

На правах рукописи

НЕЧАЕВА ОЛЬГА ВИКТОРОВНА

**ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИМЕРНЫХ И
ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК
НА МИКРООРГАНИЗМЫ И РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ
НА ИХ ОСНОВЕ ИННОВАЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Саратов 2013

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

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Тихомирова Елена Ивановна

Официальные
оппоненты:

Щербаков Анатолий Анисимович
доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»,
профессор кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии

Кравцов Александр Леонидович
доктор биологических наук, старший научный сотрудник
ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора,
ведущий научный сотрудник лаборатории вакцинологии и профилактики отдела иммунологии

Потатуркина-Нестерова Наталия Иосифовна
доктор медицинских наук, профессор ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет»,
заведующая курсом микробиологии кафедры общей и клинической фармакологии с курсом микробиологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микробиологии Российской академии наук

Защита диссертации состоится «19» декабря 2013 года в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.061.04 при ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» (410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, диссертационный зал).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 20__ года.

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 410012, г. Саратов, Театральная пл., 1, ученому секретарю диссертационного совета.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук,
профессор

Карпунина Лидия Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Одной из актуальных задач современной прикладной микробиологии является поиск, разработка и внедрение новых препаратов как антимикробного действия, так и способствующих сохранению и восстановлению жизнеспособности коллекционных штаммов микроорганизмов, в том числе и штаммов – продуцентов.

Важнейшим достижением медицины второй половины XX стало открытие антибиотиков, без которых в настоящее время невозможно лечение инфекционных заболеваний (Сазыкин, 1999; Тец, 2006). За последние десятилетия создано большое количество высокоэффективных антибиотиков и химиотерапевтических препаратов (Егоров, 1999; Страчунский и др., 2001; Яковлев и др., 2003). Развитию химиотерапии способствовали достижения в области биотехнологии, общей и клинической микробиологии, выявление механизмов действия антимикробных препаратов и резистентности микроорганизмов.

Важной проблемой, возникающей при химиотерапии, является формирование устойчивости микроорганизмов к лекарственным препаратам. Различают природную и приобретенную лекарственную устойчивость. Актуальной проблемой является именно приобретенная устойчивость, которая возникает у микроорганизмов в процессе этиотропной терапии (Сидоренко, 2002).

В последние годы повышение эффективности применения антимикробных препаратов связывают с преодолением лекарственной устойчивости микроорганизмов. Согласно «Декларации по борьбе с антимикробной резистентностью» (Торонто, 2000) и разработанной ВОЗ «Глобальной стратегии по сдерживанию роста устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам» (Женева, 2001) преодоление лекарственной устойчивости может быть достигнуто благодаря следующим мероприятиям: рациональной химиотерапии и контролю назначения химиотерапевтических препаратов, мониторингу антибиоти-корезистентных микроорганизмов в лечебно-профилактических учреждениях, разработке и внедрению в лечебную практику новых антимикробных препаратов. В этой связи поиск новых химических соединений, обладающих выраженной антимикробной активностью, является актуальным. Необходимость в новых препаратах связана также с расширением их антимикробного спектра, повышением активности в отношении полирезистентных возбудителей, снижением токсических свойств.

Одним из перспективных направлений отбора новых препаратов, обладающих антимикробной активностью, является направленный синтез химических соединений с заданными биологическими свойствами (Дубровина, 2009). Это связано с выявлением зависимости химической структуры синтетических соединений с их противомикробной активностью (Ботаева и др., 2008; Чернов и др., 2008).

Многие гетероциклические соединения помимо антимикробной активности характеризуются выраженными антиоксидантными свойствами. Поэтому еще одним перспективным направлением использования гетероциклических соединений в медико-биологической практике является их включение в состав сред для повышения жизнеспособности коллекционных штаммов микроорганизмов, находящихся в условиях окислительного стресса в процессе хранения (Плотников и др., 1993; Липатова и др., 1995; Новикова и др., 2001).

