных микроорганизмов, установление эффективности его использования в качестве антисептика и дезинфектанта. Вышеизложенное позволило сформулировать цель и задачи исследования; подобрать адекватные методические подходы.

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Экспериментальные модели

В работе использовали стандартные и клинические штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий, микроскопические грибы, характеристика которых представлена в таблицах 2.1.1 – 2.1.4.

Таблица 2.1.1 - 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 Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Коллекция кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского
<i>Fusarium tricinctum</i>	Коллекция кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского государственного университета 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 2.1.2 - Характеристика клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*

Название штамма	Дата выделения	Место получения
№ 1	2012	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2
№ 2	2012	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2
№ 3	2012	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2
№ 4	2012	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2
№ 5	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2
№ 6	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2
№ 7	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2

Продолжение таблицы 2.1.2

№ 8	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2
№ 9	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2
№ 10	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2
№ 11	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2
№ 12	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2

Таблица 2.1.3 - Характеристика клинических штаммов *Staphylococcus aureus*

Название штамма	Дата выделения	Место получения	Характеристика Штамма
№ 1	2012	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	MSSA
№ 2	2012	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	MSSA
№ 3	2012	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	MSSA
№ 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	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	MSSA
№ 8	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	MSSA
№ 9	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	MSSA
№ 10	2013	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	MSSA
№ 11	2014	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	MSSA
№ 12	2014	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 3	MSSA

Примечание: MSSA – метициллинчувствительный; MRSA – метициллинрезистентный

Таблица 2.1.4 - Характеристика клинических штаммов *Candida albicans*

Название 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

Продолжение таблицы 2.1.4

№ 4	2014	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2	am ^r flu ^r
№ 5	2014	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2	am ^s flu ^s
№ 6	2014	Коллекция бактериологической лаборатории клинической больницы № 2	am ^s flu ^s
№ 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

2.2 Химические соединения, использованные в работе

Для изучения влияния полимерного соединения на биологические свойства микроорганизмов использовали полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат ионами галогенов (ПААГ-М), его модифицированные аналоги, а также его комплексы с растительными биофлавоноидами, предоставленный ООО НПО «Альтернатива». ПААГ-М представляет собой биосовместимый полимер, относящийся к IV классу токсичности (рис. 2.2.1).

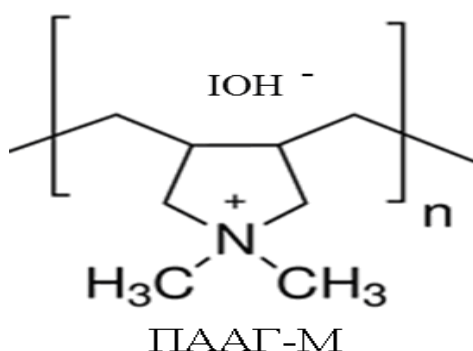


Рисунок 2.2.1 – Формула полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода

По структуре ПААГ-М является полиэлектролитом, относящимся к классу поликатионов с высокой плотностью заряда, неограниченно растворим в воде.

Полимер является хорошим пленкообразователем, при этом его поверхность имеет четкую ячеистую структуру с размером ячейки порядка 500×500 нм (рис. 2.2.2).

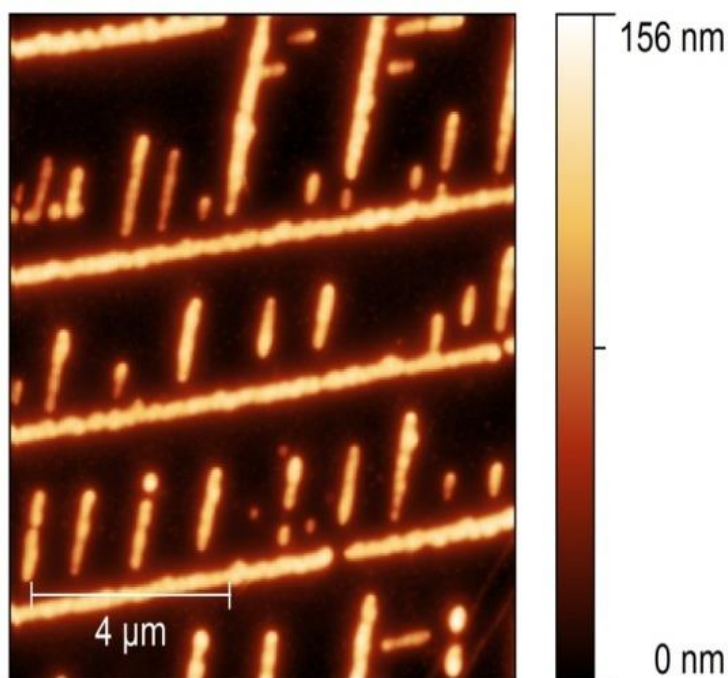


Рисунок 2.2.2 - АСМ изображение морфологии ПААГ-М

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. 2.2.1).

Таблица 2.2.1 – Модификации полимера ПААГ-М с различным содержанием гидрат-ионов йода

№ п/п	Лабораторный шифр варианта полимера	Содержание гидрат-ионов йода, мкг/мл
1.	ПААГ-М ₆	6
2.	ПААГ-М _{12,5}	12,5
3.	ПААГ-М ₂₅	25
4.	ПААГ-М ₅₀	50
5.	ПААГ-М _{0,25}	250
6.	ПААГ-М _{0,5}	500
7.	ПААГ-М ₁	1000
8.	ПААГ-М _{1,5}	1500

В исследованиях антисептической и регенеративной активности использовали препараты, содержащие нанонагрегаты флавоноидов, полученные из пчелиного воска, как в чистом виде, так и стабилизированные ПААГ-М, (Патент РФ № 2446852). По данным автора разработки исходно размеры нестабилизированных

наноагрегатов флавоноидов составляли 40 – 60 нм, однако они быстро агрегировали и образовывали структуры размером 500 – 700 нм (Заярский и др., 2012). Стабилизация наноагрегатов флавоноидов полимером проводилась путем его последовательной адсорбции на поверхности носителя. Полученные структуры сохраняли размеры 60 – 80 нм в течение длительного времени (рис. 2.2.3), что было подтверждено с помощью методов динамического рассеяния света на установке для характеристики наночастиц Marven Zetasizer Nano ZS.

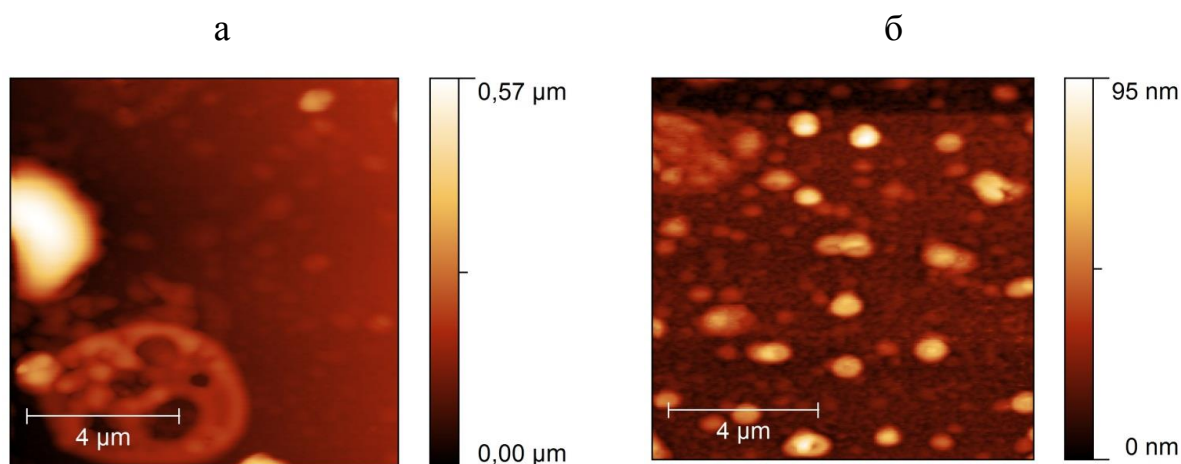


Рисунок 2.2.3 а – морфология поверхности водной дисперсии наночастиц флавоноидов, не стабилизированных ПААГ-М; б – наночастицы флавоноидов, стабилизированные ПААГ-М

Экспериментальные животные: В исследовании использовали 40 белых беспородных крыс (самок), массой 200 ± 20 г, которые содержались на стандартном рационе вивария. Все эксперименты были 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).

2.3 Методы микробиологических исследований

Биологическую активность исследуемых соединений изучали с использованием метода серийных разведений (МУК 4.2.1890-04.), с помощью которого

определяли минимальную подавляющую концентрацию (МПК) каждого препарата. Образцы исследуемых соединений разводили в стерильной дистиллированной воде до получения рабочей концентрации 2 %, а затем получали ряд двойных разведений в мясопептонном бульоне (МПБ).

Посевы бактерий инкубировали при температуре 37⁰ С в течение 24 часов. Для определения минимальной бактерицидной концентрации проводили высев 0,1 мл бульонной культуры на поверхность мясо-пептонного агара (МПА) в чашки Петри с помощью шпателя. Посевы инкубировали при температуре 37⁰ С в течение 24 часов, после чего подсчитывали количество выросших колоний (КОЕ).

Для количественного учета интенсивности пленкообразования проводили моделирование процесса в ячейках плоскодонных стерильных полистирольных 96-ти луночных планшетов. Для этого из суточных культур исследуемых микроорганизмов готовили взвесь в физиологическом растворе с оптической плотностью 0,5 по МакФарланду (Densi-La-Meter, Lachema, Чехия). Предварительно в лунки планшетов вносили по 200 мкл мясо-пептонного бульона (МПБ) и добавляли по 200 мкл взвеси суточных культур исследуемых микроорганизмов в конечной концентрации 10⁵ КОЕ/мл. В опытные лунки предварительно вносили по 50 мкл ПААГ-М в субингибирующей концентрации, которые для каждого микроорганизма были определены экспериментальным путем. Посевы инкубировали при температуре 37⁰ С в течение 24 часов.

Планктонные формы клеток удаляли путем аспирации, после чего лунки планшета аккуратно промывали и добавляли 1% водный раствор красителя кристаллического фиолетового. Через 10 минут экспозиции при комнатной температуре раствор красителя удаляли, а лунки осторожно троекратно промывали водой. Образование биопленок клиническим штаммами исследуемых микроорганизмов оценивали по величине связывания ими кристаллического фиолетового согласно стандартной методике (Тец и др., 2006). Краситель, связавшийся с биопленками, растворяли в 200 мкл ацетон-этаноловой смеси (20:80) и определяли оптическую плотность на спектрофотометре Epoch (BioTek, США) при длине волны 420 нм.

Для построения калибровочной кривой готовили контрольные образцы (0,9% раствор натрия хлорида и кристаллического фиолетового).

Адгезивную активность изучали методом В.И. Брилис с соавт. (1986), на свежих эритроцитах 0(I) Rh(+), которую оценивали с помощью иммерсионной микроскопии по индексу адгезии микроорганизма (ИАМ). Опытные образцы предварительно инкубировали с добавлением сублетальных концентраций ПААГ-М в течение 6 часов.

2.3.1 Методика формирования экспериментальной полнослойной гнойной раны

Эксперименты *in vivo* выполнены на 40 беспородных белых крысах-самках массой 200 ± 20 г. Для исследования отбирались животные без внешних признаков заболевания, прошедшие карантин в виварии СГУ. Всем животным вводили нембутал из расчета 35 мг на 1000 г массы животного и в стерильных условиях моделировали гнойную рану по методике П.И. Толстых (1976). Для этого на спине на выбритом от шерсти и обработанном антисептиком участке иссекали кожу с подкожной клетчаткой размером 15×15 мм, затем в рану вводили марлевый шарик, содержащий 1 млрд. микробных тел суточной культуры *S. aureus* 209P и рану ушивали. Через 48 ч после моделирования у всех животных формировался абсцесс со всеми характерными признаками воспаления. После снятия швов края раны разводили, марлевый тампон удаляли, эвакуировали гной. У всех животных ежедневно проводили обработку ран 3% раствором перекиси водорода. Все экспериментальные животные были разделены на 4 группы. В I контрольной группе раны лечению не подвергались. В опытных группах проводили ежедневную обработку ран: II группа – 0,05% раствором хлоргексидина; III группа – суспензией нестабилизированных наноагрегатов флавоноидов; IV группа – препаратом, содержащим структуры «ядро-оболочка» на основе наноагрегатов флавоноидов, стабилизированных ПААГ-М.

Течение раневого процесса у экспериментальных животных оценивали клиническим методом: фиксировали сроки ликвидации отека окружающих тканей, сроки очищения раны, появления грануляций, начала краевой эпителизации и полного заживления раны. Планиметрический метод исследования. Для объективной оценки скорости заживления раны использовали метод Л.Н. Поповой. На рану накладывали простерилизованный лист целлофана, на котором маркером обрисовывали ее контуры. Целлофан с полученным контуром помещали на миллиметровую бумагу и определяли площадь раны до начала лечения. Аналогичным способом проводили исследования на всех сроках лечения, вычисляя среднюю площадь ран, процент уменьшения площади раны от исходного (формула 1) и скорость заживления раны (формула 2):

$$ПУП = \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100\% \quad (1)$$

где ПУП – процент уменьшения площади, S_0 – исходная средняя площадь ран на момент измерения.

$$СЗ = \frac{ПУП_1 - ПУП_0}{T} \quad (2)$$

где СЗ – скорость заживления, $ПУП_1$ – процент уменьшения площади ран от исходной на момент измерения, $ПУП_0$ – процент уменьшения площади ран при предыдущем измерении, T – количество дней между измерениями.

2.3.2 Биохимические методы исследования

Биохимические исследования проводили на полуавтоматическом биохимическом анализаторе BS 3000 P Sinnova (КНР) и на спектрофотометре Multiskan Spectrum (Финляндия). Определяли показатели белкового, углеводного, липидного обменов, активность ключевых ферментов, а также содержание кальция и железа.

Для *определения концентрации глюкозы* в крови использовали унифицированный глюкозооксидазный метод (Asp, 1967; Гавриш, 2003).

Для *определения концентрации общего белка* в плазме крови использовали модифицированный турбодиметрический метод с осаждением белка сульфосалициловой кислотой и биуретовый метод (Ахмина, 2000).

Концентрация альбумина определяли фотометрическим методом по конечной точке (Волков и др., 2006).

Концентрацию мочевины определяли ферментативным методом (Орехов, 2008).

Концентрацию креатинина определяли кинетическим методом, основанным на реакции Яффе, без депротеинизации (Базарный, 1999).

Содержание мочевой кислоты определяли уриказным методом (Волкова, 2006).

Для *определения концентрации холестерина* использовали ферментативный колориметрический метод Триндера (Краснов и др., 2005).

Концентрацию холестерина - ЛПВП определяли седиментационным методом (Лиходед и др., 1996). Липопротеиды низкой и очень низкой плотности осаждали из сыворотки крови при добавлении к образцу фосфовольфрамата магния (Дыкман и др., 2008). После центрифугирования (3000 g, 10 мин) в супернатанте остаются липопротеиды только высокой плотности; их концентрация определяется так же, как концентрация общего холестерина. Рассчитывали индекс атерогенности ИА по формуле 3:

$$IA = \frac{[OХс] - [Хс - ЛПВП]}{[Хс - ЛПВП]} \quad (3)$$

где [ОХс] – концентрация общего холестерина, [Хс-ЛПВП] – концентрация холестерина-ЛПВП (Дыкман и др., 2008).

Количество липопротеидов низкой плотности рассчитывалось по формуле 4:

$$[Хс - ЛПНП] = [OХс] - [Хс - ЛПВП] - [Хс - ЛПОНП] \quad (4)$$

где [ОХс] – концентрация общего холестерина, [Хс-ЛПВП] – концентрация холестерина-ЛПВП, [Хс-ЛПОНП] – концентрация холестерина-ЛПОНП (Голиков, 1988).

Количество липопротеидов очень низкой плотности рассчитывалось по формуле 5:

$$[Xc - ЛПОНП] = \frac{[ТГ]}{2,18} \quad (5)$$

где [ТГ] – концентрация общих триглицеридов.

Для *определения концентрации триглицеридов* использовали энзиматический колориметрический метод МакГовена (Демин, 2000; Артемов, 2006).

Для *определения активности аланинаминотрансферазы (АЛТ)* использовали кинетический спектрофотометрический метод без применения 5-фосфопиридоксаля (Волкова, 2006).

Для *определения активности аспаратаминотрансферазы (АСТ)* использовали кинетический спектрофотометрический метод без применения пиридоксальфосфата (Раби, 1974).

Для *определения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ)* использовали оптический тест Варбурга, основанный на реакции восстановления пирувата в лактат (Alving, 1993) в модификации Малинина М.Л. (2009).

Для *определения активности креатинкиназы (КК)* использовался ферментативный кинетический метод с модификациями (Бубнова и др., 1999; Муравлева и др., 2001; Ласкавый и др., 2007; Миронов, 2011).

Для *определения активности щелочной фосфатазы (ЩФ)* использовали кинетический метод по двум точкам с использованием α -нафтил-фосфата в качестве субстрата (Маянский, 1989).

Для *определения активности кислой фосфатазы (КФ)* использовался метод количественного определения в сыворотке крови (Фрейдлин и др., 1999;).

Для *определения содержания неорганического фосфора (НФ)* использовали метод количественного определения в сыворотке крови (Волкова, 2006).

Для *определения содержания ионизированного кальция (ИК)* использовали метод количественного определения в сыворотке крови (Волкова, 2006).

2.3.3 Методы статистической обработки экспериментальных данных

Все результаты, полученные при проведении исследований, обработаны методами вариационной статистики с определением средних арифметических величин (M) и средней ошибки средней арифметической (m) по формуле Петерса с использованием константы Молденгауэра (k):

$$m = \pm \sum a \times k \quad (6)$$

где a – отклонение вариантов от средней арифметической, k – константа Молденгауэра (Ашмарин, Воробьев, 1986).

Определяли доверительные интервалы (I) и сравнивали средние данные с помощью критерия Стьюдента (t) при уровне статистической значимости различий (P) не более 0,05. При применении данного метода варьирование показателей в каждом ряду не оказывает значительного влияния на конечные результаты и тем самым достигается независимость показателей от индивидуальных различий.

Расчет результатов осуществляли 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). Компьютерное моделирование велось с помощью пакета программ Matlab 6.5. Статистические результаты считались достоверными при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИАЗОЛИДИНАММОНИЯ, МОДИФИЦИРОВАННОГО ГИДРАТ-ИОНАМИ ЙОДА, В ОТНОШЕНИИ ПЛАНКТОННЫХ ФОРМ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

3.1 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 3.1.1. 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.

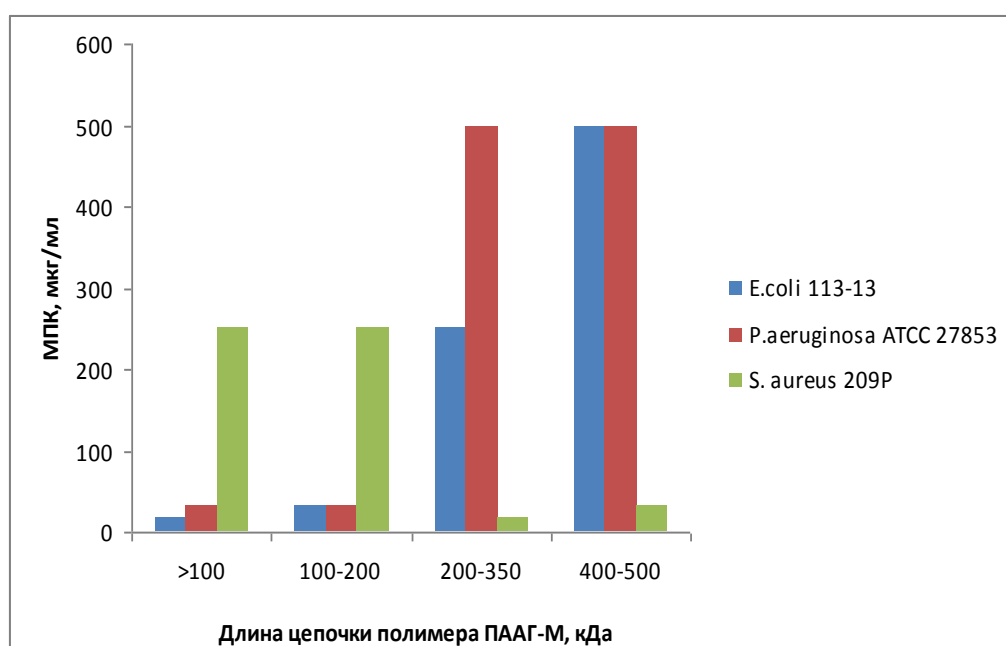


Рисунок 3.1.1 – Зависимость биологической активности ПААГ-М от длины полимерной цепи

Стандартные штаммы грамположительных бактерий проявили 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.

Полученные результаты согласуются с данными, представленными в работах (Куликов и др., 2012; Соболева и др., 2014; Chung et al., 2008). Первым барьером на пути взаимодействия микроорганизмов с антимикробными соединениями являются клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана, которые обеспечивают осмотический барьер и избирательное проникновение веществ в клетку.

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 химических соединений только с определенной молекулярной массой и пространственной организацией (Бут, 2005).

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.

Эффективность действия различных антимикробных средств на микроорганизмы зависит от их способности изменять проницаемость клеточной стенки и проникать внутрь клетки. Поэтому наибольший интерес представляют препараты, увеличивающие пассивный транспорт и проницаемость мембран. 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-иона йода в составе полимера приводило к повышению эффективности антимикробного действия всех вариантов ПААГ-М, что выразилось в снижении показателей МПК. Однако общая тенденция избирательного характера действия на грамположительные и грамотрицательные бак-

терии в зависимости от величины молекулярной массы сохранялась для всех вариантов полимера (рис. 3.1.2).