На современном этапе развития науки особую значимость приобретают нанотехнологии, которые внедряются практически во все сферы деятельности человека, в том числе в медицинскую и биологическую практику. Развитию нанотехнологии

способствовало открытие и исследование областей применения углеродных наноструктур: фуллеренов, углеродных нанотрубок и графена. Имеется большое количество разработок использования наноструктур в медицине, ветеринарии и биологии в качестве диагностических и лекарственных средств. На основе углеродных нанотрубок создаются биосенсоры, позволяющие определять специфические вещества внутри клеток или видоизмененные клетки, что играет важную роль в диагностике онкологических заболеваний. Создаются наноконтейнеры на основе углеродных нанотрубок для адресной доставки терапевтических генов и лекарственных препаратов, что способствует повышению их биодоступности и эффективности лечения. Нанотехнологические препараты находят свое применение в диагностике и лечении инфекционных заболеваний. Ведутся разработки в области создания наноносителей антигенных компонентов для формирования длительного иммунного ответа против респираторных вирусов. Однако в литературе практически отсутствуют сведения о применении наноструктур в микробиологической практике и их влиянии на функциональную активность представителей микробиоценозов организма человека и животных.

Большой научный интерес представляют на настоящий момент исследования антимикробных свойств биосовместимых полимеров и их наноструктурированных форм (Заярский и др., 2012). Это связано с возможностью создания инновационных препаратов с заданной структурой по типу «ядро-оболочка», позволяющих избежать патологической реакции макроорганизма и обеспечить адресное специфическое действие.

Степень разработанности проблемы.

Исследованиями ряда авторов показана перспективность использования в качестве антимикробных средств различных гетероциклических соединений (Мельников, 1994; Маркова, 1996; Вишняков, 2001; Селезнева, 2001; Кравченко, 2003; Шуб и др., 2003; Корженевич и др., 2004; Райкова и др., 2004; Жандарев и др., 2006; Пименова и др., 2006; Пермякова и др., 2009; Зинина и др., 2012).

Вопросы использования гетероциклических соединений в качестве антиоксидантов, входящих в состав стабилизационных сред защиты в процессе консервации микроорганизмов и изменяющих уровень собственных антиокислительных систем бактериальной клетки, рассмотрены в работах О.П. Плотникова и др. (1993, 1999), Е.В. Липатовой и др. (1995), Н.С. Смирновой и др. (1995), А.И. Осадчей и др. (2002), О.В. Нечаевой (2004, 2010), Н.Ф. Пермяковой и др. (2010).

Результаты исследований по использованию углеродных наноструктур в микро-биологической практике представлены в работах следующих авторов: М. Маркман, Дж.Л. Уалкер (2006), В.П. Терещенко и др. (2010), М. Kumar et al. (2003), W. Wu et al. (2005), J.S. Kim et al. (2007), D. Perr et al. (2007), S.C. McMain et al. (2008), K. Welsher et al. (2008), G.A. Zelada-Guillén et al. (2009), B. Kang et al. (2010).

В связи с актуальностью и востребованностью решения указанных выше вопросов **целью нашей работы** явилось исследование действия наноструктур на основе биосовместимых полимеров, углеродных нанотрубок и вновь синтезированных гетероциклических соединений на референс-штаммы и клинические изоляты микроорганизмов, отбор веществ с выраженными антимикробными и антиоксидантными свойствами и обоснование технологии создания на их основе инновационных препаратов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи**:

1. Изучить действие многостенных углеродных нанотрубок на биологические свойства референс-штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий;

определить способность бактерий использовать многостенные углеродные нанотрубки в качестве единственного источника углерода.

2. Установить влияние многостенных углеродных нанотрубок на выживаемость микроорганизмов при воздействии синего светодиодного излучения (405 нм).

3. Изучить антимикробную активность и токсичность полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов, и его наноструктурированных вариантов.

4. Изучить биологическую активность гетероциклических соединений нового ряда и отобрать соединения с выраженными антибактериальными, фунгицидными, противовирусными и антиоксидантными свойствами.

5. Исследовать зависимость проявления антимикробных и антиоксидантных свойств от особенностей химической структуры гетероциклических соединений.

6. Определить токсичность перспективных гетероциклических соединений с антимикробными и антиоксидантными свойствами методами биотестирования с использованием комплекса тест-объектов (дафний и хлореллы) и лабораторных животных.

7. Обосновать использование гетероциклических соединений с антиоксидантными свойствами в составе сред стабилизации для повышения жизнеспособности лиофилизированных референс-штаммов бактерий.

8. Разработать технологию создания структур «ядро-оболочка» на основе наноагрегатов флавоноидов, гетероциклических соединений и наноструктурированного органобентонита с биосовместимым полимером.

9. Обосновать перспективность использования в медико-биологической и ветеринарной практике разработанных инновационных препаратов.

Научная новизна. Впервые изучено влияние многостенных углеродных нанотрубок на морфологические, культуральные, биохимические и адгезивные свойства референс-штаммов бактерий. Показано их стимулирующее действие на рост и размножение грамотрицательных бактерий; повышение адгезивной активности грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Впервые установлено, что сочетанное воздействие синего светодиодного излучения (405 нм) и многостенных углеродных нанотрубок приводит к выраженному ингибированию роста клинических изолятов *Staphylococcus aureus* № 92 и *Staphylococcus epidermidis* 11 и *Staphylococcus epidermidis* 19e, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных фотосенсибилизаторов для усиления эффекта действия синего излучения на возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний.

Впервые дана характеристика антимикробной активности гетероциклических соединений разных классов: фенилпентендионов, халконов, полифункционально-замещенных эфиров, енаминов, семикарбазонов в отношении референс-штаммов микроорганизмов *Escherichia coli* 113-13, *Bacillus cereus* 8035, *Staphylococcus aureus* 209 P, и *Candida albicans* 18. Отобраны перспективные соединения с антистафилококковым действием из ряда халкона, полифункциональнозамещенных эфиров, енаминов и семикарбазонов; с фунгицидной активностью – из ряда енаминов. Установлено, что соединение 2,4-дихлор-1,3,5-трифенил-2-пентен-1,5-дион ряда фенилпентендион обладает широким спектром антимикробного действия по отношению к клиническим изолятам грамположительных и грамотрицательных бактерий, и подавляет репродукцию штамма «ВН-96» вируса ТГЭС.

Отобраны соединения ряда кумаринов, енаминов, кетонов, циклических конденсированных тиопиранов, конденсированных дигидропиридинов и пиридинов, обладающие низкой антифаговой и высокой антиоксидантной активностью, которые способны локализоваться на поверхности бактериальных клеток, повышать целостность мембранных и внутриклеточных структур, снижать уровень собственных антиоксидантных ферментов. Эти соединения могут быть успешно использованы для повышения жизнеспособности и стабилизации свойств популяций коллекционных культур микроорганизмов как компоненты защитных сред.

Установлена зависимость антимикробной и антиоксидантной активности гетероциклических соединений нового ряда от значений их молекулярной массы, пространственных характеристик молекул, распределения электронных зарядов и наличия определенных химических функциональных групп для комплексного взаимодействия с мембраной бактериальной клетки.

Показана высокая антимикробная активность полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов, в отношении референс-штаммов и клинических изолятов грамотрицательных и грамположительных бактерий, микроскопических грибов и вируса ТГЭС.

Получены новые экспериментальные данные о зависимости биологической активности гетероциклических соединений от их химической структуры, представленные в монографии «Перспективы использования гетероциклических соединений в медико-биологической практике» (Нечаева и др., 2013).