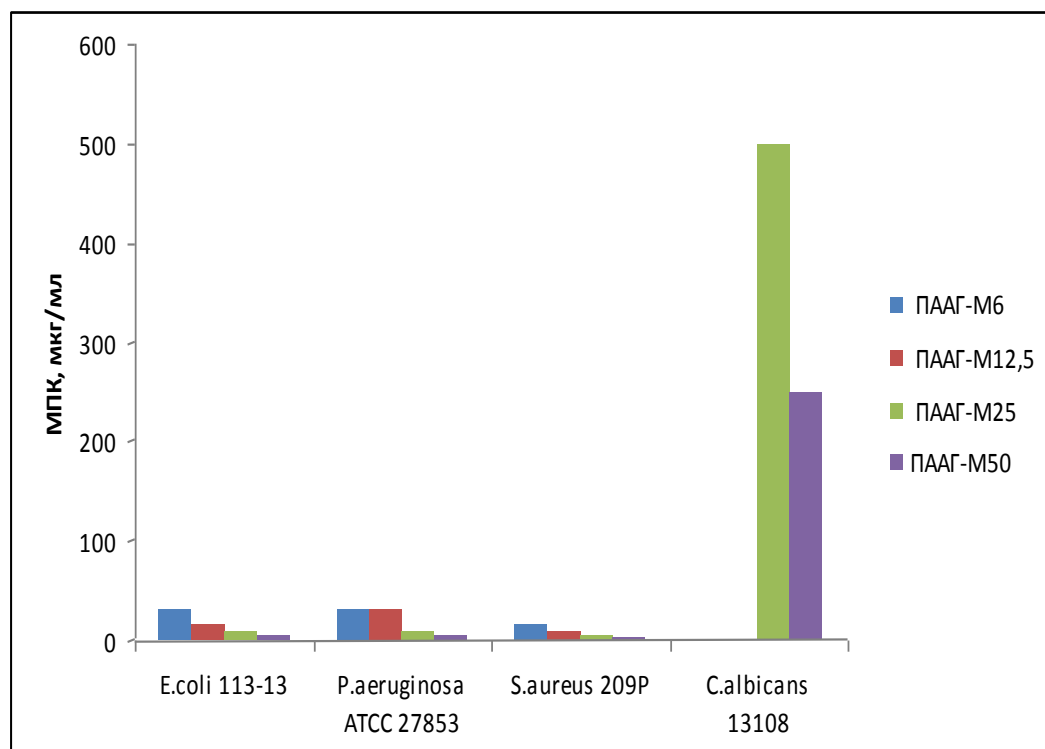


Рисунок 3.1.2 – Зависимость антимикробной активности ПААГ-М от концентрации гидрат-ионов йода

Наименьшая эффективность полимерного соединения ПААГ-М была отмечена в отношении стандартного штамма микроскопических грибов *C.aldicans* 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.

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.aldicans* 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.

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

В ходе работы была проведена оценка чувствительности исследуемых штаммов микроскопических грибов к широко используемым противогрибковым препаратам флуконазолу и к амфотерицину В, согласно общепринятой методике (Саттон, 2001). Полученные результаты представлены в таблице 3.2.1.

Таблица 3.2.1 – Отношение исследуемых штаммов *C.albicans* к антимикротическим препаратам

Исследуемый штамм	Отношение к флуконазолу и амфотерицину В*
<i>C.albicans</i> № 1	am ^s flu ^s
<i>C.albicans</i> №2	am ^r flu ^r
<i>C.albicans</i> №3	am ^s flu ^s
<i>C.albicans</i> №4	am ^r flu ^r
<i>C.albicans</i> №5	am ^s flu ^s
<i>C.albicans</i> №6	am ^s flu ^s
<i>C.albicans</i> №7	am ^s flu ^s
<i>C.albicans</i> №8	am ^r flu ^r
<i>C.albicans</i> №9	am ^s flu ^s
<i>C.albicans</i> №10	am ^r flu ^r

«am^sflu^s» – штамм, чувствительный к амфотерицину В (МПК ≤ 1 мкг/мл) и флуконазолу (МПК ≤ 32 мкг/мл), «am^rflu^r» – штамм, устойчивый к амфотерицину В (МПК ≥ 2 мкг/мл) и флуконазолу (МПК ≥ 64 мкг/мл).

Установлено, что 60% штаммов (*C.albicans* №№ 1, 3, 5, 6, 7, 9) чувствительно как к флуконазолу, так и к амфотерицину В. Остальные штаммы (*C.albicans* №№ 2, 4, 8, 10) были устойчивы к обоим препаратам.

Поскольку наименьшая чувствительность к ПААГ-М была отмечена в отношении клеток микроскопических грибов, представляло интерес подобрать оп-

тимальный вариант полимера, характеризующегося противогрибковой активностью в отношении клинических штаммов *C. albicans*.

Для повышения эффективности препарата было проведено насыщение исходного полимерного соединения гидрат-ионами йода и определена их антимикробная активность. Полученные результаты представлены на рисунке 3.2.1.

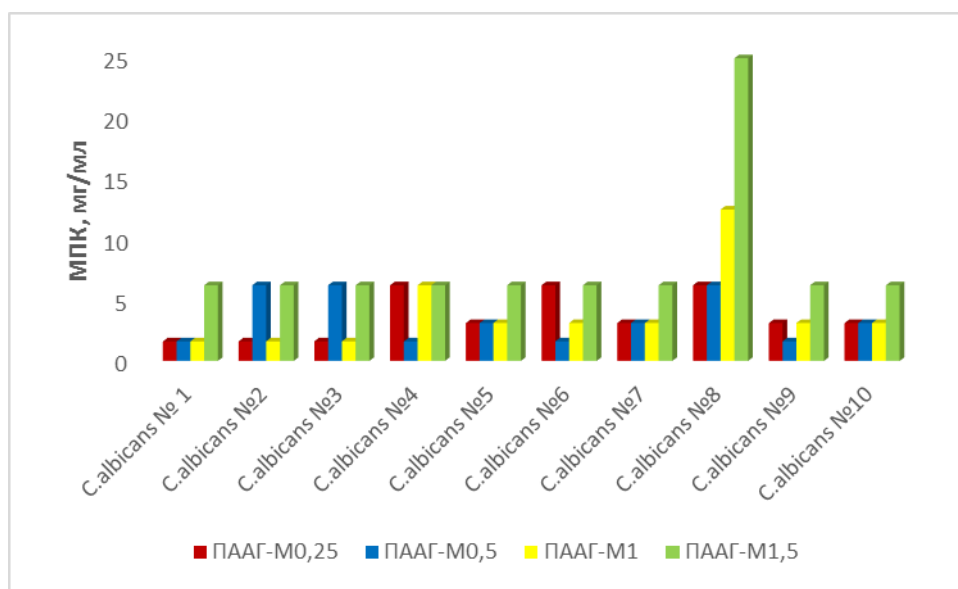


Рисунок 3.2.1 – Противогрибковая активность модификаций полимерного соединения в отношении клинических штаммов *C. albicans*

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. 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 ак-

тивность 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 азолы и амфотерицин действуют на цитоплазматическую мембрану грибов. Азолы ингибируют зависимый от цитохрома Р-450 фермент – 14 α -деметилазу, имеющий важное значение в синтезе мембранного липида – эргостерола, что ведет к нарушению деления и разрушению грибковой клетки, а амфотерицин непосредственно связывается с эргостеролом цитоплазматической мембраны, нарушая, таким образом, ее барьерную функцию и способствуя образованию пор (Сергеев, 2004; Зырянов, 2005). Известно, что с S-Н-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 (Пхакадзе, 2002).

3.3 Влияние полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, на адгезивные свойства *Candida albicans*

Адгезия микроорганизмов является первым 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 изучить влияние сублетальных концентраций ПААГ-М, на адгезивные свойства стандартного и клинических штаммов *Candida albicans* (рис.3.3.1).

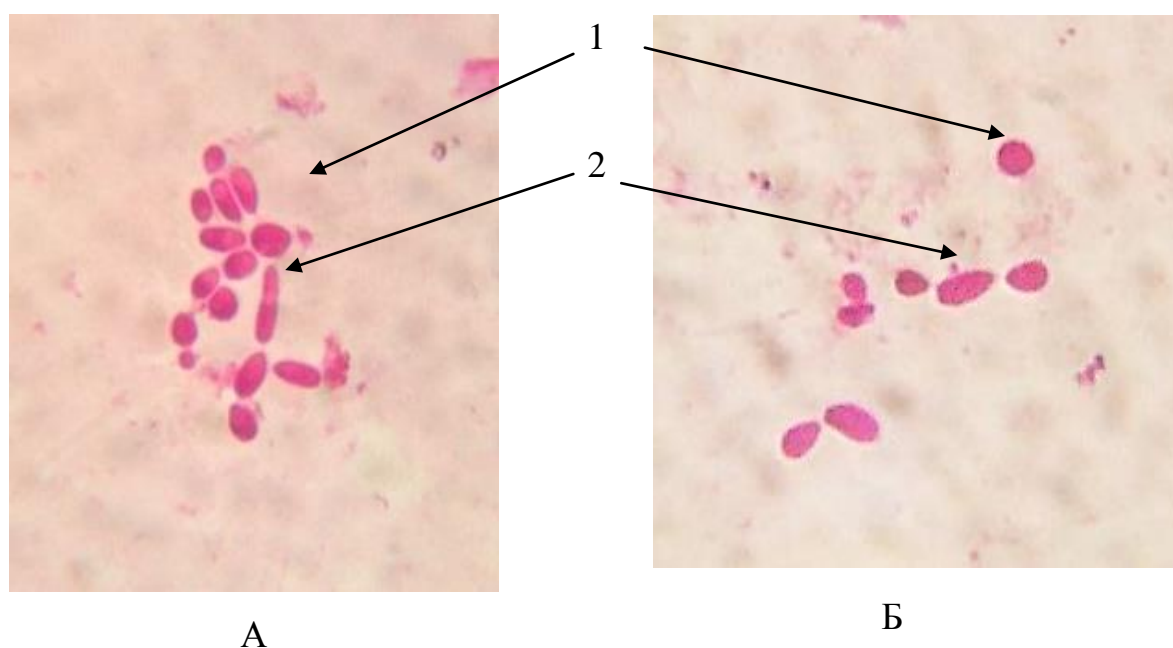
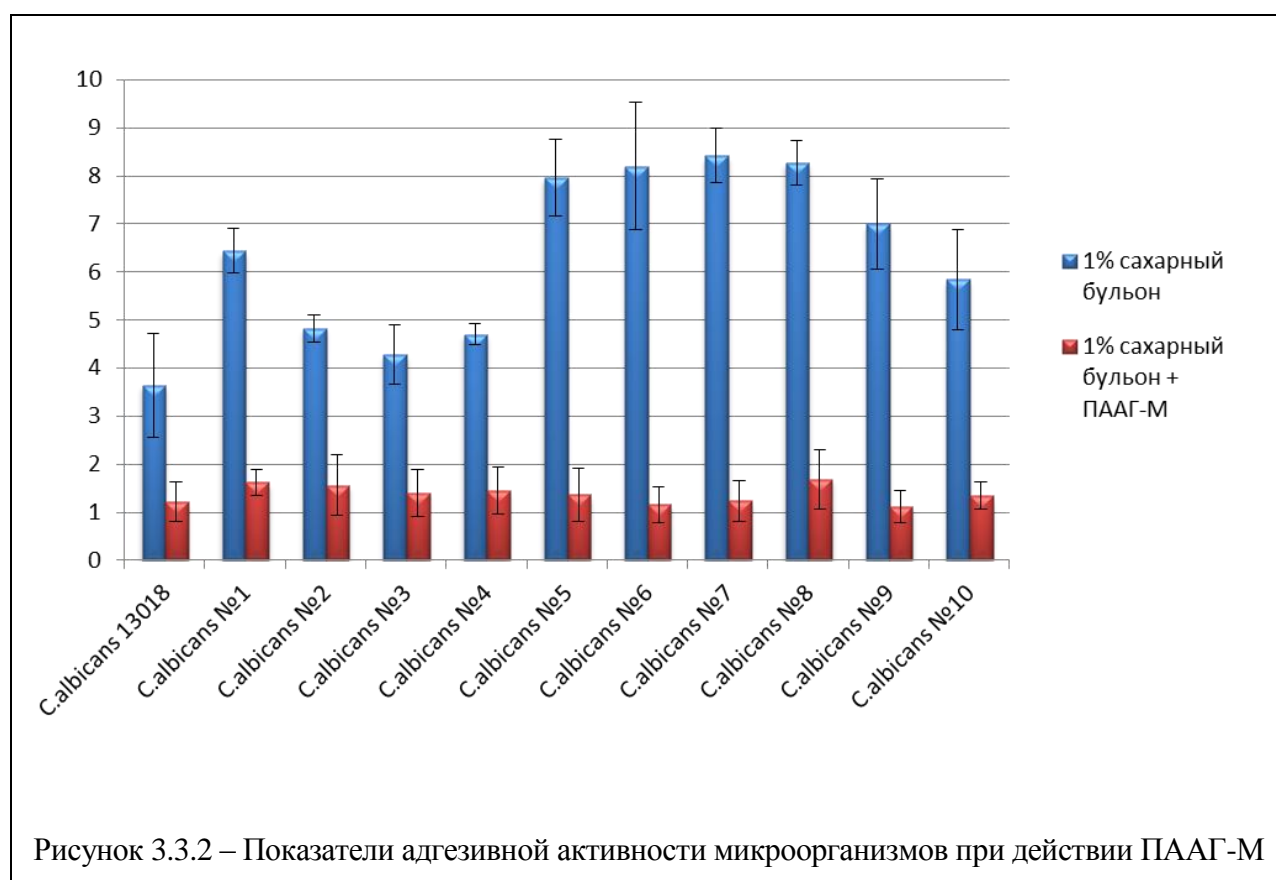


Рисунок 3.3.1 – Адгезия *Candida albicans* на эритроците: А – до обработки ПААГ-М, Б – после обработки ПААГ-М (1 – эритроцит, 2 – клетки *Candida albicans*)

Оценку адгезивных свойств микроскопических грибов проводили по показателю индекса адгезии микроорганизма (ИАМ). В зависимости от ИАМ все микроорганизмы можно разделить на 4 группы:

- неадгезивные, если ИАМ от 1,00 до 1,75;
- низкоадгезивные, если ИАМ от 1,76 до 2,49;
- среднеадгезивные, если ИАМ от 2,50 до 3,99;
- высокоадгезивные, если ИАМ > 4,00.

Полученные результаты представлены на рисунке 3.3.2



Было установлено, что исходно по показателям ИАМ стандартный штамм *C. albicans* 13108 характеризовался как среднеадгезивный, а все клинические штаммы – как высокоадгезивные. Обработка клеток ПААГ-М приводила к снижению адгезивных свойств стандартного и клинических штаммов *C. albicans* до неадгезивного уровня. Вероятно, это связано с влиянием ПААГ-М на их клеточ-

ную стенку и блокировкой гликопротеиновых фибрилл, обеспечивающих процесс неспецифической адгезии.

Таким образом, полученные результаты открывают перспективы использования полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, для обработки изделий медицинского назначения с целью снижения адгезивных свойств микроорганизмов, нарушая тем самым процесс формирования микробных биопленок.

ГЛАВА 4 ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК СТАНДАРТНЫМИ И КЛИНИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ И ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ ПОЛИАЗОЛИДИНАММОНИЯ, МОДИФИЦИРОВАННОГО ГИДРАТ-ИОНАМИ ЙОДА, НА ПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ

4.1 Динамика формирования *in vitro* микробных биопленок

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 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. 4.1.1). На 2-е и 3-и сутки культивирования биопленок достоверных различий в интенсивности связывания красителя микробной биопленкой выявлено не было ($p > 0,05$).

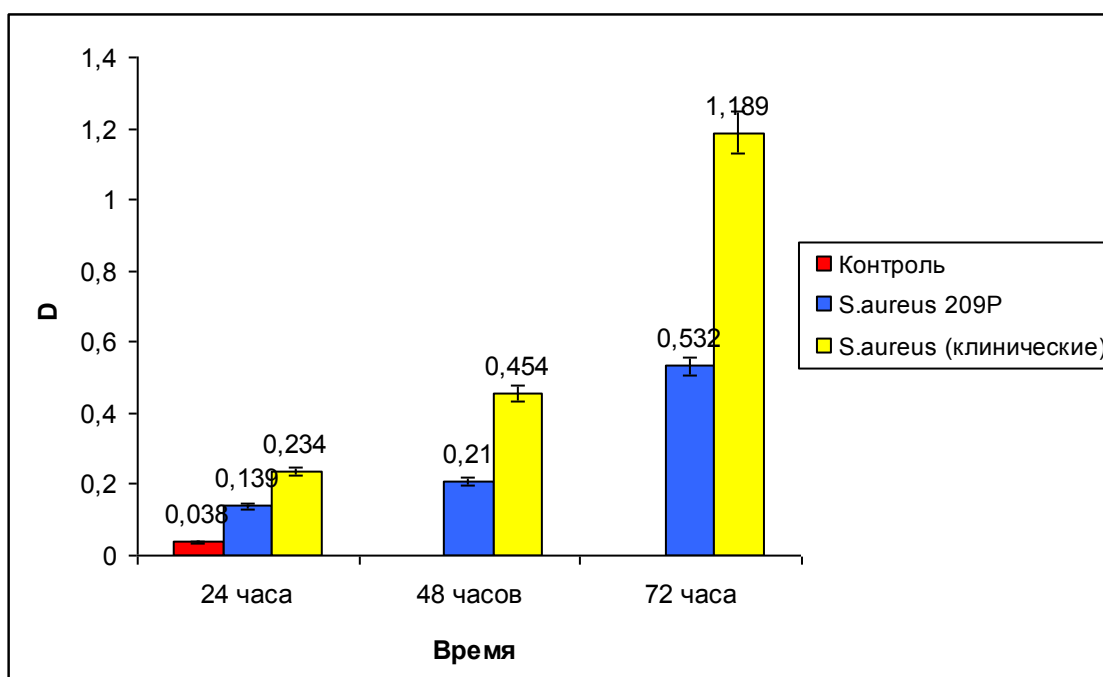


Рисунок 4.1.1 – Динамика величин связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками, образованными стандартным и клиническими штаммами *S. aureus* ($n=12$)

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 ($p < 0,001$).

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. 4.1.2).

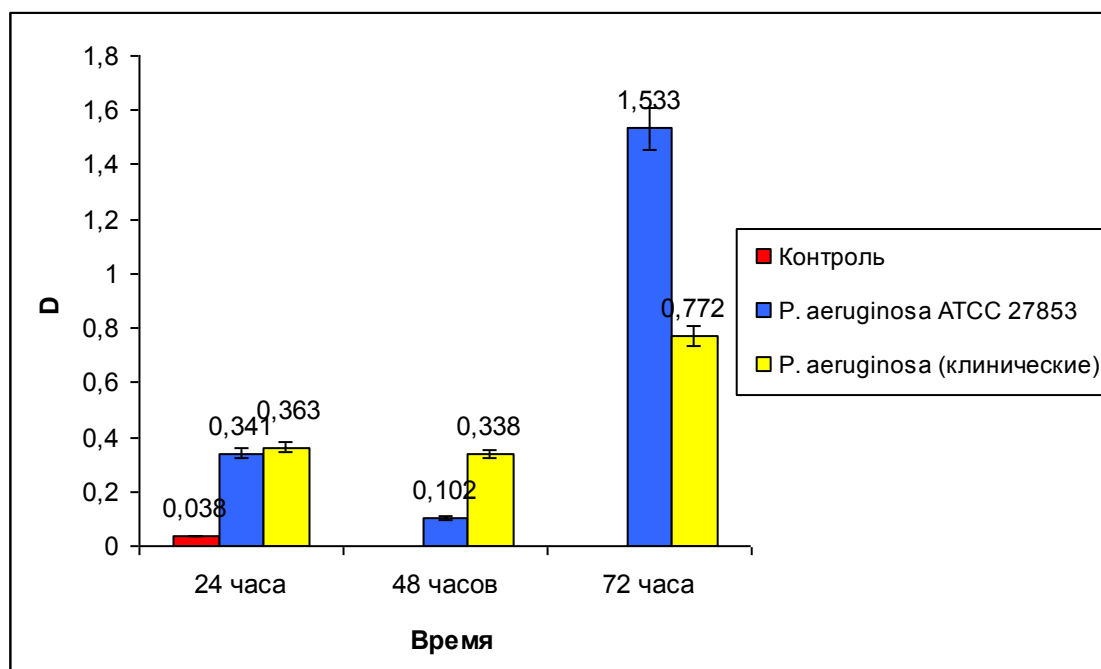


Рисунок 4.1.2 – Динамика величин связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками, образованными стандартным и клиническими штаммами *P. aeruginosa* ($n=12$)

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 ($p < 0,001$).

При культивировании биопленок клинических штаммов *C. albicans* через 24 часа отмечалось увеличение связывания кристаллического фиолетового в 16,55 раза по сравнению с контрольными значениями ($p_1 < 0,01$) (рис.4.1.3). 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 ($p_3 < 0,01$).

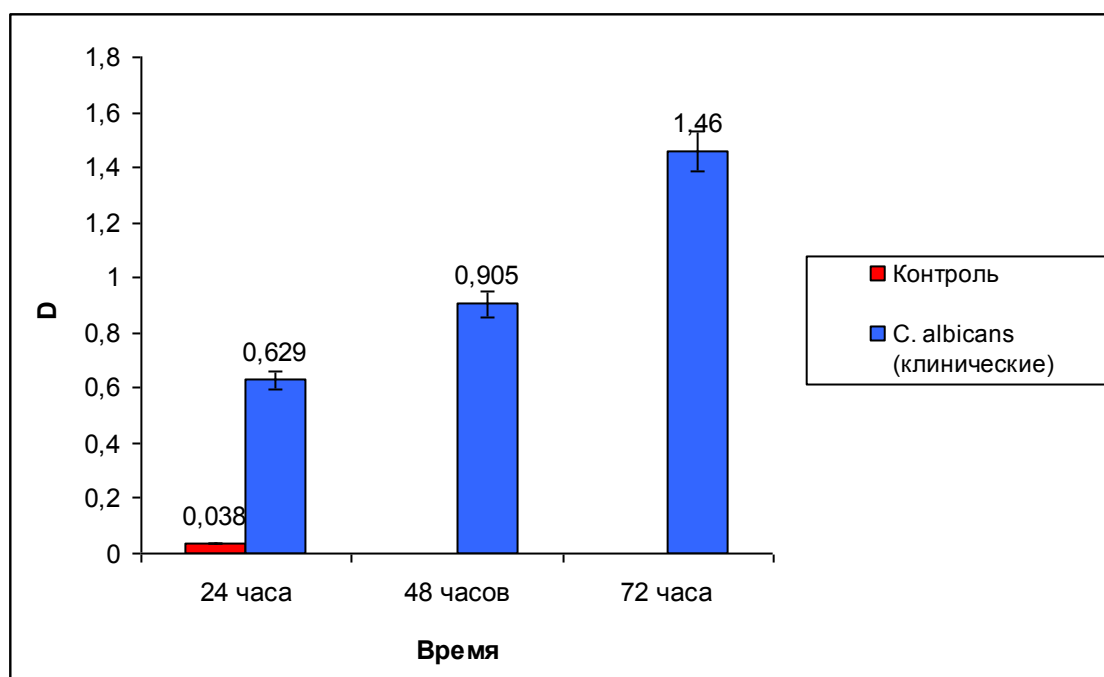


Рисунок 4.1.3 – Динамика величин связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками, образованными клиническими штаммами *C. albicans* (n=12)

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. 4.1.4). На вторые сутки культивирования биопленки происходило увеличение интенсивности связывания кристаллического фиолетового в 1,92 раза, на третьи – в 1,77 раза по сравнению с предыдущими сутками.