Впервые разработана технология создания структур «ядро-оболочка» на основе биосовместимого полимера – полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов, и наноагрегатов флавоноидов, гетероциклического соединения адмантилметилена-циклогексен-дикарбоксилата и наноструктурированного органобентонита.

Теоретическая и практическая значимость работы. Обобщены и систематизированы данные о зависимости антимикробных и антиоксидантных свойств гетероциклических соединений от их химической структуры. Результаты проведенных исследований являются основанием для проведения направленного синтеза новых гетероциклических соединений с антимикробной активностью в ряду фенилпентендиона, халкона, полифункционально-замещенных эфиров, семикарбазонов и енамина. Разработаны биотехнологические аспекты конструирования структур «ядро-оболочка» и получены экспериментальные образцы препаратов на основе исследуемых соединений.

Результаты проведенных исследований позволили отобрать перспективные соединения с антимикробной активностью в отношении референс-штаммов *E. coli* 113-13, *B. cereus* 8035, *S. aureus* 209 P и *C. albicans* 18, и клинических изолятов грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, не обладающие токсичностью по отношению к биотест-объектам. Полученные результаты открывают перспективы создания новых химиотерапевтических средств для этиотропной терапии инфекционных заболеваний. Соединения с лабораторным шифром ПНВ-1, ХА-44, ХА-46 и Е-4 являются перспективными антистафилококковыми препаратами.

Получен в соавторстве с Н.П. Коновым, Ю.П. Волковым и О.С. Кузнецовым патент РФ на полезную модель (№ 40318, 2004 г.).

Полученные данные используются при чтении лекций по дисциплинам «Общая микробиология», «Санитарная микробиология», «Экология микроорганизмов» в ФГБОУ ВПО Саратовский государственный технический университет имени Гага-

рина Ю.А., в ФГБОУ ВПО Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского и в ГБОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского.

Результаты исследований были использованы при подготовке курсовых и дипломных работ и проектов на кафедре микробиологии и физиологии растений Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского, кафедре экологии Саратовского государственного технического университета имени Гагарина Ю.А.

Методология и методы исследования. Методологической базой послужили труды отечественных и зарубежных ученых по вопросам поиска и отбора перспективных гетероциклических соединений с антимикробной и антиоксидантной активностью, применения наноструктур в медико-биологической практике, способам повышения эффективности и биодоступности биологически активных веществ. Основу данного исследования составляют комплексный анализ и системный подход в изучении рассматриваемой темы.

При проведении исследования и изложении материала автором были применены общенаучные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования в форме наблюдения, эксперимента, описания, измерения и сравнительно-сопоставительного анализа. Применение указанных методов, а также детальный статистический анализ фактического материала позволил обеспечить объективность и достоверность полученных результатов и выводов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Многостенные углеродные нанотрубки оказывают стимулирующее действие на рост и размножение грамотрицательных бактерий *E. coli* 113-13, менее значительное – на грамположительные *B. cereus* 8035 и *S. aureus* 209 P; вызывают изменение биологических свойств всех изученных бактерий. *B. cereus* 8035 может использовать многостенные углеродные нанотрубки в качестве единственного источника углерода, способствуя их утилизации.

2. Многостенные углеродные нанотрубки являются перспективными фотосенсибилизаторами для усиления эффекта действия на возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний синего светодиодного излучения (405 нм), используемого для фотодинамической терапии.

3. Из 120 изученных гетероциклических соединений антимикробной активностью по отношению к референс-штаммам и клиническим изолятам грамположительных и грамотрицательных бактерий, к низшим грибам обладали 11 представителей классов фенилпентендиона, халкона, полифункционально-замещенных эфиров, семикарбазонов, енаминов; антиоксидантной активностью характеризовались представители ряда кумаринов, циклических конденсированных тиопиранов, конденсированных дигидропиридинов и пиридинов, конденсированных diazobicyclononдиенов, енаминов и кетонов.

4. Проявление антимикробной и антиоксидантной активности гетероциклических соединений нового ряда зависит от пространственных характеристик молекул, значений их молекулярной массы, распределения электронных зарядов и наличия определенных химических функциональных групп для комплексного взаимодействия с мембраной бактериальной клетки.

5. Полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат ионами галогенов, обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении референс-штаммов и клинических изолятов грамположительных и грамотрицательных бактерий, которая зависит преимущественно от концентрации гидрат ионов йода.

б. Структуры «ядро-оболочка» на основе полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов, с наноагрегатами флавоноидов, гетероциклическими соединениями и органобентонитом характеризуются антимикробными и ранозаживляющими свойствами, и являются инновационными препаратами, перспективными для использования в медико-биологической и ветеринарной практике.

Апробация результатов исследования. Основные результаты исследования были доложены на: Международном симпозиуме восточно-азиатских стран по полимерным композиционным материалам и передовым технологиям «Композиты XXI века» (Саратов, 2005); межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и наука: итоги и перспективы» (Саратов, 2008); XI Международном конгрессе по антимикробной терапии (Москва, 2009); Общероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные медицинские технологии» (Москва, 2009); Всероссийской молодежной выставке-конкурсе прикладных исследований, изобретений и инноваций (Саратов, 2009); 14 Международной Пуцинской школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2010); 4-ой Всероссийской с международным участием научно-методической конференции «Фармообразование 2010» (Воронеж, 2010); Первых Международных Беккеровских чтениях (Волгоград, 2010); VIII Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2010); Международном форуме по нанотехнологиям «Rusnanotech 2010» (Москва, 2010); Научно-практическом семинаре с международным участием «Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности» (Ульяновск, 2011); Всероссийской молодежной конференции «Наукоемкие технологии и интеллектуальные системы в наноинженерии» (Саратов, 2012); Всероссийской молодежной конференции «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2012» (Саратов, 2012); Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве» (Саратов, 2013); 6-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Экологические проблемы промышленных городов» (Саратов, 2013).

Личный вклад автора. Автором самостоятельно проведен анализ литературных источников по теме диссертации, планирование экспериментальных исследований и подбор методов для достижения поставленной цели. Экспериментальные исследования выполнялись автором лично или при непосредственном участии в составе научной группы при выполнении НИР. Обработка полученных данных, их интерпретация и оформление осуществлены автором самостоятельно. Основные положения диссертации, составляющие ее новизну и практическую значимость, сформулированы совместно с научным консультантом.

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

Публикации. По теме диссертации опубликованы 36 работ, из них 11 статей в журналах рекомендованных ВАК РФ, имеется 1 монография и 1 патент РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов, материалов и методов исследования, 6 глав с изложением результатов работы и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 257 страницах машинописного текста, включает 16 рисунков и 24 таблицы. Список литературы включает в себя 367 источников.

Собственные исследования

Объект, материалы и методы

Объектом исследования явились референс-штаммы и клинические изоляты микроорганизмов, перечень которых представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Микроорганизмы, используемые в работе

Штамм	Характеристика	Источник получения
<i>Yersinia pestis</i> EV НИИЭГ	вакцинный штамм	Государственная коллекция патогенных бактерий «Микроб»
<i>Escherichia coli</i> B	референс-штамм	- // -
Бактериофаг T4	дикий тип	- // -
<i>Escherichia coli</i> 113-13	референс-штамм	ГИСК им. Л.А. Тарасевича, г. Москва
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	референс-штамм	- // -
<i>Bacillus cereus</i> 8035	референс-штамм	- // -
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	референс-штамм	- // -
<i>Staphylococcus aureus</i> № 2	клинический изолят MSSA	Музей культур кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии СГМУ им. В.И. Разумовского
<i>Staphylococcus aureus</i> № 6	клинический изолят MSSA	- // -
<i>Staphylococcus aureus</i> № 21	клинический изолят MSSA	- // -
<i>Staphylococcus aureus</i> №23	клинический изолят MSSA	- // -
<i>Staphylococcus aureus</i> № 92	клинический изолят MRSA	- // -
<i>Staphylococcus aureus</i> № 430	клинический изолят MRSA	- // -
<i>Staphylococcus epidermidis</i> № 11	клинический изолят MRSE	- // -
<i>Staphylococcus epidermidis</i> № 19e	клинический изолят MSSE	- // -
<i>Candida albicans</i> 18	референс-штамм	- // -
<i>Aspergillus fumigatus</i>	референс-штамм	- // -
<i>Mucor raceniosus</i>	референс-штамм	- // -