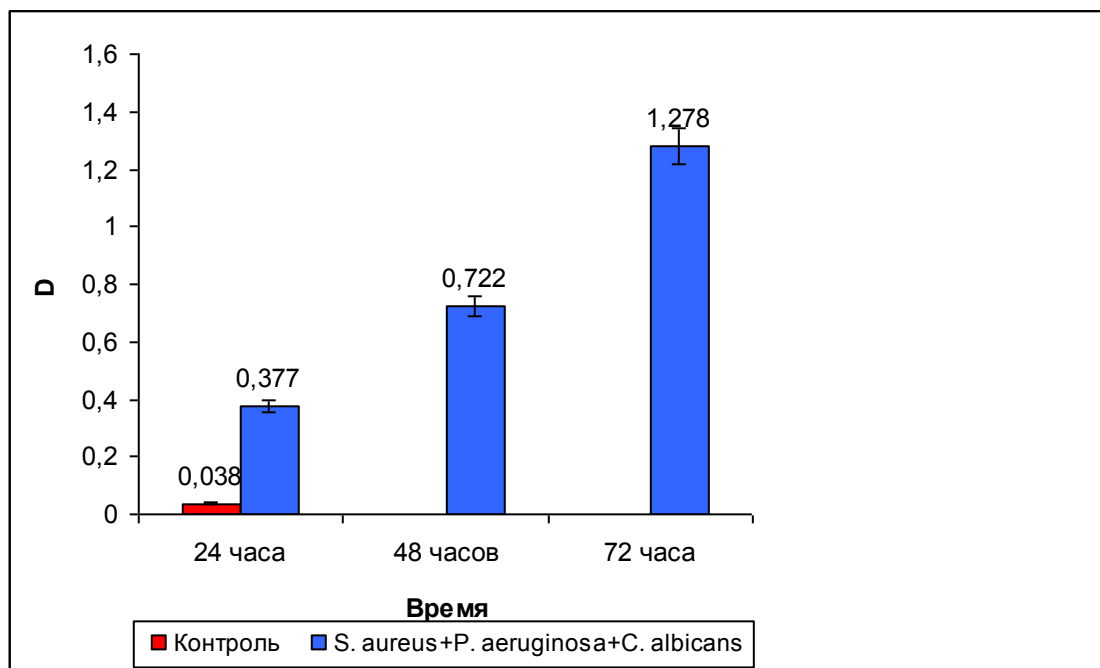


Рисунок 4.1.4 – Динамика величин связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками, образованными ассоциациями клинических штаммов *S. aureus* +*P. aeruginosa*+*C. albicans* (n=12)

Согласно данным литературы, биопленки способны образовывать более 90% известных видов бактерий и микроскопических грибов, а их формирование выявляется более чем при 80% заболеваний микробной этиологии (Михайлова, Червинец, 2009; Гостев Сидоренко, 2010; Donlan, 2002). Это определяет необходимость изучения способности и интенсивности формирования биопленок у наиболее распространенных видов микроорганизмов. Нами было установлено, что все исследуемые стандартные и клинические штаммы *S.aureus*, *P.aeruginosa* и *C.albicans*, а также их ассоциации обладали способностью к образованию биопленки.

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 клинических изолятов *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.

4.2 Особенности процесса формирования микробных биопленок *in vitro* при действии полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода

Поскольку предварительные исследования позволили установить, что созревание микробной биопленки происходит в первые сутки ее моделирования, представляло интерес изучить влияния ПААГ-М на процесс формирования биопленок условно-патогенных бактерий, микроскопических грибов, а также их ассоциаций. Полученные результаты представлены на рисунке 4.2.1.

Предварительная обработка лунок планшета сублетальными концентрациями ПААГ-М приводила к уменьшению связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками всех исследованных микроорганизмов, а также их ассоциаций. Так происходило снижение накопления красителя биопленками, образованными клиническим 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.

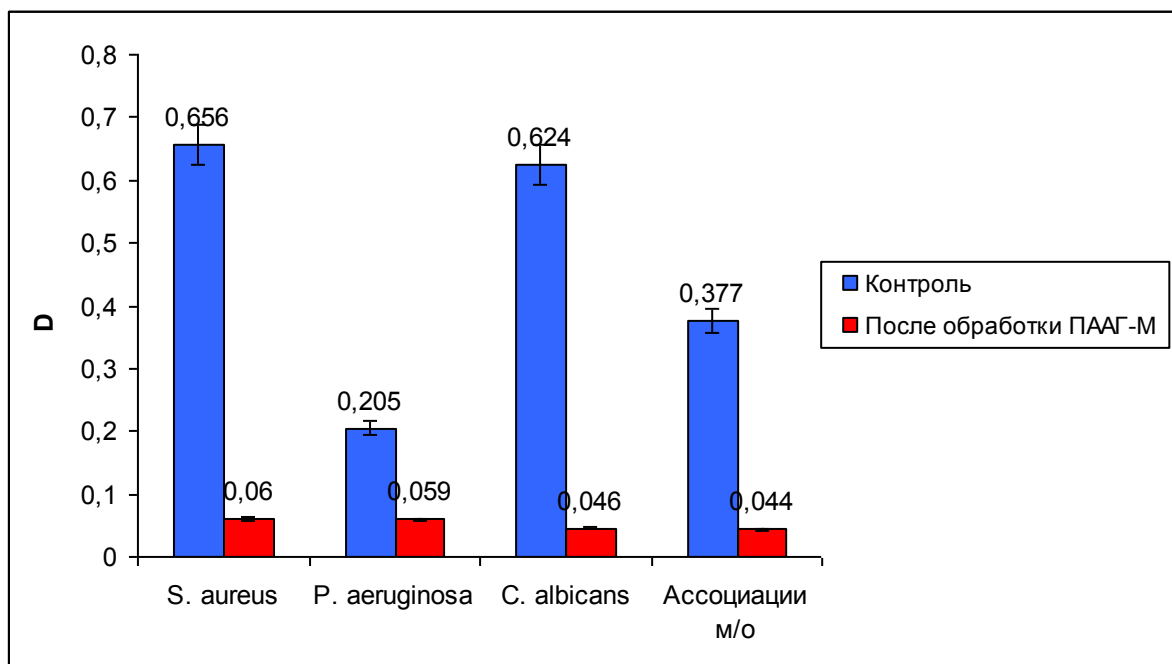
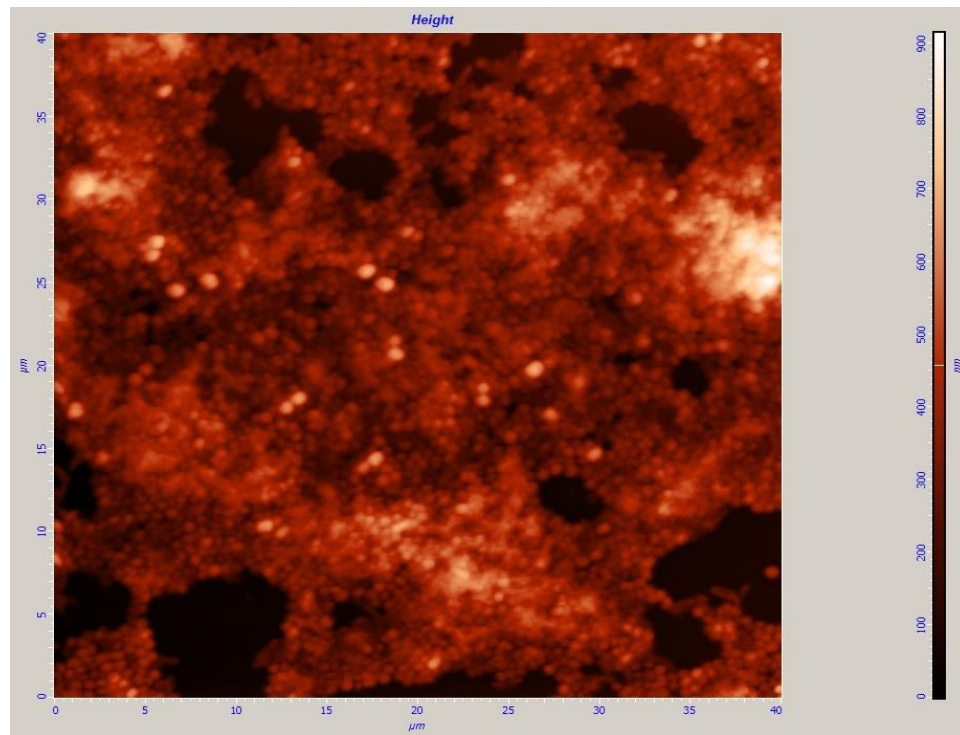


Рисунок 4.2.1 – Интенсивность связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками

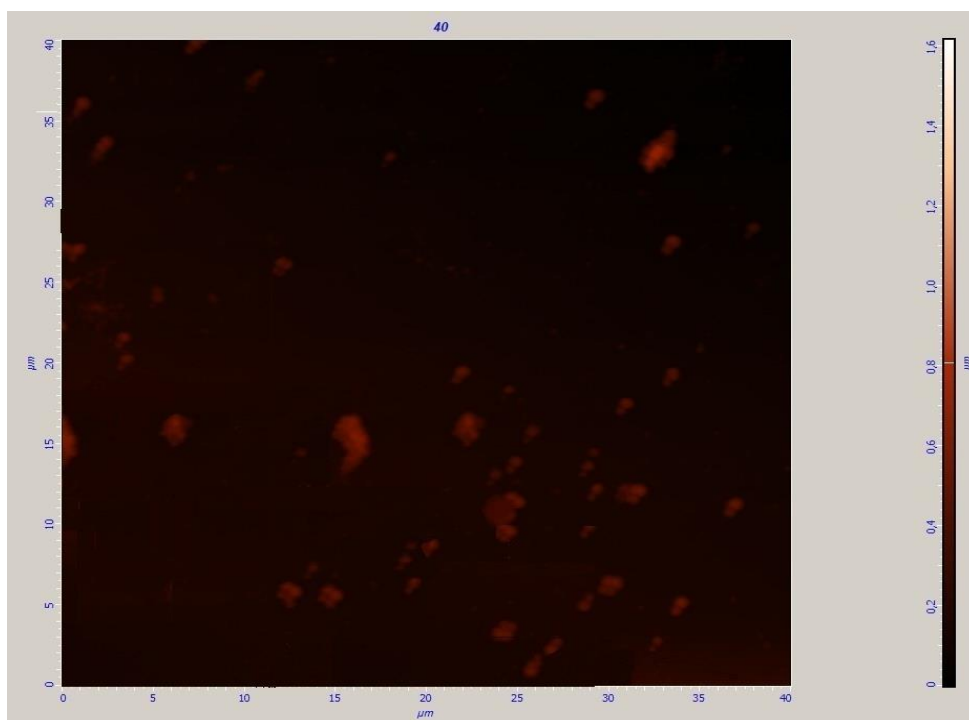
Для подтверждения данного предположения в качестве объекта исследования был выбран уретральный катетер, изготовленный из полиуретана. Фрагменты катетера помещали в МПБ, содержащий суточные культуры исследуемых микроорганизмов в концентрации 2×10^5 м.к./мл с целью формирования микробной биопленки. Опытные образцы были предварительно обработаны 0,5 % раствором ПААГ-М. Опытные и контрольные 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 адгезировали на полиуретановой поверхности и образовывали зрелые биопленки с интенсивно выраженным экзополимерным матриксом (рис. 4.2.2а и 4.2.3а).

Предварительная обработка уретрального катетера ПААГ-М вызывала выраженную дисперсию микробных биопленок (рис. 4.2.2б и 4.2.3б), что, вероятно, связано с нарушением процесса адгезии клеток микроорганизмов.

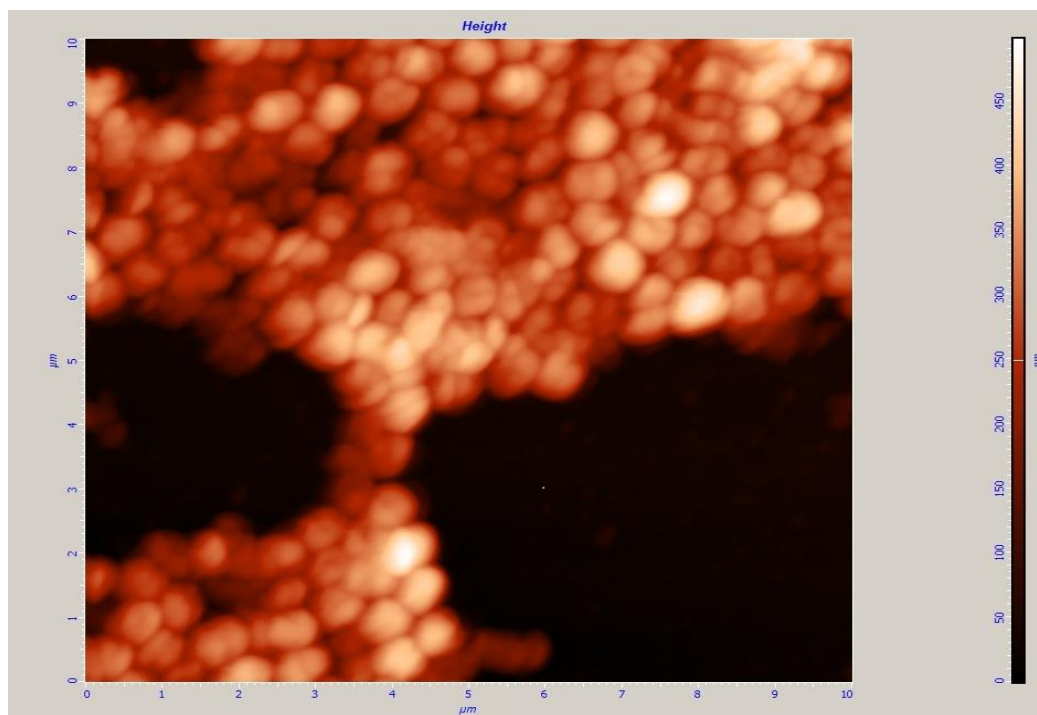


А

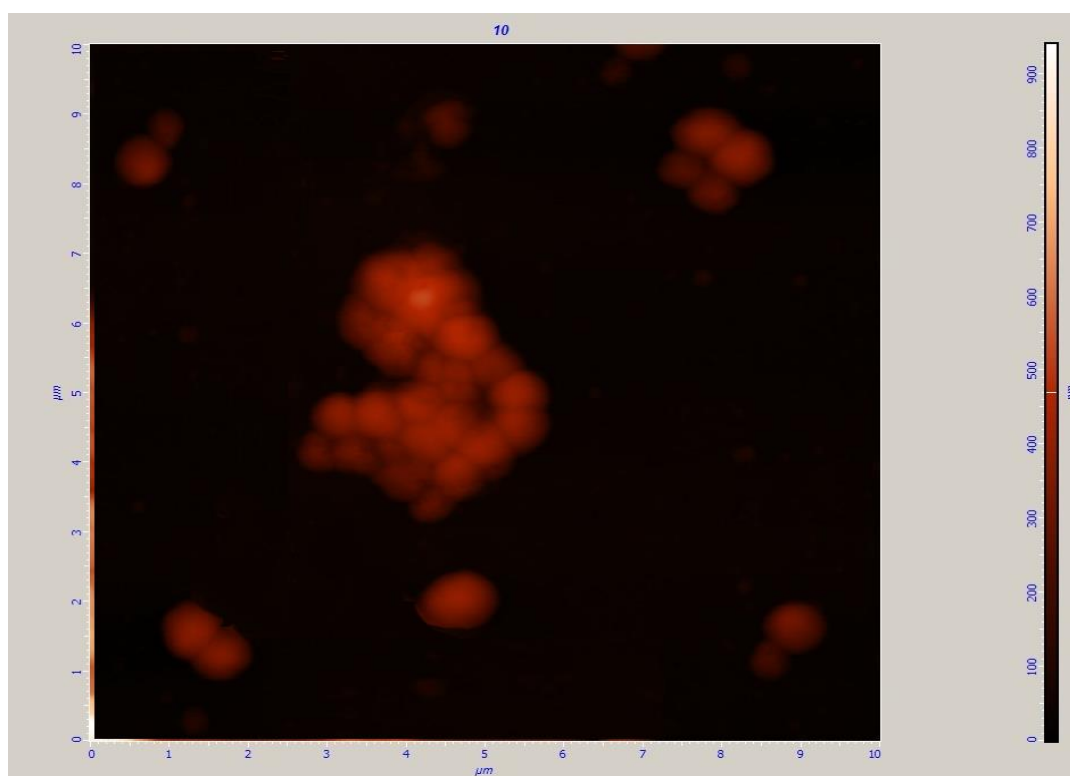


Б

Рисунок 4.2.2 – АСМ микробной биопленки клинического штамма *S. aureus* № 5 на поверхности уретрального катетера: А – контроль, Б – после обработки ПААГ-М



А



Б

Рисунок 4.2.3 – АСМ микробной биопленки клинического штамма *C. albicans* № 7 на поверхности уретрального катетера: А – контроль, Б – после обработки ПААГ-М

Полученные результаты позволяют рекомендовать ПААГ-М для предварительной обработки изделий медицинского назначения с целью предотвращения формирования микробных биопленок.

ГЛАВА 5 ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИАЗОЛИДИНАММОНИЯ, МОДИФИЦИРОВАННОГО ГИДРАТ-ИОНАМИ ЙОДА, В МЕДИКО–БИОЛОГИЧЕСКОЙ И ВЕТЕРИНАРНОЙ ПРАКТИКЕ

5.1 Влияние препарата наноагрегатов флавоноидов, стабилизированных полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода, на заживление экспериментальных гнойных ран лабораторных животных

Для оценки влияния препаратов, содержащих ПААГ-М, на течение раневого процесса все экспериментальные животные были разделены на 4 группы по 10 животных в каждой:

- группа № 1 (контроль 1) – раны не обрабатывали;
- группа № 2 (контроль 2) – раны обрабатывали 0,5%-ным раствором хлоргексидина (стандартным антисептиком);
- группа № 3 – раны обрабатывали препаратом, содержащим наноагрегаты флавоноидов;
- группа № 4 – раны обрабатывали препаратом, содержащим наноагрегаты флавоноидов, стабилизированные ПААГ-М.

Эффективность лечения ран оценивали по изменению площади раневого дефекта и срокам его полного заживления. Динамика изменения площади экспериментальных полнослойных гнойных ран представлена на рисунке 5.1.1.

По общепринятой методике через 48 часов после проведения операции оценивали состояние экспериментальных гнойных ран: края ран животных и близлежащие ткани были гиперемированы, в ране наблюдалось обильное содержание гноя. Исходная площадь ран составила $225 \pm 0,8$ мм².

На 3-и сутки после начала лечения происходило незначительное сокращение площади ран во всех группах, наиболее выраженное в опытной группе животных, раны которых обрабатывали препаратом, содержащим стабилизированные ПААГ-М наноагрегаты флавоноидов: в группе № 1 площадь раны, составила

202±8,12 мм², в группе № 2 – 189,8±12,4 мм², в группе № 3 – 172,2±6,18 мм², а в группе № 4 – 164,24±8,32 мм².

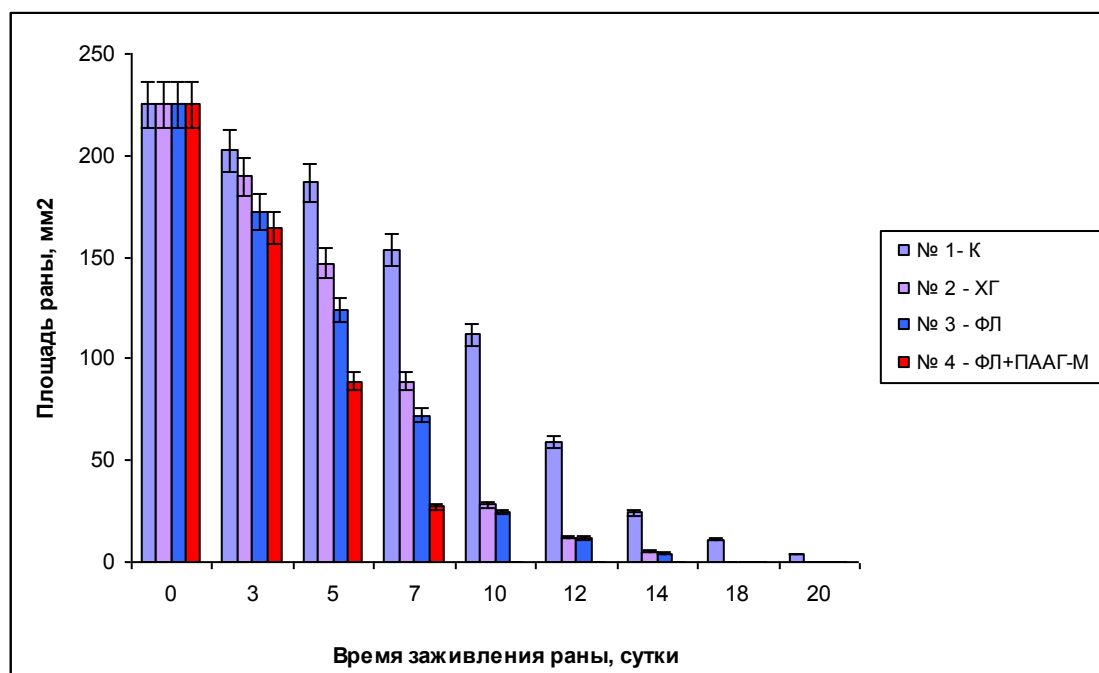


Рисунок 5.1.1 – Динамика изменения площади экспериментальных гнойных ран

На 5-е сутки после начала лечения в ранах животных контрольной группы № 2 и обеих опытных группах происходило достоверное уменьшению площади ран по сравнению с контрольной группой № 1, площадь раны в которой составила 186,6±4,86 мм²: в группе № 2 площадь раны была 146,8±8,4 мм², в группе № 3 – 124,02±3,8 мм², в группе № 4 – 88,62±6,8 мм².

К 7 суткам от начала лечения наблюдалось достоверное сокращение площади экспериментальных ран во всех группах животных, особенно выраженное в опытной группе, в которой раны обрабатывали наноагрегатами флавоноидов, стабилизированных ПААГ-М: в группе № 1 площадь раны составила 153,65±12,74 мм², в группе № 2 – 89,0±3,57 мм², в группе № 3 – 72,22±2,88 мм², а в группе № 4 – 27,25±3,06 мм².

На 10-е сутки от начала лечения у животных экспериментальной группы № 4 наблюдалось полное заживление раны с образованием нежного рубца. В остальных группах происходило дальнейшее сокращение площади ран площадь

ран, которая в группе № 1 составила $112,4 \pm 6,22 \text{ мм}^2$, в группе № 2 – $28,45 \pm 4,67 \text{ мм}^2$, в группе № 3 – $24,8 \pm 4,78 \text{ мм}^2$

К 12-м суткам от начала эксперимента в контрольной группе № 2 и опытной группе № 3 происходило уменьшение площади ран по сравнению с контролем в 5 раз и их размеры составили $12,06 \pm 3,28 \text{ мм}^2$ и $11,84 \pm 2,22 \text{ мм}^2$ соответственно. Достоверное уменьшение раневой поверхности наблюдалось и в контрольной группе животных № 1 (площадь ран составила $58,7 \pm 6,4 \text{ мм}^2$).

Полное заживление ран животных контрольной группы № 2 и опытной группы № 3 происходило на 18 сутки, а в контрольной группе № 1 – на 22 сутки от начала лечения с образованием соединительнотканного рубца

Таким образом, в ходе проведенных исследований было установлено, что наиболее эффективное очищение экспериментальных гнойных ран происходило при их обработке препаратом, содержащим наноагрегаты флавоноидов, стабилизированные ПААГ-М, что способствовало сокращению сроков заживления ран в 2,2 раза по сравнению с контролем. Сокращение сроков заживления ран при обработке нестабилизированными наноагрегатами флавоноидов связана с их высокой регенеративной способностью и, вероятно, стимулированием неспецифических механизмов антимикробной резистентности макроорганизма.

5.2 Оценка действия препарата наноагрегатов флавоноидов, стабилизированных полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода, на метаболические процессы в организме лабораторных животных

С целью обоснования возможности использования препарата, содержащего наноагрегаты флавоноидов, стабилизированные ПААГ-М, в качестве комплексного регенеративного и антимикробного средства была проведена оценка его влияния на биохимические показатели активности ключевых метаболических ферментов, состояния белкового, липидного и углеводного обменов в организме лабораторных животных.

В исследования использовали слитую кровь крыс-самок, участвовавших в эксперименте по моделированию полнослойных гнойных ран, которые обрабатывали нестабилизированными и стабилизированными ПААГ-М наноагрегатами флавоноидов.

Активность АСТ в опытной группе животных № 4, раны которых обрабатывали препаратом, содержащим наноагрегаты флавоноидов, стабилизированные ПААГ-М, повышалась по сравнению с контролем в 1,3 раза, а в группе животных № 3, раны которых обрабатывали нестабилизированными наноагрегатами флавоноидов, практически не менялась (рис. 5.2.1). Активность АЛТ в опытных группах была в 2,5 – 3,3 раза ниже, по сравнению с контролем. Значения коэффициента Де Ритиса в опытных группах не различались, но были в 3,1 раза выше, чем в контроле.

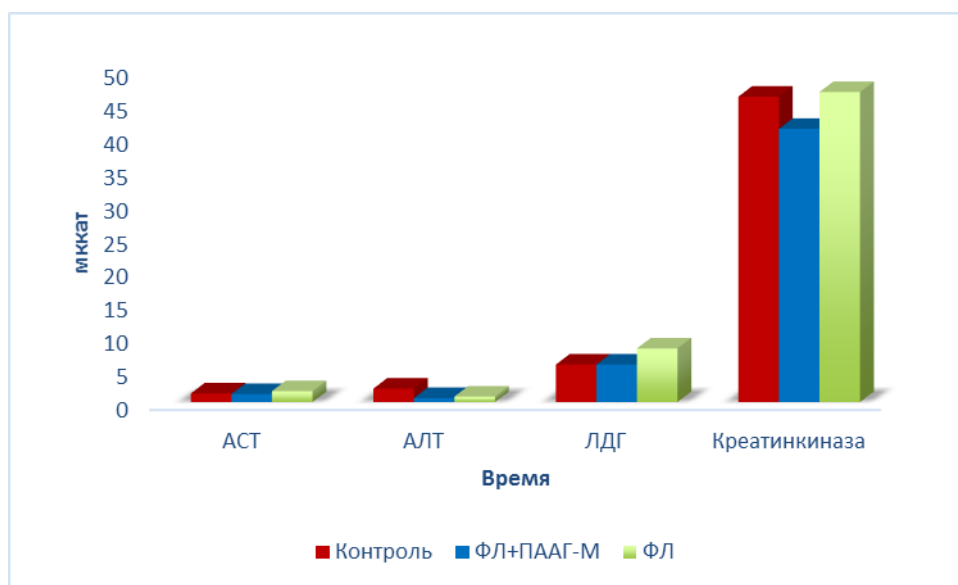


Рисунок 5.2.1 – Значения АСТ, АЛТ, ЛДГ и Креатинкиназа в сыворотке крови крыс

Значительное увеличение коэффициента Де Ритиса, вероятно, указывает на смещение метаболического акцента в сторону катаболизма. Однако, поскольку константа равновесия обратимых реакций, катализируемых трансаминазами, близка к единице, процессы переаминирования можно отнести к амфиболическим. Следовательно, необходимо уточнить вывод о преобладании катаболических реакций у животных опытных групп по сравнению с контролем.

Для опытной группы № 4 активность ЛДГ в сыворотке крови крыс была выше в 1,4 раза по сравнению с контролем, что указывало на повышение образования АТФ в гликолизе.

При использовании препарата, содержащего стабилизированные наноагрегаты флавоноидов, показатели КК достоверно не отличались от контрольных значений, однако в опытной группе животных № 3 значения данного фермента были ниже в 1,2 раза по сравнению с контролем, что свидетельствовало о повышении проницаемости клеточных мембран.

Индекс ферментемии (ИФ = АСТ/АЛТ + КК/ЛДГ + АСТ/ЛДГ) определяли по оригинальной методике (Малинин, 2009). Установлено, что значения ИФ у животных опытных групп достоверно не отличалось от показателей контрольной группы. Следовательно, в данном случае наибольшее значение имеет выраженное снижение активности АЛТ, что указывает на снижение интеграции азотистого и углеводного обмена (рис. 5.2.2).

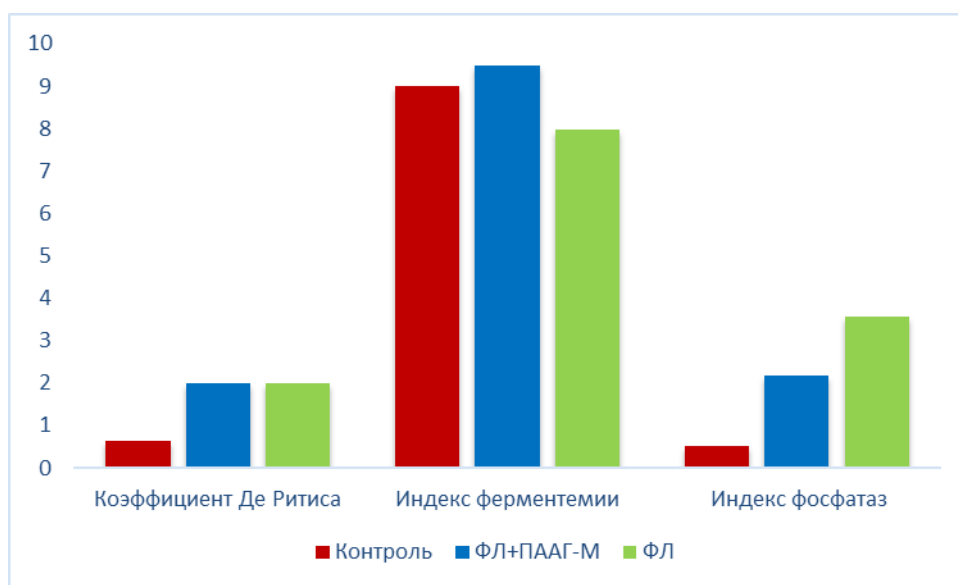


Рисунок 5.2.2 – Значения коэффициента де Ритиса, индекс ферментемии и индекса фосфатаз в сыворотке крови экспериментальных животных

Вывод о преобладании в организме животных опытных групп катаболических реакций подтверждается результатами анализа концентрации общего белка (рис. 5.2.3), мочевины (рис. 5.2.4) и их соотношения.

Так, концентрация общего белка в сыворотке кровивозрастала на 8-11%, а мочевины – почти в 3 раза. Снижение соотношения общего белка и мочевины в 2,6-2,7 раза указывает на то, что у экспериментальных животных опытных групп повышается активность не только катаболических, но и анаболических реакций, но катаболических более значительно.

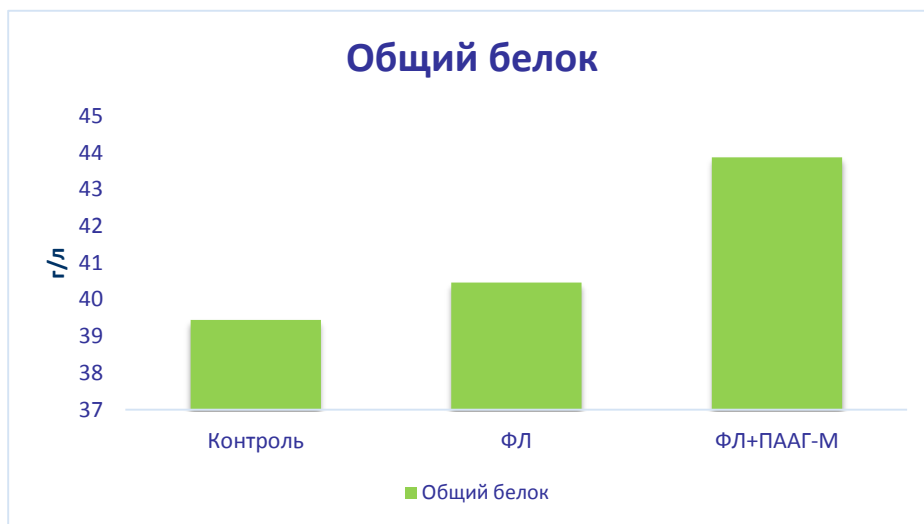


Рисунок 5.2.3 – Значения общего белка в сыворотке крови экспериментальных животных

У этих же животных отмечено достоверное снижение концентрации мочевой кислоты (рис. 5.2.4).

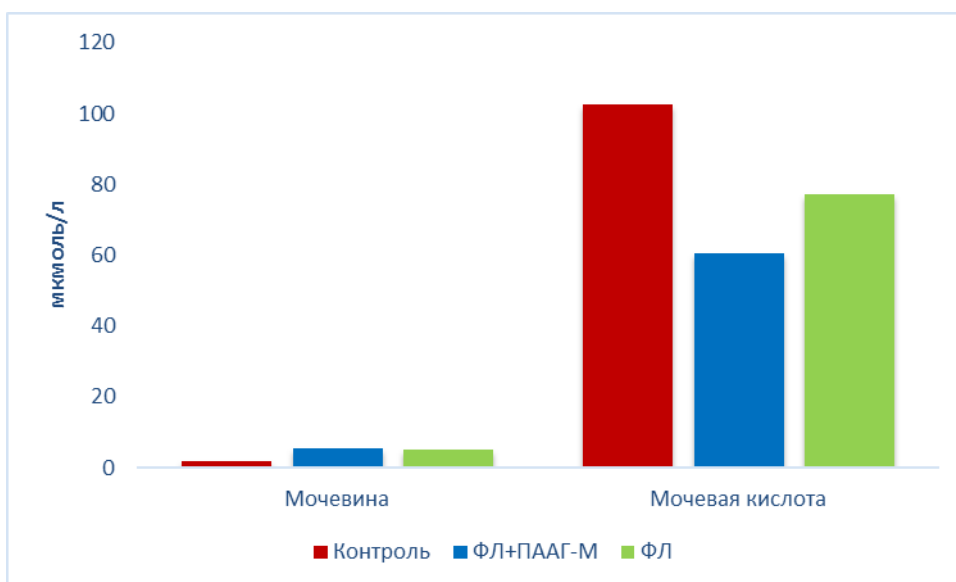


Рисунок 5.2.4 – Значения мочевины и мочевой кислоты в сыворотке крови экспериментальных животных

Поскольку мочевая кислота у млекопитающих является основным метаболитом пуринового обмена, то уменьшение ее концентрации указывает на усиление клеточной пролиферации и снижение гибели клеток.

Достоверное уменьшение концентрации глюкозы (рис. 5.2.5) в крови животных обеих опытных групп на фоне более низкой активности АЛТ указывает на снижение активности глюкозо-аланинового шунта, работающего преимущественно в направлении синтеза углеводов и, косвенно, на усиление белкового обмена.

В крови животных опытных групп определялось также незначительное повышение концентрации холестерина (рис. 5.2.5) по сравнению с контролем, что свидетельствует об увеличении значения липидов в энергетическом обмене на фоне более низкой концентрации глюкозы.

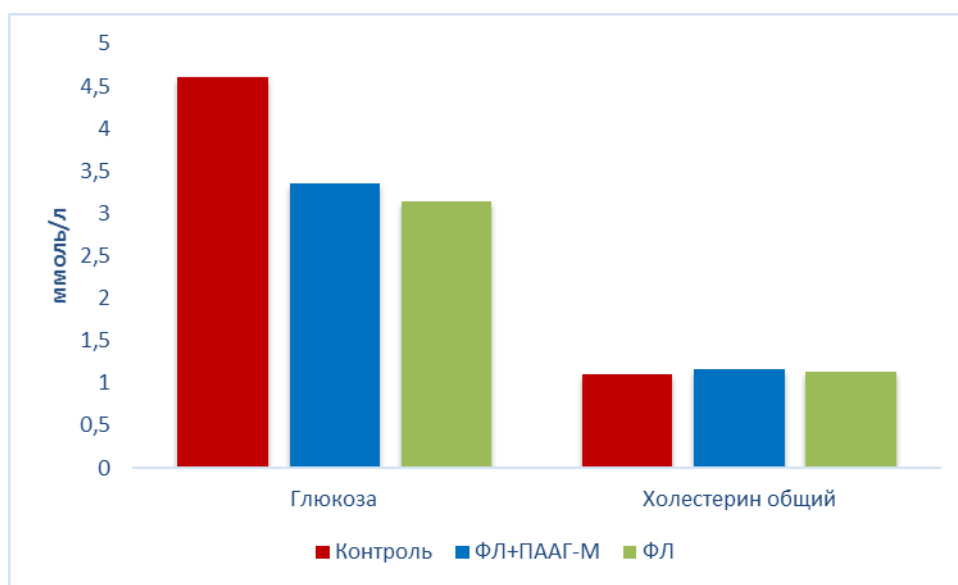


Рисунок 5.2.5 – Значения глюкозы и общего холестерина в сыворотке крови экспериментальных животных

Это подтверждает, что снижение концентрации глюкозы является следствием не повышения потребности в ней, а изменения активности глюкозо-аланинового шунта. Липидный профиль у животных опытных групп не изменен по сравнению с контролем, что указывает на усиление энергетического обмена как причину повышения концентрации общего холестерина.

Оценка показателей минерального обмена свидетельствовала о его незначительных изменениях. Фосфорно-кальциевое произведение оставалось в пределах нормы (рис. 5.2.6). В то же время индекс фосфатаз существенно возрастал за счет увеличения активности щелочной фосфатазы и снижения активности кислой фосфатазы (рис. 5.2.7).

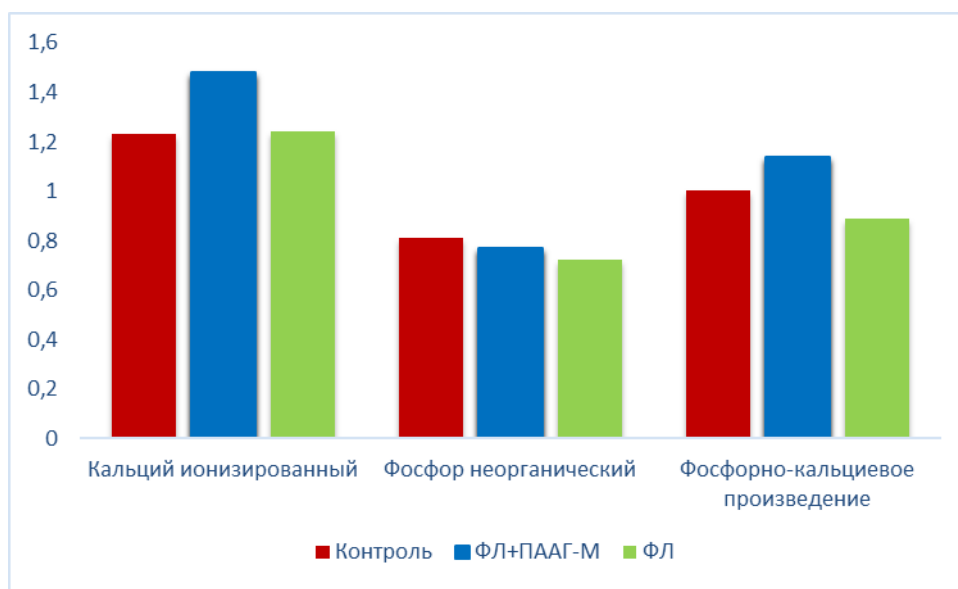


Рисунок 5.2.6 – Значения кальция ионизированного, фосфора неорганического и фосфорно-кальциевого произведение в сыворотке крови экспериментальных животных

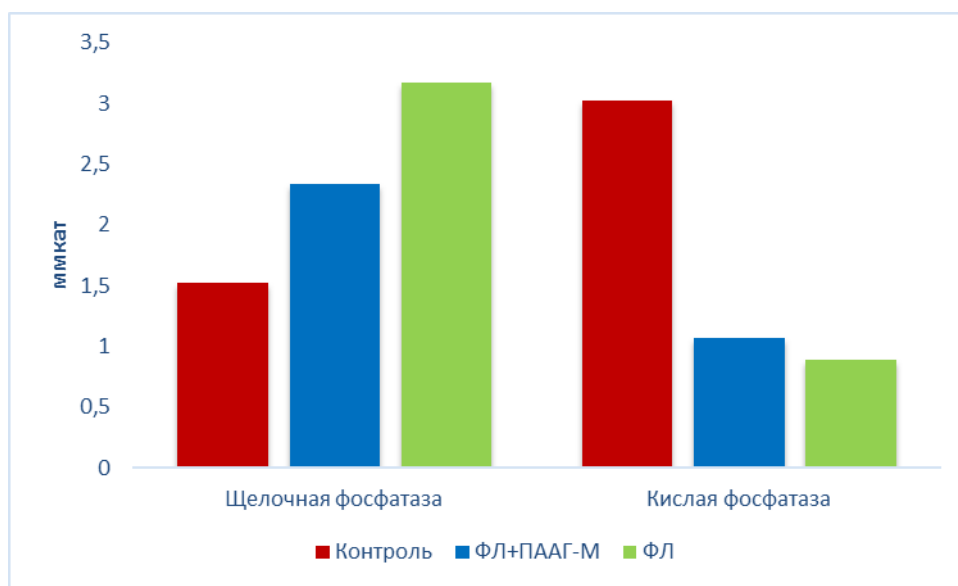


Рисунок 5.2.7 – Значения щелочной и кислой фосфатазы в сыворотке крови экспериментальных животных

Это косвенно указывает на усиление регенеративных процессов в поврежденных тканях, что было наиболее выражено в опытной группе животных, раны которых обрабатывали нестабилизированными наноагрегатами флавоноидов.

Увеличение концентрации билирубина в обеих опытных группах животных по сравнению с контролем за счет фракции непрямого билирубина (рис. 5.2.8) указывает на более интенсивный порфириновый обмен и адекватную реакцию печени.

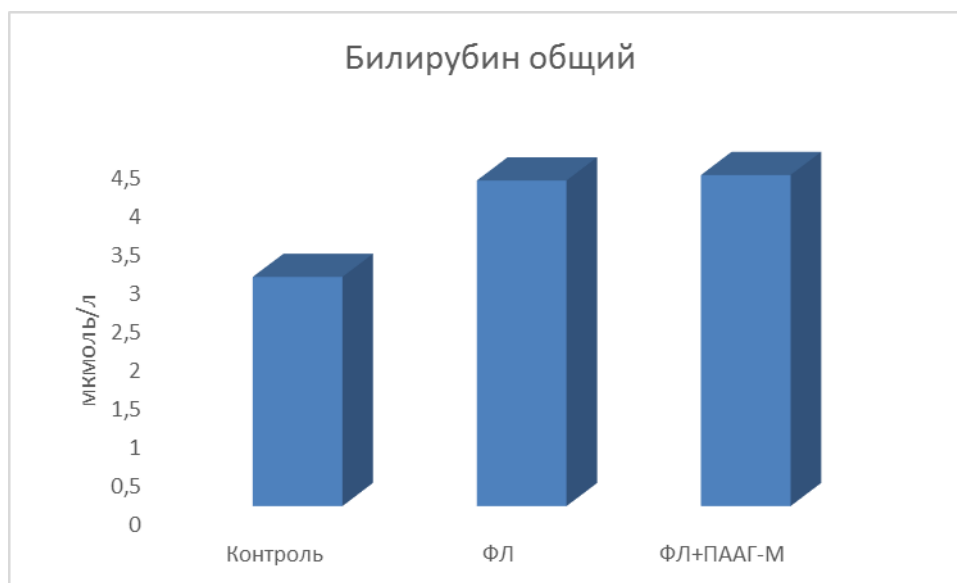


Рисунок 5.2.8 – Значения общего билирубина в сыворотке крови экспериментальных животных

При сравнении результатов исследований сывороток крови двух опытных групп животных между собой обращает на себя внимание более высокая активность АСТ, АЛТ, КК, ЛДГ, ЩФ у крыс, раны которых обрабатывали препаратом наноагрегатов флавоноидов, стабилизированных ПААГ-М, что указывает на более высокую интенсивность обменных процессов в их организме. Кроме того, у животных этой же опытной группы отмечены наиболее низкие показатели кальция, фосфора и их произведения, глюкозы и индекса ферментемии, а также наиболее высокие значения ЛДГ, что указывает на интенсивную регенерацию мышечной ткани.

Таким образом, в ходе проведенных исследования было установлено, что использование препаратов, содержащих как нестабилизированные наноагрегаты флавоноидов, так и их стабилизированные ПААГ-М формы, для лечения экспериментальных гнойных ран, не приводило к нарушению активности основных метаболических процессов и не вызывало признаков интоксикации в организме экспериментальных животных. Поскольку препарат, содержащий наноагрегаты флавоноидов, стабилизированные ПААГ-М, помимо высокой регенеративной активности характеризуется широким спектром антимикробного действия, это обуславливает перспективы его использования в качестве комплексного антисептического и ранозаживляющего средства.

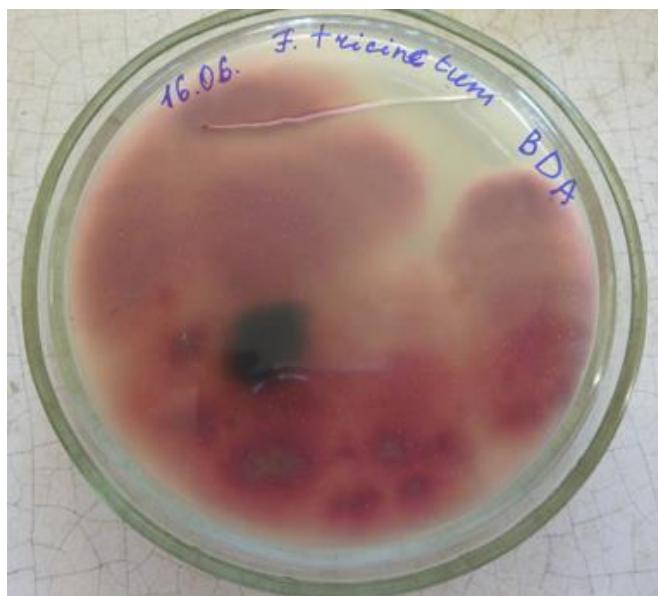
5.3 Изучение активности полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в отношении фитопатогенных микроорганизмов

Широкий спектр антимикробной активности ПААГ-М позволил нам предположить его эффективность 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 сотрудниками кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского.

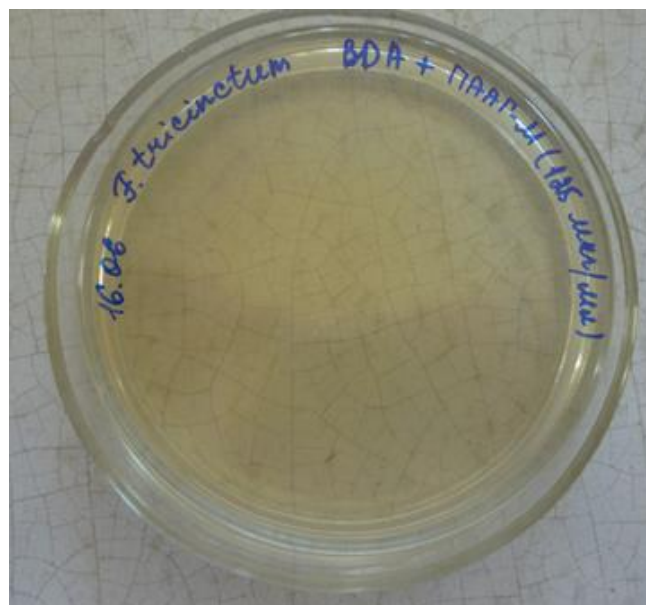
Антимикробную активность ПААГ-М в отношении фитопатогенных бактерий определяли методом серийных разведений в МПБ. Было установлено, что наибольшую чувствительность к препарату проявили *P. carotovorum* и *X. campestris*, значения МПК для которых составили 8 мкг/мл, а для *R. radiobacter* – 32 мкг/мл.

Противогрибковую активность ПААГ-М определяли методом серийных разведений на плотной среде BDA, в состав которой вносили рабочие concentra-

ции препарата. 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 (рис. 5.3.1–5.3.3).



А

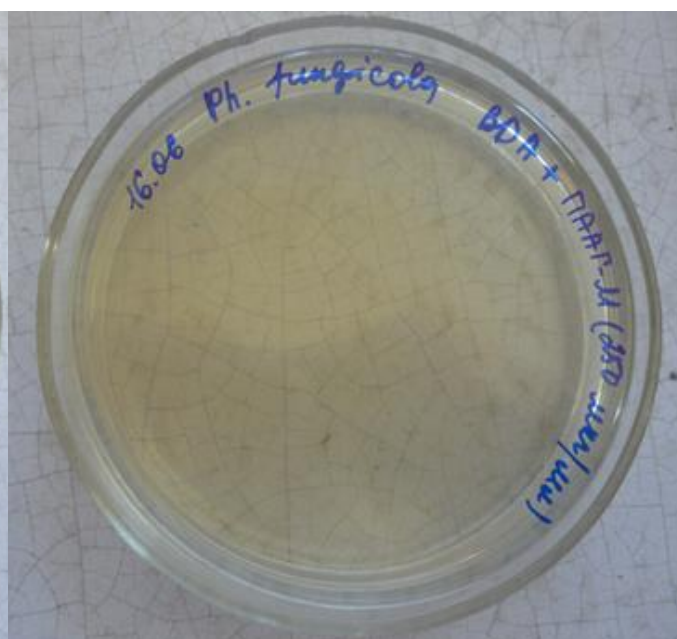


Б

Рисунок 5.3.1 – Рост *F. tricinctum* на среде BDA: А – контроль; Б – с добавлением ПААГ-М



А



Б

Рисунок 5.3.2 – Рост *P. fungicola* на среде BDA: А – контроль; Б – с добавлением ПААГ-М

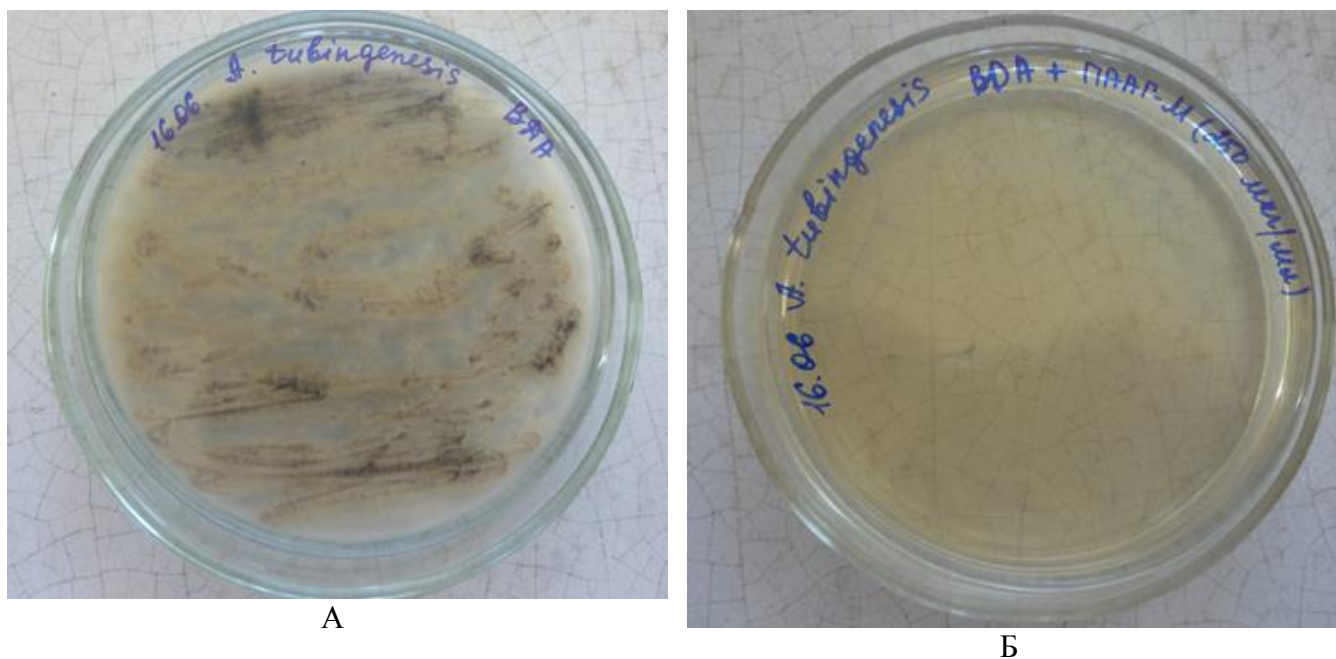


Рисунок 5.3.3 – Рост *A. tubingensis* на среде BDA: А – контрольный; Б – с добавлением ПААГ-М

Таким образом, полученные результаты позволяют рассматривать ПААГ-М в качестве эффективного антимикробного средства для обработки плодов и семян при хранении с целью уничтожения фитопатогенных микроорганизмов.

5.4 Использование полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в качестве дезинфицирующего средства для обработки холодильных камер пищевого производства

Одной из причин загрязнения пищевых продуктов бактериями и плесневыми грибами на производстве является нарушения санитарного состояния холодильных камер.

Исследования проводились на производственной базе компании «Генеральские колбасы» (г. Саратов). В качестве объектов исследования были выбраны следующие:

- образец № 1 – холодильная камера для хранения фарша;
- образец № 2 – холодильная камера для проведения осадки колбасных изделий;
- образец № 7 – холодильная камера № 20 склада готовой продукции;

– образец № 8 – холодильная камера № 22 склада готовой продукции

Забор проб с поверхностей исследуемых холодильных камер осуществляли методом смывов с помощью стерильных ватных тампоном на палочках, которые предварительно увлажняли стерильным физиологическим раствором. Смывы проводили в нескольких местах исследуемого объекта площадью в 100,0–200,0 см², уделяя наиболее пристальное внимание местам, труднодоступным для мытья и дезинфекции. В соответствии с гигиеническими нормативами по микробиологической безопасности были определены следующие показатели:

- рост мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ) на среде МПА;
- рост бактерий группы кишечных палочек (БГКП) на среде Кесслера, с последующем пересевом на среду Эндо;
- рост плесневых грибов на среде Сабуро.

Посевы на МПА и среде Эндо инкубировали при температуре 37 °С, предварительную оценку роста осуществляли через 24 часа, а окончательную – через 48 часов. Инкубирование посевов на среде Сабуро осуществляли при температуре 22°С с предварительной оценкой роста через 48 часов и окончательной – через 72 часа.

В ходе проведенных исследований была установлена высокая микробная обсемененность образцов № 1, 2 и 8 представителями воздушной микрофлоры – бациллами и коагулазонегативными стафилококками (рис. 5.4.1). Наименьшее количество КОЕ микроорганизмов было обнаружено в образце № 7.

При посеве на среду Эндо было установлено, что только в образце № 1 отсутствовали БГКП. В образце № 2 была выявлена *E. coli* по характерным лактозоположительным колониям с металлическим блеском, а также колонии лактозонегативных бактерий (рис. 5.4.2). Образцы № 7 и № 8 содержали большое количество бактерий, неферментирующих лактозу.

При оценке роста на среде Сабуро было установлено наличие «микроорганизмов порчи» – плесневых грибов в образцах № 1, 2 и 8 (рис. 5.4.3).

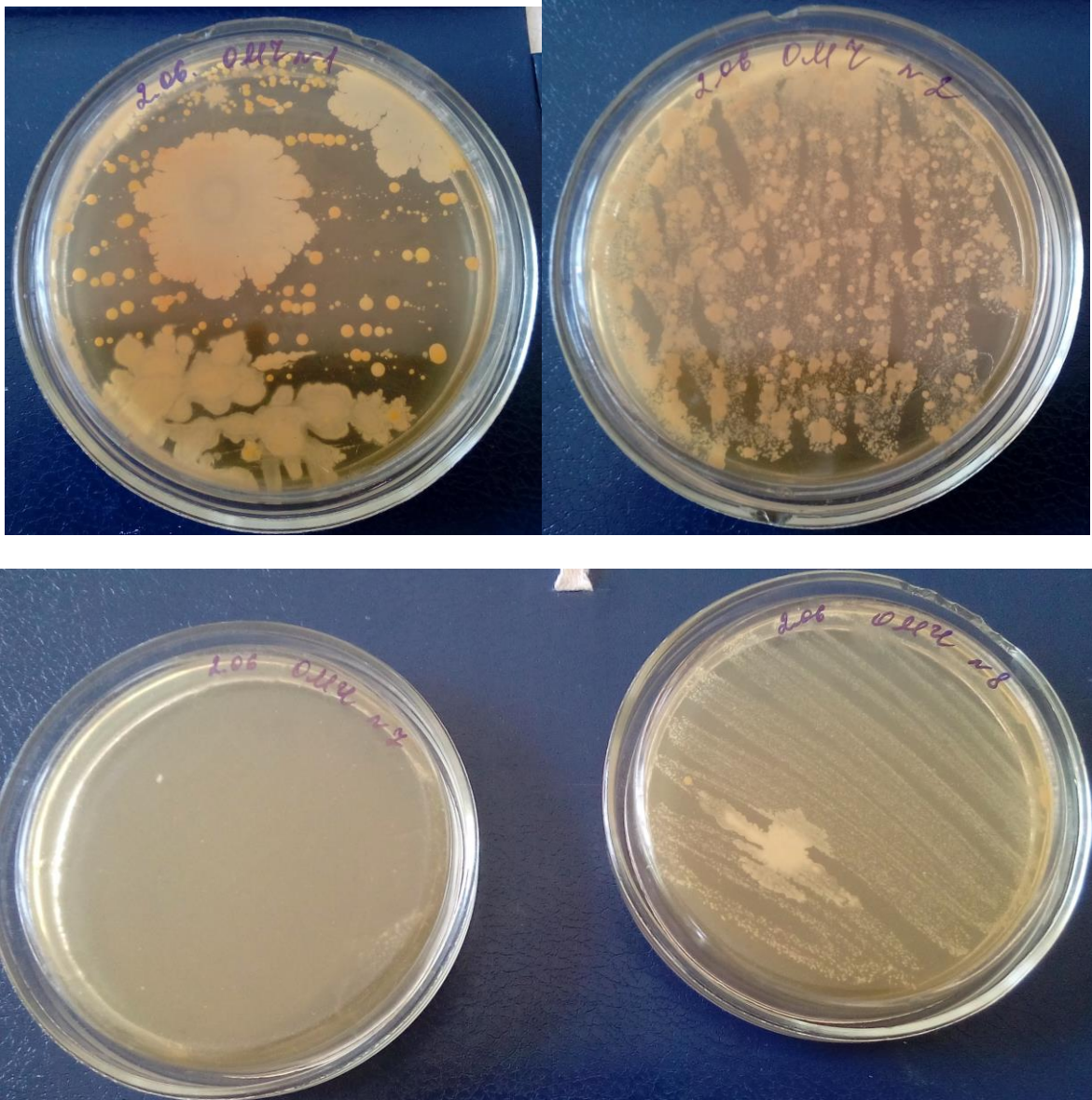


Рисунок 5.4.1 – Показатели общей микробной обсемененности исследуемых образцов

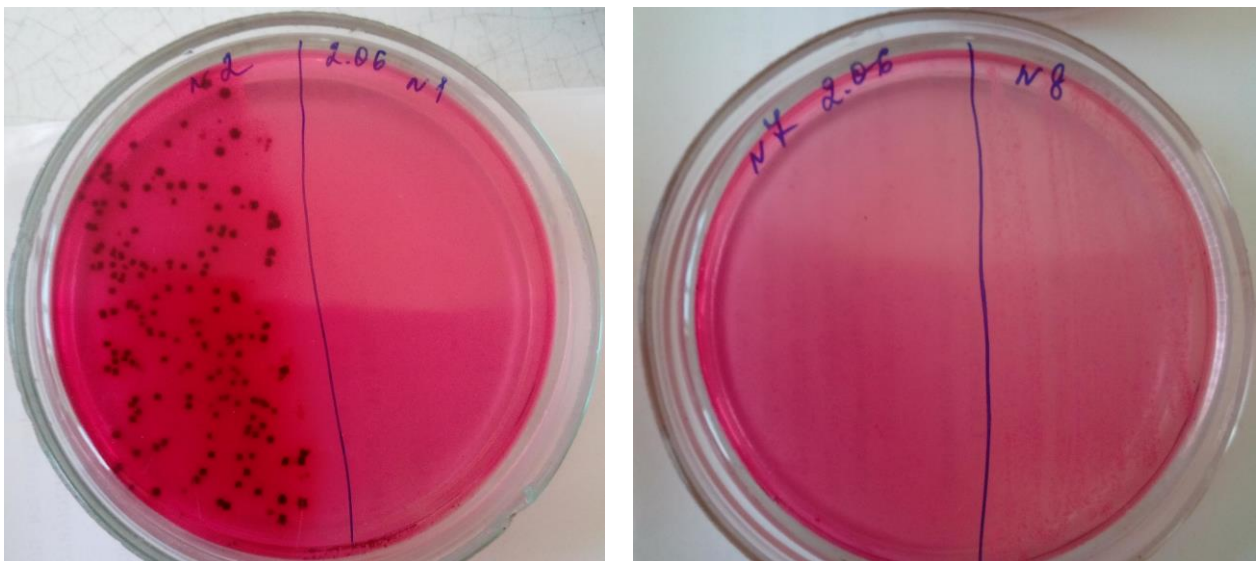


Рисунок 5.4.2 – Присутствие БГКП в исследуемых смывах с холодильного оборудования

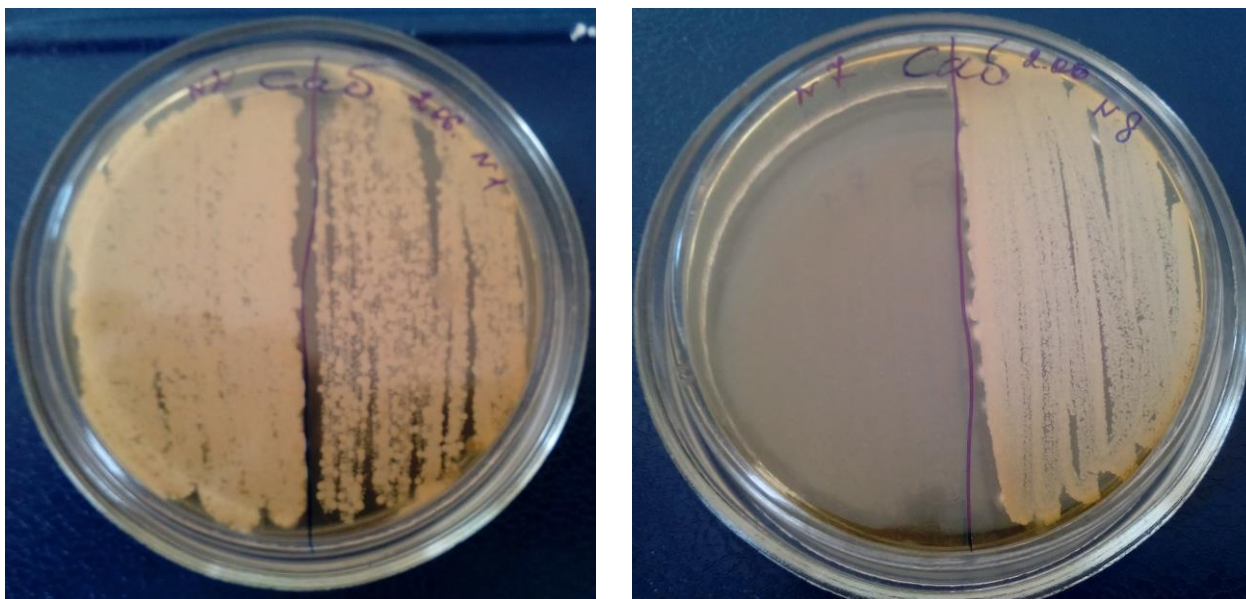


Рисунок 5.4.3 – Присутствие плесневых грибов в смывах с холодильного оборудования

Таким образом, установлена высокая микробная обсемененность исследуемых образцов холодильного оборудования, используемых на различных этапах приготовления колбасных изделий.

С целью уничтожения микроорганизмов на поверхности исследуемого холодильного оборудования на их рабочие поверхности был нанесен 1%-ный раствор ПААГ-М. Через сутки экспозиции в холодильники произвели закладку продукции согласно технологическому процессу. Смывы с обработанных поверхностей проводили через каждые 2 дня.

Было установлено, что через 7 суток после обработки на МПА в посевах с обработанных поверхностей рост микроорганизмов отсутствовал (рис.5.4.4–5.4.6). При посеве смывов на среду Эндо и среду Сабуро рост микроорганизмов также отсутствовал.

Через 10-14 суток экспозиции в смывах с холодильного оборудования были обнаружены единичные колонии на МПА, однако БГКП и плесневые грибы отсутствовали.

Достоверное увеличение количества КОЕ в смывах с холодильного оборудования происходило к 20-23 суткам экспозиции, однако в посевах на среду Эндо и среду Сабуро рост микроорганизмов отсутствовал.

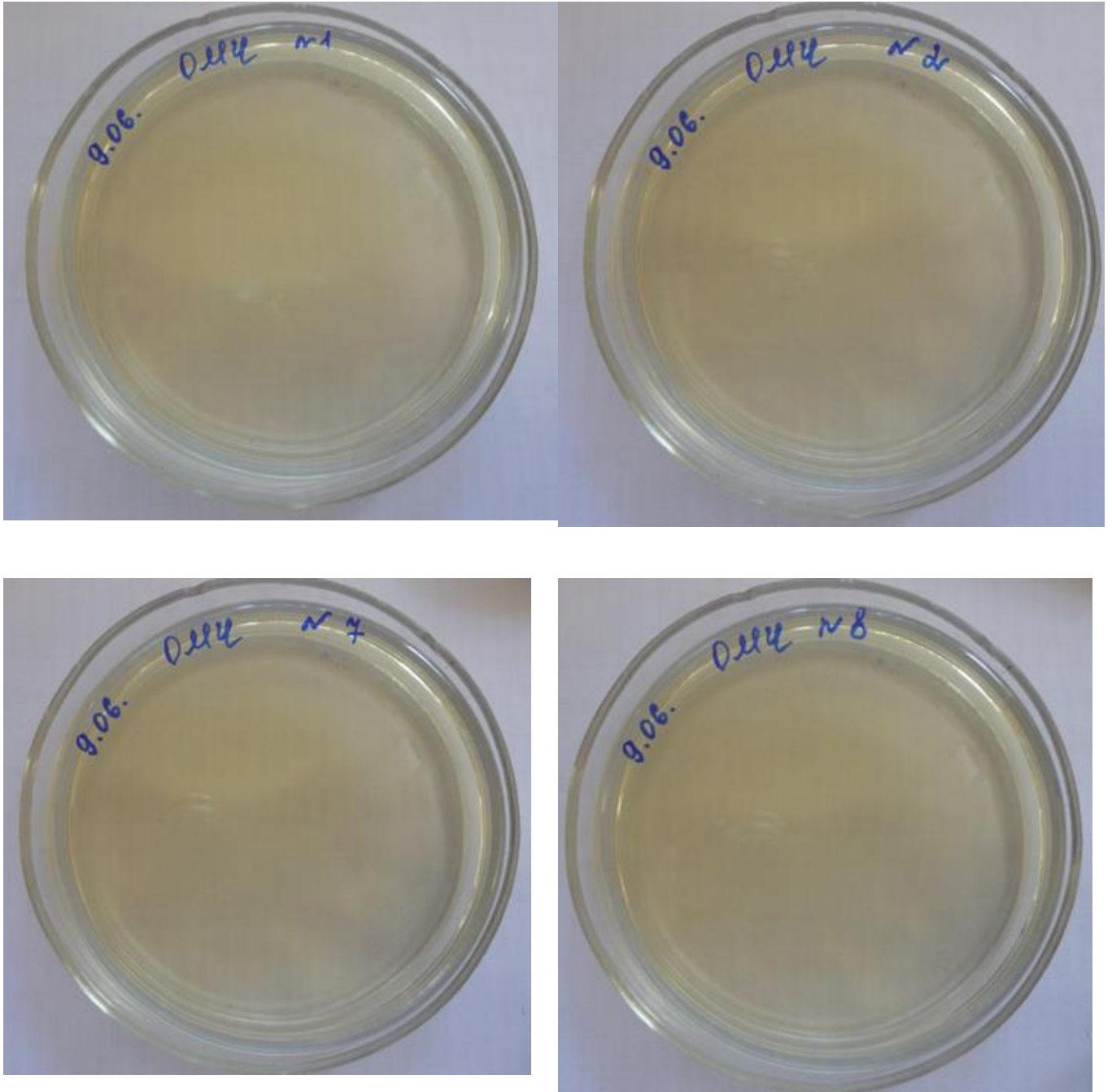


Рисунок 5.4.4 – Результаты посева смывов на МПА для определения общего микробного числа через 7 суток после обработки холодильного оборудования

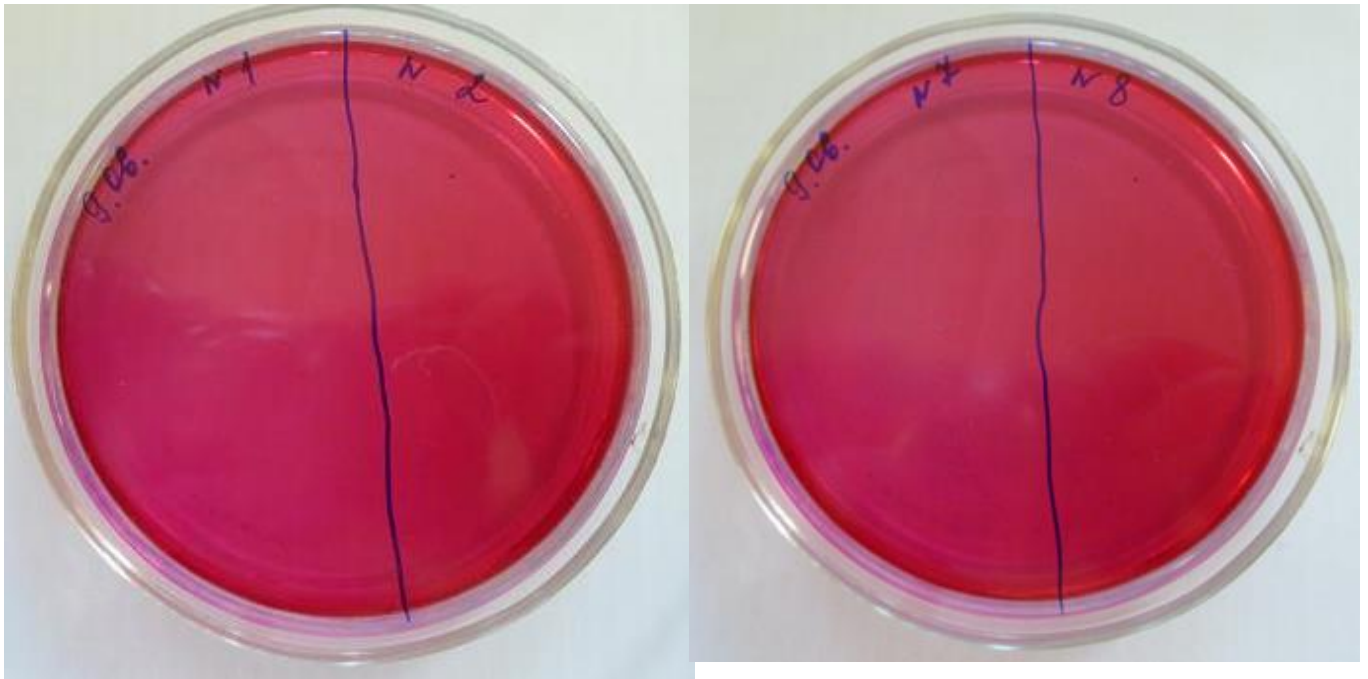


Рисунок 5.4.5 – Результаты посева смывов на среду Эндо для определения БГКП через 7 суток после обработки холодильного оборудования

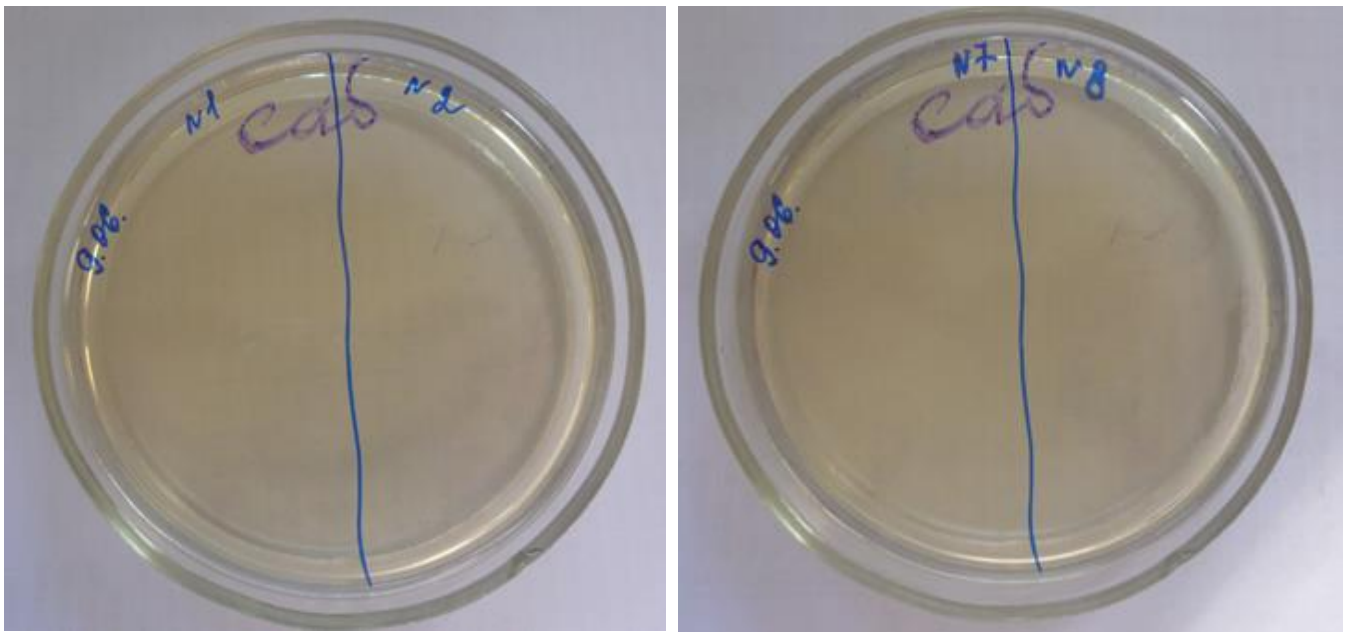


Рисунок 5.4.6 – Результаты посева смывов на среду Сабуро для определения плесневых грибов через 7 суток после обработки холодильного оборудования

Таким образом, высокая антимикробная активность ПААГ-М в отношении широкого спектра микроорганизмов и высокая эффективность позволяет рассматривать его в качестве перспективного дезинфектанта для обработки оборудования, используемого в пищевом производстве. Для повышения эффективности действия препарата обработку рабочих поверхностей необходимо проводить каждые 10 дней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ежегодно происходит увеличение количества устойчивых штаммов условно-патогенных микроорганизмов, что приводит к снижению эффективности лечения больных (Супотницкий, 2011; Туркутюков, 2011). Этому способствует несоблюдение принципов рациональной химиотерапии в стационарах, а также назначение химиотерапевтических препаратов при отсутствии показаний и самолечение (Сидоренко, 2002; Miller et al, 2001; Kato et al 2002). Кроме того, формированию полирезистентных штаммов также способствует возможность микроорганизмов к образованию биопленок, в составе которых бактерии и микроскопические грибы защищены от действия антимикробных препаратов (Ермолов, 1998; Ильина и др., 2004; Афиногенова и др., 2011). Считается, что более 65% всех инфекционных заболеваний обусловлены микроорганизмами, существующими в форме биоплёнок. Микробная биопленка – причина возникновения и развития очагов инфекции в стоматологии, кардиохирургии, урологии, ортопедии, гинекологии. Кроме того с биопленками связано возникновение катетер-ассоциированных инфекций, причиной которых становятся биопленки, развивающиеся на различных изделиях медицинского назначения – катеторах, имплантах – при проведении инвазивных манипуляций.

В последние годы ведутся активные разработки, целью которых является предупреждение развития микробных биопленок, а также ее дезорганизация, уничтожение клеток-персистеров (Тец, 2007; Голуб, 2011; Compans et al., 2003; Ehrlich, 2003; Azeredo et al., 2008; Carson et al., 2010).

Для решения проблемы, связанной с распространением антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, требуется целенаправленный поиск новых химических соединений, обладающих антимикробной активностью в отношении как планктонных, так и биопленочных форм возбудителей. Высокой антимикробной активностью характеризуются полимерные соединения. В настоящее время создаются экспериментальные препараты, представляющие собой модифицированные полимерными соединениями аналоги современных антибиотиков, что

позволяет преодолеть возникшую к ним устойчивость микроорганизмов (Дьякова и др., 2012).

Одним из перспективных полимерных соединений с высокой антимикробной активностью является полиазиолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода. Ранее в работах Нечаевой О.В. с соавторами (2014, 2015) установлено антимикробное действие этого полимерного соединения в исходной полученной форме в отношении референс штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, некоторых микроскопических грибов и вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней. В этой связи необходимо было изучить зависимость антимикробных свойств вариантов ПААГ-М от их физико-химических характеристик. Кроме того, для повышения эффективности синтетических химиотерапевтических антимикробных препаратов необходимо учитывать биологические особенности возбудителей инфекционных заболеваний, связанных, например, со строением их клеточной стенки.

Учитывая вышеизложенное, нами был проведен анализ антимикробной активности полимерного соединения ПААГ-М в зависимости от его физико-химических характеристик в отношении условно-патогенных микроорганизмов.

Из четырех вариантов ПААГ-М с разной длиной полимерной цепи в отношении стандартных штаммов *E.coli* 113-13 и *P.aeruginosa* ATCC 27853 наибольшую антимикробную активность проявили варианты с низкой молекулярной массой >100 и 100-200 кДа, а в отношении *S. aureus* 209P – варианты с молекулярной массой 200-350 и 400-500 кДа. Особенности строения клеточной стенки грамотрицательных бактерий обуславливают их чувствительность к низкомолекулярным вариантам исследуемого полимера, поскольку благодаря наличию интегральных пориновых белков в клетку транспортируются химические соединения с невысокой молекулярной массой и определенной пространственной конформацией. В отношении грамположительных бактерий большая активность высокомолекулярных вариантов полимера, вероятно, связана с более эффективной блокировкой функциональных групп клеточной стенки.

Низкая активность ПААГ-М отмечена в отношении стандартного штамма *C.albicans* 13108, что не позволило нам определить значения МПК и установить зависимость от длины полимерной цепи, что, вероятно, связано со сложностью проникновения химических соединений через плотную клеточную стенку грибов, содержащую хитин.

Поскольку основным действующим началом в составе полимера являются гидрат-ионы йода, представляло интерес оценить зависимость антимикробной активности от их содержания в составе полимера. Была установлена линейная зависимость повышения эффективности антимикробного действия ПААГ-М при повышении концентрации гидрат-ионов йода. Кроме того, препараты с высоким содержанием гидрат-ионов йода характеризовались антимикотической активностью, однако показатели значений МПК были высокими.

Для повышения противогрибковой активности ПААГ-М представляло интерес подобрать максимально эффективную концентрацию гидрат-ионов йода в составе полимера для создания препарата с высокой противогрибковой активностью. В исследованиях использовали клинические штаммы *C.albicans*, 60 % которых были чувствительны к стандартным антибиотикам – флуконазолу и амфотерицину В, а 40 % характеризовались устойчивостью к обоим препаратам. Вне зависимости от отношения к антимикотическим препаратам все клинические штаммы *C.albicans* проявляли высокую чувствительность к вариантам полимера, насыщенным гидрат-ионами йода. Наибольшая противогрибковая активность отмечена для вариантов полимера с концентрацией гидрат-ионов йода 250, 500 и 1000 мкг/мл. Однако повышение содержания гидрат-ионов йода до 1500 мкг/мл приводило к резкому снижению антимикотических свойств полимера, что, очевидно, связано с ослаблением окислительной активности гидрат-ионов йода при взаимодействии с микробными клетками.

В дальнейших исследованиях мы провели оценку влияния сублетальных концентраций ПААГ-М на адгезивные свойства микроскопических грибов, поскольку именно адгезия является первичным этапом взаимодействия микробных клеток с чувствительными клетками макроорганизма или инертными поверхно-

стями изделий медицинского назначения. В исследованиях использовали стандартный и клинические штаммы *C.albicans*, характеризующиеся исходно среднеадгезивными и высокоадгезивными свойствами соответственно. Культивирование всех исследуемых штаммов микроскопических грибов с добавлением ПААГ-М приводило к снижению показателей ИАМ до неадгезивного уровня. Поскольку согласно литературным данным первичная адгезия микроскопических грибов происходит за счет гликопротеиновых фибрилл клеточной стенки, то, вероятно, обработка ПААГ-М приводит к их блокировке.

Еще одним актуальным вопросом прикладной микробиологии и практической медицины является проблема формирования микробных биопленок как в макроорганизме, так и на поверхности изделий медицинского назначения. Это приводит к росту устойчивости биопленочных форм микроорганизмов к действию антимикробных препаратов, хронизации инфекционного процесса, а также развитию катетерассоциированных инфекций. Для повышения эффективности борьбы с микробными биопленками необходимо детальное изучение этапов их формирования. Поэтому нами была изучена динамика формирования микробных биопленок стандартными и клиническими штаммами условно-патогенных микроорганизмов, а также их ассоциаций в условиях *in vitro*.

Было установлено, что стандартный и клинические штаммы *S. aureus* имели сходную динамику при формировании биопленок в лунках иммунологических планшетов: максимальное связывание кристаллического фиолетового происходило через 24 часа культивирования биопленки, а затем интенсивность связывания снижалась, поскольку через 72 часа происходило критическое уменьшение количества питательных веществ в среде культивирования.

Процесс формирования микробных биопленок у стандартного штамма *P. aeruginosa* отличался двухфазным характером накопления красителя, причем наличие первого пика связано, вероятно, со стадией созревания микробной биопленки к концу первых суток культивирования. Второй пик обусловлен использованием погибших клеток в качестве питательного субстрата, что компенсирует недостаток питательных веществ в среде к третьим суткам культивирования.

У клинических штаммов *P. aeruginosa* ввиду низкой метаболической активности отмечалась пролонгация стадии созревания биопленки, а максимальное накопление кристаллического фиолетового происходило к третьим суткам культивирования.

Максимальное накопление кристаллического фиолетового клиническими штаммами *C. albicans* происходило через 24 часа культивирования, а через 48 и 72 часа наблюдался резкий спад в накоплении красителя, что, возможно, связано с лимитирующим воздействием токсических продуктов метаболизма.

При оценке динамики формирования микробных биопленок ассоциацией условно-патогенных микроорганизмов было отмечено максимальное накопление кристаллического фиолетового также к концу первых суток культивирования.

Так как предыдущие исследования позволили выявить, что обработка микробных клеток ПААГ-М приводит к снижению адгезивной активности микроорганизмов, нами были проведены исследования по изучению влияния сублетальных концентраций полимера на процесс формирования микробных биопленок в условиях *in vitro*. Для этого опытные лунки иммунологических планшетов предварительно обрабатывали 0,5 % раствором ПААГ-М. Было установлено, что обработка лунок планшета полимером приводила к резкому снижению интенсивности связывания кристаллического фиолетового как всеми исследованными условно-патогенными микроорганизмами, так и их ассоциациями, что свидетельствовало о нарушении процесса пленкообразования.

С целью предупреждения развития микробных биопленок на поверхностях изделий медицинского назначения рядом авторов предлагается использование химических соединений, нарушающих различные этапы их формирования (Carson et al., 2010). В исследования провели оценку возможности использования ПААГ-М в качестве антибиопленочного препарата. Микробные биопленки формировали на поверхности фрагментов полиуретанового уретрального катетера, опытные образцы которого были обработаны 0,5 % раствором полимера. Методами атомно-силовой микроскопии было показано, что предварительная обработка катетера ПААГ-М приводила к выраженной дисперсии микробных биопленок всех иссле-

дованных микроорганизмов, а также их ассоциаций и разрушению полисахаридного матрикса.

Широкий спектр антимикробного действия и высокая эффективность ПААГ-М явились обоснованием для создания биологически активных препаратов на его основе. Нами была изучена регенеративная активность препарата, содержащих наноагрегаты флавоноидов, стабилизированных полимером, на модели экспериментальных полнослойных гнойных ран. Было установлено, что обработка раневых дефектов исследуемым препаратом приводила к достоверному сокращению их площади и сокращению сроков заживления в 2,2 раза по сравнению с контролем.

Для оценки влияния этого препарата на метаболические процессы в организме экспериментальных животных определяли биохимические показатели углеводного, белкового, липидного и минерального обмена. Было установлено, что обработка экспериментальных гнойных ран препаратом, содержащим стабилизированные ПААГ-М наноагрегаты флавоноидов, не вызывало достоверных изменений показателей основных метаболических процессов, что свидетельствовало об отсутствии признаков интоксикации в организме экспериментальных животных.

С целью обоснования применения исследуемого полимерного соединения в качестве дезинфицирующего средства была проведена обработка холодильных камер, используемых на различных технологических этапах при производстве колбасных изделий на производственной базе компании «Генеральские колбасы». Было установлено, что изначально обильно обсемененные поверхности после обработки препаратом, содержащим 1% раствор 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.

Исследования активности ПААГ-М в отношении фитопатогенных микроорганизмов позволило установить их чувствительность к исследуемому препарату,

особенно выраженную для бактериальных патогенов: так для *P. carotovorum* и *X. campestris*, значения МПК составили 8 мкг/мл, а для *R. radiobacter* – 32 мкг/мл. Для фитопатогенных грибов ингибирующие концентрации ПААГ-М были выше и составили для *F. tricinctum* 125 мкг/мл, а для *P. fungicola* и *A. tubingensis* – 250 мкг/мл.

Полученные результаты позволили рассматривать ПААГ-М в качестве перспективного дезинфектанта для обработки контаминированных поверхностей.

Таким образом, высокая антимикробная активность ПААГ-М в отношении как планктонных форм условно-патогенных микроорганизмов, так и их биопленок, а также в отношении фитопатогенных бактерий и грибов открывает перспективы его использования в качестве эффективного антисептического и дезинфицирующего средства. Повышение эффективности и избирательности действия препаратов на основе ПААГ-М связано с возможностью использования вариантов полимера с различными физико-химическими характеристиками. Препараты, содержащие наноагрегаты флавоноидов, стабилизированные ПААГ-М, могут рассматриваться в качестве высокоэффективных комплексных средств с высокой регенерирующей и антимикробной активностью для лечения как неосложненных, так и гнойных ран.

ВЫВОДЫ

1. Установлена зависимость проявления антимикробной активности полиазиолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, от его физико-химических характеристик: в отношении грамотрицательных бактерий наибольшую активность проявили варианты ПААГ-М 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 ПААГ-М в отношении клеток микроскопических грибов не зависело от его молекулярной массы.

2. Выявлена прямая зависимость антимикробной активности полиазиолидинаммония, 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 полимера, что обеспечивало нарушение процесса формирования *in vitro* микробных биопленок условно-патогенных бактерий и микроскопических грибов при действии полиазиолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода.

4. Обработка экспериментальных гнойных ран лабораторных животных препаратом, содержащим полиазиолидинаммоний, 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 полиазиолидинаммония, 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 СОКРАЩЕНИЙ

- АБП – антибактериальные препараты
- АЛТ – аланинаминотрансфераза
- АСТ – аспаргатаминотрансфераза
- БГКП – бактерии группы кишечных палочек
- ИФ – индекс ферментемии
- ИАМ – индекс адгезии микроорганизмов
- КК – креатинкиназа
- МАФAnM – мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы
- КОЕ – колониеобразующая единица
- КФ – кислая фосфатаза
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа
- М.к. – микробные клетки
- МПА – мясо-пептонный агар
- МПБ – мясо-пептонный бульон
- МПК – минимальная подавляющая концентрация
- ПСБ – пенициллинсвязывающие белки
- ПААГ–М – полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат ионами йода
- ЩФ – щелочная фосфатаза
- LD₅₀ – средняя летальная доза
- MRS – метициллинрезистентные стафилококки
- MSS – метициллинчувствительные стафилококки

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдалкин, М.Е. Новый универсальный способ преодоления лекарственной устойчивости / М.Е. Абдалкин // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 10, 2. – С. 247–250.
2. Абышев, А.З. Современное состояние синтеза и исследования анти-ВИЧ активности соединений ряда 2Н-1-бензопиран-2-она / А.З. Абышев, С.В. Гадзиковский, В.Х. Нгуен // *Бутлеровские сообщения*. – 2013. – Т. 33. – № 1. – С. 1–21.
3. Аполлонин, А.В. Эндотоксинсвязывающие системы крови / А.В. Аполлонин, В.Г. Лиходед, М.Ю. Яковлев // *Журнал микробиологии*. – 1990. – № 11. – С. 100–106.
4. Артемов, В.С. Биохимия и морфология роста и развития цыплят кросса «Родонит–2» при включении в рацион лигфола: автореф. дис. ... канд. биол. наук / В.С. Артемов. – Воронеж, 2006. – 19 с.
5. Афиногенов, Г.Е. Антимикробные полимеры / Г.Е. Афиногенов, Е.Ф. Панарин. – СПб.: Гиппократ, 1993. – 264 с.
6. Афиногенова, А.Г. Влияние бигуанидов на формирование стрептококковой биопленки на модели культуры клеток фибробластов кожи эмбриона человека / А.Г. Афиногенова, К.Б. Грабовская, Е.В. Кулешевич // *Инфекции в хирургии*. – 2011. – № 1. – С. 3–11.
7. Афиногенова, А.Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // *Травматология и ортопедия России*. – 2011. – № 3 (61). – С. 119–125.
8. Ахмина, Н.И. Перинатальная охрана здоровья детей с конституциональной предрасположенностью к заболеваниям: автореф. дис. ... докт. мед. наук / Н.И. Ахмина. – Москва, 2000. – 37 с.
9. Базарный, В.А. Определение содержания интерлейкина-1 в биологических жидкостях / В.А. Базарный, Н.К. Левчик, М.М. Кохан // *Клин. лаборат. диагностика*. – 1999. – № 11. – С. 28.
10. Безопасность продовольственного сырья и продуктов питания: учебно-практическое пособие / Н.Н. Роева. – М., МГУТУ, 2009.

11. Бережанский, Б.В. Катетер-ассоциированные инфекции кровотока / Б.В. Бережанский, А.А. Жевнарев // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2006. – Т. 8. – №2. – С. 130–144.

12. Бехало, В.А. Иммунобиологические особенности бактериальных клеток медицинских биопленок / В.А. Бехало [и др.] // Журн. микробиол. – 2010. – № 4. – С. 97–105.

13. Бондаренко, В.М. Дезорганизация биопленок клинических штаммов стафилококков метаболитами лактобацилл / В.М. Бондаренко, О.В. Рыбальченко, О.Г. Орлова // Журн. микробиол. – 2010. – № 6. – С. 66–70.

14. Бубнова, Л.Н. Характеристика иммунокомпетентных клеток при некоторых органоспецифических аутоиммунных заболеваниях / Л.Н. Бубнова, Т.В. Глазнова, Т.С. Зубарева // Мед. иммунология. – 1999. – № 3–4. – С. 50–51.

15. Бут, А. Современная микробиология: Прокариоты: в 2-х томах / А. Бут; под ред. А. Ленглера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – Т.1. Пер. с англ. – М.: Мир, 2005. – 496 с.

16. Василькевич, А.И. Синтез фосфатидильного производного кинетинрибозиды с использованием фосфолипазы D *Streptomyces netropsis* / А.И. Василькевич [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2014. – Т. 58. – № 2. – С. 77–80.

17. Веденеева, Н.В. Экотоксикологическая характеристика полиазолидинаммоний ионогидрата и обоснование его использования в комбинированных системах очистки воды: автореф. дис... канд. биол. наук: 03.02.08 / Веденеева Наталья Владимировна. – Пенза, 2015. – 24 с.

18. Воинцева, И.И. Полигуанидины – дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы / И.И. Воинцева, П.А. Гембицкий. – М.: Изд-во «ЛКМ-пресс», 2009. – 304 с.

19. Волков, М.С. Глутаминовая кислота Биохимические механизмы практического использования / М.С. Волков, А.М. Генкин, Н.А. Глотов // Свердловск, 1975. – 225 с.

20. Волкова, М.В. Разработка экспериментальной живой вакцины для профилактики колибактериоза свиней: автореф. дис. ... канд. биол. наук / М.В. Волкова. – Саратов, 2006. – 24 с.

21. Гавриш, В.Г. Справочник ветеринарного врача / В.Г. Гавриш. – 4-е изд. – Ростов-на-Дону: «Феникс», 2003. – 576 с.

22. Гембицкий, П.А. Полимерный биоцидный препарат полигексаметиленгуанидина / П.А. Гембицкий, И.И. Воинцева. – Запорожье: Полиграф, 1998. – 44 с.

23. Гембицкий, П.А. Производство полигуанидиновых антисептиков / П.А. Гембицкий // Экологически безопасные полимерные биоциды. Сб. статей. Вып. 1. – М., 2000. – С. 5–7.

24. Голиков, П.П. Рецепторные механизмы глюкокортикоидного эффекта / П.П. Голиков. – М.: Медицина, 1988. – 288 с.

25. Голуб, А.В. Новые возможности профилактики инфекций области хирургического вмешательства / А.В. Голуб // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – № 1. – С. 56–66.

26. Гольденберг, И.Я. Естественная резистентность к туберкулезу в эксперименте / И.Я. Гольденберг; под ред. д-ра М.С. Сегаль и проф. М.М. Цехновицера. (Труды Украинского Мечниковского института; Т. 3) – Харьков, Укр. Мечников. ин-т, 1939 (ГОНТИ). – 182 с.

27. Гольцева, Е.В. Механизмы возникновения и пути преодоления резистентности у различных лекарственных препаратов / Е.В. Гольцева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 6. – С. 7–9.

28. Гостев, В.В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2. – № 3. – С. 4–15.

29. Данилевская, Н.В. Проблема антибиотикорезистентности на примере лечения сальмонеллеза у домашних голубей / Н.В. Данилевская, Н.В. Пименов // Российский ветеринарный журнал. – 2005. – № 4. – С. 21–25.

30. Демин, В.В. Зависимость адаптационных возможностей организма цыплят от возраста курнесушек: дис. ... канд. биол. наук / В.В. Демин. – Мичуринск, 2000. – 150 с.

31. Дьякова, М.Г. Химическая модификация полимеров 4-винилбензилхлорида и антимикробные свойства образующихся гидроксилсодержащих полимеров / М.Г. Дьякова [и др.] // Вестник МИТХТ. – 2012. – Т. 7. – № 2. – С. 66–70.

32. Дыкман, Л.А. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение / Л.А. Дыкман, В.А. Богатырев, С.Ю. Щёголев. – М: Наука, 2008. – 319 с.

33. Ерман, Б.А. Ультраструктурная патология инфекционных болезней / Б.А. Ерман [и др.] // Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1992. – 92 с.

34. Ермолов, А.С. Хирургия желчнокаменной болезни / А.С. Ермолов // Анналы хирургии. – 1998. – № 3. – С. 13–24.

35. Еропкин, М.Ю. Получение и биологическая активность комплексов сульфосодержащих полимерных анионов и гентамицина / М.Ю. Еропкин [и др.] // Эксперим. и клин. фарм. – 2009. – Т. 72. – № 5. – С. 38–42.

36. Забровская, А.В. Устойчивость к антимикробным препаратам сальмонелл, выделенных от животных и из продуктов в Ленинградской области в 2004–2010 гг. / А.В. Забровская [и др.] // Международный вестник ветеринарии. – № 3. – 2011. – С. 15–18.

37. Заярский Д.А., Портнов С.А., Матросов Н.А. Способ получения экстрактов растительного сырья и продуктов пчеловодства. Патент российской федерации № 2446852.

38. Заярский, Д.А. Исследование антимикробной активности структур «ядро-оболочка» на основе наноразмерных агрегатов флавоноидов / Д.А. Заярский, О.В. Нечаева, Н.В. Беспалова // Сборник материалов всероссийской молодежной конференции «Наукоемкие технологии и интеллектуальные системы в нанотехнологии» – Саратов, 2012. – С. 92–96.

39. Зырянов, С.К. Терапевтическая значимость фармакокинетики противогрибковых средств / С.К. Зырянов, М.В. Леонова // Клиническая фармакокинетика. – 2005. – Т. 2. – № 1. – С. 49–63.

40. Иванова, Н.Н. Антигрибковая активность липосомального тербинафина в отношении биоплёнок *Candida albicans* / Н.Н. Иванова, В.Н. Васильченко, А.П. Белозёров // Дерматология и венерология. – 2010. – №1. – С. 36–40.

41. Ильина, Т.С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Генетика. – 2004. – Т. 40. – № 11. – С. 1445–1456.

42. Караев, З.О. Влияние лекарственных препаратов на образование биопленок *Candida albicans* / З.О. Караев, Л.Р. Мамедова // Проблемы медицинской микологии. – 2010. – № 3. – С. 10–12.

43. Карпов, О.И. Клиническая фармакология растворимой формы амоксициллина клавуланата / О.И. Карпов // Фарматека. – 2005. – № 12. – С. 30–35.

44. Качество и безопасность продуктов питания: учебное пособие / З.В. Ловкис, И.М. Почицкая, И.В. Мельситова, В.В. Литвяк. – Минск: РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию»; БГУ, 2008. – 336 с.

45. Комаров, Ф.И. Биохимические исследования в клинике / Ф.И. Комаров, Б.Ф. Коровкин, В.В. Меньшиков. – Элиста: АПП Джангар, 1999. – 250 с.

46. Краснов В.А. Активированные кислородные метаболиты при туберкулезе / В.А. Краснов [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2005. – № 4. – С. 5–8.

47. Кудрявцев, Б.Б. Новое поколение биологически активных алкидных и водоземulsionных красок / Б.Б. Кудрявцев, А.Е. Недачин, А.Н. Данилов // Лакокрасочные материалы и их применение. – 2001. – №. 2–3. – С. 3–7.

48. Куликов, С.Н. Антибактериальная активность хитозана и его производных / С.Н. Куликов и др. // Материалы международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». – 2008. – С. 95–100.

49. Лагун, Л.В. Интенсивность образования микробных биопленок микроорганизмами, выделенными при пиелонефритах и мочекаменной болезни / Л.В. Лагун, Д.В. Тапальский, С.В. Жавороник // Медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 64–67.

50. Лесык, Р.Б. Тиазолидионы как лейтмотив в создании противоопухолевых лекарственных средств. Опыт научной группы медицинской химии ЛНМУ имени Данила Галицкого / Р.Б. Лесык, Б.С. Зименковский, Д.В. Каминский // *Biopolymers and cell.* – 2011. – Т. 27. – № 2. – С. 107–117.

51. Лиходед, В.Г. Роль эндотоксина грамотрицательных бактерий в инфекционной и неинфекционной патологии / В.Г. Лиходед, Н.Д. Ющук, М.Ю. Яковлев // *Архив патологии.* – 1996. – № 2. – С. 813.

52. Лопатнюк М. М. Конструирование и изучение штаммов стрептомицетов – гетерологических хозяев для биосинтеза моеномицина / М. М. Лопатнюк [и др.] // *Генетика.* – 2014. – Т. 50. – № 4. – С. 418–419.

53. Луговская, С.А. Лабораторная гематология / С.А. Луговская, В.Т. Морозова, М.Е. Почтарь. – М: Юнимед–пресс, 2002. – 115 с.

54. Льюис, К. Персистирующие клетки и загадка выживания биоплёнок / К. Льюис // *Биохимия.* – 2005. – № 70(2). – С. 36–327.

55. Лямин, А.В. Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективы / А.В. Лямин, Е.А. Боткин, А.В. Жестков // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* – 2012. – Т. 14. – № 1. – С. 17–22.

56. Лямин, А.В. Проблемы в медицине, связанные с бактериальными биопленками / А.В. Лямин, Е.А. Боткин, А.В. Жестков // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* – 2012. – Т. 14. – № 4. – С. 268–274.

57. Малинин, М.Л. Оценка устойчивости цыплят к колибактериозу по микробиологическим и биохимическим показателям: автореф. дис. ... канд. биол. наук / М.Л. Малинин. – Саратов, 2009. – 18 с.

58. Маянский, А.Н. Патогенетические аспекты нейтрофилзависимых реакций / А.Н. Маянский // *Патологическая физиология.* – 1989. – № 6. – С. 66–72.

59. Маянский, А.Н. Лекции по иммунологии / А.Н. Маянский. – Нижний Новгород: изд-во НГМА, 2003. – 272 с.

60. Маянский, А.Н. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение / А.Н. Маянский, И.В. Чеботарь // *Журн. микробиол.* – 2011. – № 1. – С. 101–108.

61. Медицинские лабораторные технологии / под ред. А.И. Карпищенко. – Справочник. Т. 2. – С-Пб.: Интермедика, 2002. – 600 с.
62. Менча, М.Н. Влияние дезинфектантов на формирование и удаление биопленок обрастания поверхностей оборудования систем питьевого водоснабжения / М.Н. Менча // Вестн. Полоцкого гос. ун-та. Прикл. науки: Пром-сть. Стр-во. – 2006. – № 9. – С. 162–168.
63. Микробиологическая порча пищевых продуктов / Под ред. К. Блэкберн; пер. с англ. В.Д. Широкова. – СПб.: Профессия, 2008. – 784 с.
64. Микробиология пищевых производств: учебное пособие / Петухова Е.В., Крыницкая А.Ю., Ржечицкая Л.Э. – Казань: Изд-во Казан. гос. тех - нол. ун-та, 2008. – 150 с.
65. Минаева, О.М. Антагонистическое действие на фитопатогенные грибы и стимулирующее влияние на рост, и развитие растений формальдегид утилизирующих бактерий *Pseudomonas sp.* В-6798 / О.М. Минаева, Е.Е. Акимова, С.Ю. Семенов // Вестник ТГУ. Биология. – 2008. – № 2 (3). – С. 28–42.
66. Миронов, А.В. Синдром кишечной недостаточности при распространенном перитоните: диагностика и методы энтеральной коррекции: дис. ... канд. мед. наук / А.В. Миронов. – М., 2011. – 150 с.
67. Михайлова, Е.С. Способность к формированию биопленок у микроорганизмов, выделенных из верхних отделов ЖКТ у больных хроническим холециститом и ЖКБ / Е.С. Михайлова [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2009. – № 7. – С. 76–77.
68. Мишин, В.Ю. Фторхинолоны в лечении туберкулеза органов дыхания / В.Ю. Мишин, И.Э. Степанян // Русский медицинский журнал. – 1999. – № 5. – С. 234–236.
69. Муравлева, Л.Е. Состояние окислительного метаболизма крови ВИЧ-инфицированных больных туберкулезом легких / Л.Е. Муравлева, Н.В. Козаченко, А.А. Пономарева // Сборник – резюме 11-го Национального конгресса по болезням органов дыхания. – М., 2001. – С. 230.

70. Мутенко, Г.В. Гены биосинтеза бутенолид-подобных сигнальных соединений у *Streptomyces ghanaensis*, их роль в продукции моеномицинов / Г.В. Мутенко [и др.] // Генетика. – 2014. – Т. 50. – № 6. – С. 650–651.

71. 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 науки и образования. – 2014. – № 1. – С. 32–36.

72. 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.

73. 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.

74. Нечаева, О.В. Антимикробная активность полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода / О.В. Нечаева [и др.] // ЖМЭИ. – 2015. – № 3 – С. 88–92.

75. Никонов, А.П. Вульвовагинальная инфекция / А.П. Никонов, О.Р. Асцатурова, Е.Н. Жуманова // Трудный пациент. – 2004. – № 5. – С. 15–19.

76. Ничипоренко, С.П. Метаболизм ароматических углеводов / С.П. Ничипоренко, Ю.С. Ротенберг // М.: ВИНТИ, 1981. – С. 117–156.

77. Орехов, Д.А. Иммунобиохимическая характеристика крови птицы при применении инактивированной липосомальной вакцины против колибактериоза: автореф. дисс... канд. вет. наук / Д.А. Орехов – С-Пб., 2008. – 20 с.

78. Падейская, Е.Н. Аминогликозиды – антимикробные препараты широкого спектра действия: значение в терапии бактериальных инфекций на современном этапе / Е.Н. Падейская // Consilium medicum. – 2006. – Т. 8. – № 1. – С. 24–34.

79. Панарин, Е.Ф. Полимеры – носители биологически активных веществ / Е.Ф. Панарин [и др.]. – СПб.: Изд-во Профессия, 2014. – 304 с.

80. Пат. № 2248393 РФ, МПК⁷С12N1/20. Штамм *Escherichia coli* Б–5, используемый для получения термолабильного экзотоксина / В.Н. Ласкавый, А.А. Щербаков, М.В. Волкова; Патентообладатель ГНУ Саратовский НИВИ Россельхозакадемии. – 2005. – Бюл. № 8.

81. Пат. РФ, МПК С 08 F 220/56, А 61 Р 31/12. Полимерные кетиминовые производные антибиотика доксицилина / М.В. Соловский, М.Ю. Смирнова, Е.Н. Власова (Российская Федерация). – № 2014101004; заявл. 15.01.14.

82. Порча пищевых продуктов: виды, причины и способы предотвращения / Леонтьев В.Н., Элькаиб Х.М. – труды БГУ, том 8, часть 1. – 2013. – С. 125–130.

83. Предтеченский, В.Е. Руководство по лабораторным методам исследования / В.Е. Предтеченский, В.М. Боровская, Л.Т. Марголина // М.: Медгиз, 1950. – 804 с.

84. Прозоровский, В.Б. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки / В.Б. Прозоровский, М.П. Прозоровская, В.М. Демченко // Фармакология и токсикология. – 1978. – № 4. – С. 497–502.

85. Пхакадзе, Т.Я. Антисептические и дезинфицирующие средства в профилактике нозокомиальных инфекций / Т.Я. Пхакадзе // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2002. – № 1. – Т. 4. – С. 42–48.

86. Раби, К. Локализованная и рассеянная внутрисосудистая коагуляция / К. Раби. – М.: Медицина, 1974. – 239 с.

87. Рекомендации по специфической профилактике колибактериоза поросят / В.Н. Ласкавый, М.В. Волкова. – Саратов: изд-во ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2007. – 9 с.

88. Ремеева, А.А. Методические особенности оценки адгезии тромбоцитов человека и кролика на поверхность полимерных материалов методами оптической и сканирующей электронной микроскопии / А.А. Ремеева, Е.А. Немец, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов, 2008, № 2, 38-45.

89. Романова, Ю.М. Бактериальная биопленка как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина / Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Журн. микробиол. – 2011. – № 3. – С. 99–109.

90. Романова, Ю.М. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками / Ю.М. Романова [и др.] // Вестн. РАМН. – 2011. – № 10. – С. 31–39.

91. Савилов, Е.Д. Условно-патогенные микроорганизмы в водных экосистемах Восточной Сибири и их роль в оценке качества вод / Е.Д. Савилов [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – № 1 (129). – С. 47–51.

92. Санитарно–эпидемиологические правила и нормативы СанПин 2.3.2.1078-01 Продовольственное сырье и пищевые продукты, гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.

93. Саттон, Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди. – М.: Мир, 2001. – 486 с.

94. Семёнов, В.М. Микробиологические и биологические аспекты резистентности к антимикробным препаратам / В.М. Семёнов, Т.И. Дмитраченко, И.В. Жильцов // Медицинские новости. – 2004. – № 2. – С. 10–17.

95. Сергеев, А.Ю. Грибковые инфекции: Руководство для врачей / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев. – М.: Бином, 2004. – 440 с.

96. Серебренникова, Е.С. Изучение антимикробной активности некоторых производных альгиновой кислоты / Е.С. Серебренникова [и др.] // Проблемы медицинской микологии. – 2013 – № 4. – С. 60–62.

97. Серегина, Н.В. Обзор биофизических особенностей микробной адгезии / Н.В. Серегина // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – № 3. – С. 175–177.

98. Сидоренко, С. В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом / С. В. Сидоренков // Клин. микробиология и антимикроб. химия. – 2001. – № 4. – С. 301–315.

99. Сидоренко, С.В. Исследования распространения антибиотикорезистентности: практическое значение для медицины / С.В. Сидоренко // Инфекции и антимикробная терапия. – 2002. – Т. 4. – № 2. – С. 38–41.

100. Сиротинин, Н.Н. Эволюция резистентности и реактивности организма / Н.Н. Сиротинин; под ред. А.Д. Адо. – М.: Медицина, 1981. – 235 с.
101. Скоупс, Р. Методы определения белков / Р. Скоупс – М.: Мир, 1985. – 360 с.
102. Смирнова, М.Ю. Синтез и исследование новых биологически активных полимеров – полимерных кетиминовых производных антибиотика доксициклина / М.Ю. Смирнова, М.В. Соловский // Материалы конференции для студентов и молодых ученых «Политехнический фестиваль», 16–17 декабря 2012 г. – Санкт-Петербург, 2012. – С. 165–167.
103. Смирнова, Т.А. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок / Т.А. Смирнова [и др.] // Микробиология. – 2010. – Т. 79. – № 4. – С. 435–446.
104. Соболева, А.В. Хромато масс спектрометрический анализ антимикробных пептидов из культуры *Lactobacillus plantarum* 8 PA-3 / А.В. Соболева, А.А. Колобов, Т.В. Гришина // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 3; URL: www.science-education.ru/117-13561
105. Соловский, М.В. Комплексы антибиотиков-аминогликозидов с сополимерами акриламида с акриловой и метакриловой кислотами. / М.В. Соловский [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 2010. – Т. 44. – № 6. – С. 28–32.
106. Соловский, М.В. Синтез полимерных эфиров антибиотика цефуроксима / М.В. Соловский, М.С. Борисенко, М.Ю. Смирнова // Хим.-фарм. журн. – 2011. – Т. 45. – № 10. – С. 14–16.
107. Соловьева, О.В. Рациональные подходы к антибиотикотерапии у животных при хирургических вмешательствах / О.В. Соловьева // Российский ветеринарный журнал. – 2006. – № 1. – С. 35–40.
108. Субботин, В.М. Современные лекарственные средства в ветеринарии / В.М. Субботин, С.Г. Субботина, И.Д. Александров // Серия «Ветеринария и животноводство». – Ростов-на-Дону: Феникс, 2000. – 592 с.
109. Супотницкий, М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий / М.В. Супотницкий // Биопрепараты. – 2011. – № 2. – С. 4–44.
110. Тец, В.В. Микроорганизмы и антибиотики. Инфекции кожи, мягких тканей, костей и суставов – СПб.: КЛЕ-Т, 2006. – 128 с.

111.Товмасын, А.С. Значение симбиотических взаимодействий биогенного стрептококка при хроническом тонзиллите: автореферат дисс. ... канд. мед. наук / А.С. Товмасын. – М., 2009. – 24 с.

112.Туркутюков, В.Б. Молекулярно-генетический мониторинг резистентности микроорганизмов к антибиотикам / В.Б. Туркутюков // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2011. – № 2. – С. 28–31.

113.Ульянов, В.Ю. Способность госпитальных штаммов *St. aureus* к пленкообразованию / В.Ю. Ульянов, И.О. Лунева, Е.В. Ульянова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – № 5. – С. 89.

114.Ульянов, В.Ю. Способность госпитальных штаммов *Ps. aeruginosa* к пленкообразованию / В.Ю. Ульянов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – № 2. – С. 52.

115.Федеральный закон от 30.03.1999 N 52-ФЗ (ред. от 13.07.2015) "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения"

116.Федорова, Л.С. Изучение возможности применения полимерных производных гуанидина для дезинфекции при туберкулезе / Л.С. Федорова // Перспективные биоцидные материалы и технологии с использованием полигексаметиленгуанидина. – М.: Ин-т эколого-технологических проблем, 2000. – С. 67.

117.Фитопатогенные микроорганизмы: учебное методический комплекс для студентов биол. фак. спец. G - 31 01 01 «Биология» / Р. А. Желдакова, В. Е. Мямин. – Мн.: БГУ, 2006. – 116 с.

118.Фрейдлин, И.С. Методы оценки свойств мононуклеарных фагоцитов и их изменений под влиянием биологически активных веществ / И.С. Фрейдлин, А.Г. Гончаров, В.С. Смирнов // Актуальные вопросы иммунологии, аллергологии и молекулярной биологии. Научные труды. – 1978. – Т. 63. – С. 43–45.

119.Фрейдлин, И.С. Иммунные комплексы и цитокины / И.С. Фрейдлин, С.А. Кузнецова // Мед. радиология. – 1999. – № 1–2. – С. 27–36.

120.Цибулевский, А.Ю. Микроэкология человека (Часть II) / А.Ю. Цибулевский, А.В. Соколов // Успехи современного естествознания. – 2008. – № 7. – С. 22–26.

121.Цынкаловский, Р.Б. Фагоцитоз и теория иммунитета / Р.Б. Цынкаловский // Актуальные вопросы иммунологии, аллергологии и молекулярной биологии. Научные труды. – 1978. – Т. 63. – С. 35–42.

122.Чеботарь, И.В. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий / И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Е.Д. Кончакова // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2012. – Т. 14. – № 1. – С. 51– 58.

123.Честнова, Т.В. Современные представления о физико-химических особенностях существования бактерий в составе биоплёнок / Т.В. Честнова, Н.В. Серёгина // Общественное здоровье и здравоохранение: профилактическая и клиническая медицина // XXXXV научно-практическая конференция профессорско-преподавательского состава ТулГУ / ТулГУ, 2009. – С. 138.

124.Шехтман, М.М. Материнская заболеваемость и смертность при экстрагени- тальной патологии / М.М. Шехтман, З.З. Токова // Акуш. и гин. – 1991. – С. 54–57.

125.Шмальгаузен, Г. Биологические и физиологические биоритмы / Г. Шмальгаузен, Г.Б. Хэйл // Основы космической биологии и медицины. – М.: Наука, 1975. – Т. 2. – кн. 2. – С. 139–152.

126.Шорникова, Е.А. Оценка санитарно-микробиологического состояния во- дотоков бассейна широтного отрезка Средней Оби / Е.А. Шорникова, А.В. Куяров // Проблемы региональной экологии. – 2007. – № 4. – С. 95–99.

127.Штерншис, М.В. Биологическая защита растений: Учеб. для вузов. М.: Колос, 2004. – 264 с.

128.Юсупова, Г.Г. Обеспечение микробиологической стабильности и без- опасности зерна, продуктов его переработки и хлеба: автореф. дис. ... докт. сельс. наук / Г.Г. Юсупова. – М., 2008. – 36 с.

129.Aitzetmuller, K. Gradient elution of fats and oils with light scattering detec- tion / K. Aitzetmuller, M. Gronheim // Fat. Sci. Technol. – 1993. – V. 95 – P. 164–168.

130.Alexander, H. Leprosy in Guyana, 1990–95: lepra elective study / H. Alexan- der, R. Persaud // Lepr. Rev. – 1997. – V. 68 (1) – P.83–89.

131.Alving, C.R. Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunological adjuvants / C.R. Alving // Immunobiology. – 1993. – V. 187 – P. 430–446.

132.Amano, E. Improved detection of nitric oxide radical (NO) production in an activated macrophage culture with a radical scavenger, carboxy PTIO and Griess reagent / E. Amano, T. Noda // FEBS Lett. – 1995. – V. 368(3) – P. 425–428.

133.Ansaruzzaman, M. A *Klebsiella pneumoniae* strain that shares a type-specific antigen with *Shigella flexneri* serotype 6. Characterization of the strain and structural studies of the O-antigenic polysaccharide / M. Ansaruzzaman, M. Albert, T. Holme // Eur. J. Biochem. – 1996. – V. 237 – P. 786–791.

134.Aparna, M.S. Biofilms: microbes and disease / M.S. Aparna, S. Yadav // Braz. J. Infect. Dis. – 2008. – V. 12(6) – P.526–530.

135.Aubry-Damon, Y. Antimicrobial Resistance in Commensal Flora of Pig Farm / Y. Aubry-Damon [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2004. – V. 10(5) –P. 8773-9

136.Azeredo, J. The use of phages for the removal of infectious biofilms / J. Azeredo, I.W. Sutherland // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2008. –V. 9 (4) – P. 261–266.

137.Bagge, N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production / N. Bagge // Antimicrob Agents Chemother. – 2004. –V. 48 – P. 1175–87.

138.Balestrino, D. Eradication of microorganisms embedded in biofilm by an ethanol-based catheter lock solution / D. Balestrino, B. Souweine, N. Charbonnel // Nephrol. Dial. Transplant. – 2009. –V. 24 – P. 3204–3209.

139.Beaudeau, P. In situ measurement and statistical modeling of *E. coli* decay in small rivers / P. Beaudeau [et al.] // Water Res. – 2001. – V. 35(18) – P. 3168–3178.

140.Bennett, P.M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria / P.M. Bennett // Brit. J. Pharmacol. – 2008. – V. 153 – P. 347–357.

141.Carson, L. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* / L. Carson, S.P. Gorman, B.F. Gilmore // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2010. – V. 59 (3) – P. 447–455.

142.Casellas, JM.Jr. Amoxicillin-sulbactam versus amoxicillin-clavulanic acid for the treatment of non-recurrent-acute otitis media in Argentinean children / JM.Jr.

Casellas, V. Israele, M. Marin // Int J Pediatr Otorhinolaryngol – 2005. – V. 69(9) – P. 1225–33.

143.Chen, L. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies / L. Chen, Y.M. Wen // Int. J. Oral. Sci. – 2011. – V. 3(2) – P. 66–73.

144.Cho, S.H. Detection of the *ica*A_{DB}C gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections / S.H. Cho [et al.] // Int. J. Antim. Agen. – 2002. – V. 19(6) – P. 570–575.

145.Chung, Y.C. Antibacterial characteristics and activity of acid – soluble chitosan / Y.C. Chung, C.Y. Chen // Bioresource Technol. – 2008. – V.99 (8) – P. 2806–2814.

146.Collery, M.M. Molecular typing of nasal carriage isolates of *Staphylococcus aureus* from an Irish university student population based on toxin gene PCR, *agr* locus types and multiple locus, ariable number tandem repeat analysis / Mark M. Collery [et al.] // J. of Med. Microb. – 2008. – V. 57 – P. 348–358.

147.Collignon, P. Resistant *Escherichia coli* – we are what we eat / P. Collignon // Clinical Infectious diseases. – 2009. – V. 49(2) – P. 202–204.

148.Compans, R.W. Current Topics in Microbiology and Immunology / R.W. Compans, M.D. Cooper // Curr Top Microbiol Immunol. Series Editors. – Vol. 322. – 2003. – P. 159–172.

149.Conlon, K. M. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* / K. M. Conlon, H. Humphreys, J. P. O’Gara // J Bacteriol.– 2002. – V. 184 – P. 4400–4408.

150.Costerton, J.W. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections / J.W. Costerton, R. Veeh, M. Shirtliff // J. Clin. Invest. – 2003. –V. 112(10) – P. 1466–1477.

151.Curtin, J.J. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis* / J.J. Curtin, R.M. Donlan // Antimicrob Agents Chemother. – 2006. – V. 50 – P. 1268–1275.

152.Darouiche, R.O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence / R.O. Darouiche // Clin. Infect. Dis. – 2001. – V. 33(9) – P. 1567–1572.

153.Davies, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes / J. Davies // Science. – 1994. – V. 264 – P. 375–382.

154.Diemond-Hernandez, B. Production of icaADBC encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections / B. Diemond-Hernandez [et al.] // BMC Infect. Dis. – 2010. – V. 10 – P. 68–74.

155.Dimick, J.B. Increased resource use associated with catheter-related bloodstream infection in the surgical intensive care unit / J.B. Dimick, R.K. Pelz, R. Conunji // Arch. Surg. – 2001. – V. 136 – P. 229–234.

156.Dong, Y.H. A novel two-component system BqsS-BqsR modulates quorum sensing-dependent biofilm decay in *Pseudomonas aeruginosa* / Y.H Dong [et al.] // Commun Integr Biol. – 2008. – V.1 – P. 88-96

157.Donlan, R.M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process / R.M. Donlan // Clin. Infect. Dis. – 2001. – V. 33(8) – P. 1387– 1392.

158.Donlan, R.M. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms / R.M. Donlan, J.W. Costerton // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. –V. 15(2) – P. 167–193.

159.Donlan, R.M. Biofilm elimination on intravascular catheters: important consideration for the infectious disease practitioner / R.M. Donlan // Healthcare epidemiology. – 2011. – V. 52 (15) – P. 1038–1043.

160.Drucker, V.V. Potentially pathogenic bacteria in a microbial community of Lake Baikal / V.V. Drucker, E.Yu. Panasyuk // Hydrobiologia. – 2006. – V. 568 – P. 267–271.

161.Duan, K. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication / K. Duan [et al.] // Mol Microbiol. – 2003. – V. 50 – P 1477–1491.

162.Finlay, J. A review of the antimicrobial activity of clavulanate / J. Finlay, L. Miller, J.A. Poupard // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – V. 52. – P. 18–23.

163. Flemming, H.C. Control of biofilms in industrial waters and processes / H.-C. Flemming, T. Griebe // *Biofouling of Industrial Waters and Processes*. John Wiley and Sons Ltd. Chichester. – 2000. – P. 125–141.
164. Gotz, F. Staphylococcus and biofilms / F. Gotz // *Mol. Microb.* – 2002. – V. 43(6) – P. 1367–1378.
165. Gunten, U. Ozonation of drinking water: Part 2. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine / U. Gunten // *J. Water research.* – 2003. – V. 37 – P. 1469–1487.
166. Johansen, C Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms / C Johansen, P Falholt, L. Gram // *App. Environ. Microbiol.* – 1997. – V 63 – P. 3724–3728.
167. Hall-Stoodley, L. Evolving concepts in biofilm infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // *Cell Microbiol.* – 2009. – V. 11(7) – P. 1034–1043.
168. Harriott, M.M *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa / M.M Harriott [et al] // *Microbiology.* – 2010. – V. 156. – P. 3635–44.
169. Haugo, A. J. *Vibrio cholerae* Cyt R is a repressor of biofilm development / A. J. Haugo, P. I. Watnick // *Mol. Microbiol.* – 2002. – V. 45. – P. 471–483.
170. Hegde, S. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA / S. Hegde [et al] // *Science.* – 2005. – V. 308 – P. 1480–1483.
171. Hoek, A. Acquired antibiotic resistance genes: an overview / A. Hoek [et al] // *Front. Microbiol.* – 2011. – V. 2 – Article 203.
172. Holmberg, A. Effectiveness of ciprofloxacin or linezolid in combination with rifampicin against *Enterococcus faecalis* in biofilms / A. Holmberg, M. Morgelin, M. Rasmussen // *J. Antimicrob. Chemoter.* – 2012. – V. 67 (2) – P. 433–439.
173. Hopkins, K.L. Multiresistant *Salmonella enteric* serovar 4: [5], 12: i: - in Europe: a new pandemic strain? / K.L. Hopkins // *Eurosurveillance.* – 2010. – V. 15(22) – P. 1-9
174. Huang, C.T. Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation / C.T. Huang // *Appl Environ Microbiol.* – 1998. – V. 64 – P. 1526-31.

175. Jenal, U. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria / U. Jenal, J. Malone // *Ann Rev Genetics*. – 2006. – V. 40 – P. 385–407.
176. Jeong, J.-H. Poly (styrene-alt-maleic anhydride)-4-aminophenol conjugate: synthesis and antibacterial activity / J.-H. Jeong, Y.-S. Byoun, Y.-S. Lee // *React. & Funct. Polym.* – 2002. – V. 50(3) – P. 257–263.
177. Kaldalu, N. Killing by ampicillin and ofloxacin induces overlapping changes in *Escherichia coli* transcription profile / N. Kaldalu, R. Mei, K. Lewis // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2004. – V. 48 – P. 890-6.
178. Kaminsky, D. Synthesis and in vitro anticancer activity of 2,4-azolidinedione-acetic acids derivatives / D. Kaminsky, B. Zimenkovsky, R. Lesyk // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2009. – V. 44(9) – P. 3627–3636.
179. Kandemir, O. Clarithromycin destroys biofilms and enhances bactericidal agents in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis / O. Kandemir, V. Oztuna, A. Milcan // *Clin Orthopaed Related Research*. – 2005. – V. 430 – P. 171–5.
180. Keenleyside, W.J. A plasmid-encoded rfb 0:54 gene cluster is required for biosynthesis of the 0:54 antigen in *Salmonella enterica* serovar Borreze / W.J. Keenleyside, M. Perry, L. Mac Lean // *Mol. Microbiol.* – 1994. – V. 11 – P. 437–448.
181. Khan, S. A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections / S. Khan, P. Everest, S. Servos // *Mol. Microbiol.* – 1998. – V. 29 – P. 571–579.
182. Lee, Y.-S. Poly (styrene-co-4- vinylbenzyl chloride) conjugated with 3- (dimethylamino) phenol / Y.-S. Lee, Y.-S. Byoun // *Bull. Korean Chem. Soc.* – 2002. – V. 23(12) – P. 1833–1835.
183. Lewis, K. Pathogen resistance as the origin of kin altruism / K. Lewis // *J Theor Biol.* – 1998. – V. 193 – P. 359–63.
184. Lewis K. Persister cells / K. Lewis // *Annu Rev Microbiol.* – 2010. – V. 64 – P. 357–72.
185. Li, M. Genetic polymorphism of the accessory gene regulator (agr) locus in *Staphylococcus epidermidis* and its association with pathogenicity / M. Li [et al.] // *J. of Med. Microb.* – 2004. – V. 53 – P. 545–549.

- 186.Lynch, A.S. Bacterial and fungal biofilm infections / A.S. Lynch, G.T. Robertson // *Annu. Rev. Med.* – 2008. – V. 59 – P. 415–428.
- 187.Mah, T.F. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents / T.F. Mah, G.A. O’Toole // *Trends in Microbiology.* – 2001. – V. 9 – P. 34–9.
- 188.Mah, T.F. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance / T.-F. Mah // *Nature.* – 2003. – V. 426 – P. 306–10.
- 189.Mariani-Kurkdjian, P, Extended-spectrum beta-lactamase producing-enterobacteriaceae / P. Mariani-Kurkdjian, C. Doit, E. Bingen // *Arch Pediatr.* 2012. – Nov. 19. – Suppl. 3. – P. 93–6.
- 190.Mashburn-Warren, L.M. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes / L.M. Mashburn-Warren, M. Whiteley // *Molecular Microbiology.* – 2006. – V. 61(4) – P. 839–846.
- 191.Miller, A. A. Repression of virulence genes by phosphorylation-dependent oligomerization of CsrR at target promoters in *S. pyogenes* / A. A. Miller, N. C. Engleberg, V. J. DiRita // *Mol. Microbiol.* – 2001. – V.40 – P. 976–990.
- 192.Mingeot-Leclercq, M.-P. Aminoglycosides: activity and Resistance / M.–P. Mingeot-Leclercq, Y. Glupczynski, P.M. Tulkens // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1999. – V. 43 – P. 727–737.
- 193.Monfardini, C. Stabilization of substances in circulation / C. Monfardini, F. M. Veronese // *Bioconjugate Chem.* – 1998. – V. 9(4) – P. 415–450.
- 194.Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria / H. Nikaido // *Annu Rev Biochem.* – 2009. – V. 78 – P. 119–146.
- 195.Nonaka, T. Preparation of resins containing phenol derivatives from chloromethylstyrene-tetraethyleneglycol dimethacrylate copolymer beads and antibacterial activity of resins / T. Nonaka [et al] // *J. Appl. Polym. Sci.* – 1997. – V. 66(8) – P. 1621–1630.
- 196.Orsi, G.B. Hospital-acquired, laboratory-confirmed bloodstream infection: increased hospital stay and direct costs / Orsi G.B. [et al] // *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* – 2002. – V. 23 – P. 190–197.

197.O'Toole, G. A. Biofilm formation as microbial development / G. A. O'Toole, H. Kaplan, R. Kolter // *Annu Rev Microbiol.* – 2000. – V. 54 – P. 49–79.

198.Pace, J.L. Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy / J.L. Pace. – Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. – 495 p.

199.Pascual, A. Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs / A. Pascual // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2002. – V. 8(5) – P. 256–264.

200.Petrelli, D. Analysis of meticillin-susceptible and meticillinresistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital / D. Petrelli [et al.] // *J. of Med. Microb.* – 2008. – V. 57 – P. 364–372.

201.Pittet, D. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients: excess length of stay, extra costs and attributable mortality / D. Pittet, D. Tarara, R. P. Wenzel // *JAMA.* – 1994. – V. 271 – P. 1598–1601.

202.Qin, Z. Formation and properties of in vitro biofilms of icanegative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates / Z. Qin [et al.] // *J. of Med. Microb.* – 2007. – V. 56 – P. 83–93.

203.Raad, I. In vitro and ex vivo activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces / I. Raad, I. Chatzinikolaou, G. Chaiban // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – V. 47(11) – P. 3580–3585.

204.Ren, D. Gene expression in *Escherichia coli* biofilms / D. Ren // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2004. – V. 64 – P. 515–24.

205.Rock, F.L. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll / F.L. Rock, G. Hardiman, J.C. Timans // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – V. 95 – P. 588–593.

206.Rogers, K.L. Coagulase-negative staphylococcal infections / K.L. Rogers, P.D. Fey, M.E. Rupp // *Infect. Dis. Clin. North. Am.* – 2009. – V. 23 – P. 73–98.

207.Römling, U. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies / U. Römling, C. Balsalobre // *J. Intern. Med.* – 2012. – V. 272(6) – P. 54–561.

208.Shtilman, M.I. Polymers in the drug systems / M.I. Shtilman // *Rus. J. Biopharm.* – 2009. – V. 1(2) – P. 5–14.

209.Smirnova, M.Yu. Synthesis and investigation of polymer ketimine derivatives of doxycycline antibiotic / M.Yu. Smirnova, M.V. Solovskij, E.B. Tarabukina // Baltic polymer symposium 2011 “BPS 2011”, 21–24 September 2011. – Pärnu, Estonia. – 2011. – P. 70.

210.Smith, K. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus* / K. Smith [et al.] // J. of Med. Microb. – 2008. – V. 57 – P. 1018–1023.

211.Somerville, J.E. A novel *Escherichia coli* lipid A mutant that produces an anti-inflammatory lipopolysaccharide / J.E. Somerville, L. Cassiano, B. Bainbridge // J. Clin. Invest. – 1996. – V. 97 – P. 359–365.

212.Staubach, K.H. A new endotoxin adsorption device in Gram–negative sepsis: use of immobilized albumin with the MATISSE adsorber / K.H. Staubach, M. Boehme, M. Zimmermann // Transfus Apheresis Sci. – 2003 – V. 29(1) – P. 93–98.

213.Stěpánek, J. A new polyvalent vaccine against enteral infections in newborn calves / J. Stěpánek, J. Hampl, D. Pokorová // J. Franz. Vet. Med. – 1987. – V. 32(2) – P. 65–80.

214.Street, C.N. In vitro photodynamic eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm culture / C.N. Street, A. Gibbs, L. Pedigo // Photochem. Photobiol. – 2009. – V. 85(1) – P. 137–143.

215.Tashiro, T. Antibacterial and bacterium adsorbing macromolecules / T. Tashiro // Macromol. Mater. Eng. – 2001. – V. 286(2) – P. 63–87.

216.Tikhomirova, E.I. Properties of poly azolidine ammonium modified by hydrate halogen ions and biological products on its basis / E.I. Tikhomirova [et al.] // Biomaterials and Nanobiomaterials: recent advances safety-toxicology and ecology issues: 5th internat. cong. – Heraklion, 2014. – P. 21.

217.Tormo, M.A. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? / M.A´ngeles Tormo [et al.] // Microbiology. – 2005. – V. 151 – P. 2465–2475.

218.Tormo, M.A. Phase-variable expression of the biofilm-associated protein (Bap) in *Staphylococcus aureus* / M.A´ngeles Tormo [et al.] // Microbiology. – 2007. – V. 153 – P. 1702–1710.

219.Trampuz, A. Infections associated with orthopedic implants / A. Trampuz, A. F. Widmer // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2006. – V. 19(4) – P. 349–356.

220.Tré-Hardy, M. Evaluation of long-term co-administration of tobramycin and clarithromycin in a mature biofilm model of cystic fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* / M. Tré-Hardy // *Int J Antimicrob Agents.* – 2009. – V. 34 – P. 370-4.

221.Tré-Hardy, M. Efficacy of the combination of tobramycin and a macrolide in an in vitro *Pseudomonas aeruginosa* mature biofilm model / M. Tré-Hardy [et al] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – V. 54 – P. 4409–15.

222.Vergara-Irigaray, M. Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface / M. Vergara-Irigaray [et al.] // *Microbiology.* – 2008. – V. 154 – P. 865–877.

223.Vu, B. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation / B. Vu [et al.] // *Molecules.* – 2009. – V. 14(7) – P. 2535–2554.

224.Wagner, V.E. Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Ps. aeruginosa* / V.E. Wagner, R.J. Gillis, B.N. Iglewsky // *Vaccine.* – 2004. – V. 22 – P. 15–20.

225.Warnes, SL. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes on abiotic touch surfaces: implications for public health / SL. Warnes, CJ. Highmore, CW. Keevil. // *MBio.* – 2012. – Nov 27. – V. 3 (6).

226.Whiteley, M. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / M. Whiteley // *Nature.* – 2001. – V. 413 – P. 860–4.

227.Wolcott, R. The polymicrobial nature of biofilm infection / R. Wolcott [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2013. – V. 19(2) – P. 107–112.

228.Wozniak, D.J. Effects of subinhibitory concentrations of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* / D.J. Wozniak, R. Keyser // *Chest.* – 2004. – 125 (Suppl.). – P. 62–69.

229.Yao, Y. Genomewide Analysis of Gene Expression in *Staphylococcus epidermidis* Biofilms: Insights into the Pathophysiology of *S. epidermidis* Biofilms and the Role of Phenol-Soluble Modulins in Formation of Biofilms / Y. Yao [et al.] // *J. of Inf. Dis.* – 2005. – V. 191 – P. 289–298.

230. Yasuda, H. Interaction between biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and clarithromycin / H. Yasuda [et al] // Antimicrob Agents Chemother. – 1993. – V. 37 – P. 1749–55.

231. Yasuda, H. Interaction between clarithromycin and biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis* / H. Yasuda [et al] // Antimicrob Agents Chemother. – 1994. – V. 38 – P. 138–41.