Экспериментальные животные: 350 белых беспородных мышей (самцов), массой 18-20 г. Животные содержались на стандартном рационе вивария. Все эксперименты выполнялись 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).

Изучение культурально-морфологических и тинкториальных свойств исследуемых микроорганизмов на фоне действия препаратов проводили по общепринятым методикам (Лабинская, 2008). Бактерии культивировали на мясо-пептонном бульоне (МПБ) и мясо-пептонном агаре (МПА); при работе с микроскопическими грибами использовали жидкую и плотную среды Сабуро. Из суточных культур микроорганизмов готовили взвеси в физиологическом растворе по оптическому стандарту мутности 10 или 5 Ед (ГИСК им. Тарасевича) и титровали до необходимых концентраций м.к./мл.

Морфологию бактериальных клеток изучали путем световой микроскопии под масляной иммерсией при помощи цифровой камеры-окуляра для микроскопа SCOPETEK® DCM 35 с выведением изображения на экран компьютера (увеличение $\times 900$).

Для изучения влияния наноструктур на биологические свойства микроорганизмов были использованы многостенные углеродные нанотрубки диаметром 10-20 нм и длиной 0,5-1 мкм, полученные CVD-методом, предоставленные Саратовским филиалом Института радиоэлектроники им. В.А. Котельникова РАН.

Способность бактерий использовать многостенные углеродные нанотрубки в качестве единственного источника углерода оценивалась по способности роста бактерий на минимальной синтетической среде М-9 (Маниатис и др., 1984).

Адгезивную способность бактерий определяли при помощи методов Брилис с соавторами (Брилис и др., 1986) и Гизатулиной с соавторами (Гизатулина и др., 1991).

В экспериментах по облучению микробных клеток в качестве источников синего излучения использовали светодиод с максимумом спектра испускания $\lambda = 405 \pm 20$ нм, плотность мощности излучения – 23 мВт/см², а также экспериментальный прибор «Charub» с максимумом спектра испускания $\lambda = 405$, плотность мощности излучения – 5–80 мВт/см² (Tuchina et al., 2006). Из суточных культур исследуемых микроорганизмов готовили взвесь в физиологическом растворе по оптическому стандарту мутности 5 Ед (ГИСК им. Тарасевича). Взвесь титровали до конечной концентрации 100 м.к./мл и вносили по 0,1 мл в пробирки с 0,9 мл физиологического раствора. В опытные пробирки были добавлены нанотрубки. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов. Из каждой контрольной и опытной пробирки забирали по 0,1 мл взвеси и вносили в ячейки планшета, которые подвергали воздействию синего излучения в течение 30 мин. Затем из каждой ячейки делали высеv по 0,1 мл взвеси на чашки Петри с МПА. Параллельно на чашки высевали по 0,1 мл взвеси исследуемых микроорганизмов, не подвергавшихся облучению, из контрольных и опытных пробирок. Посевы инкубировали при температуре 37°С в течение 24 часов. Оценку влияния излучения на микроорганизмы проводили путем подсчета КОЕ.

В работе по исследованию влияния на микроорганизмы были исследованы гетероциклические соединения, представленные кумаринами, конденсированными пиридинами и дигидропиридинами, циклическими конденсированными пиранами и тиопиранами, кетонами, селенорганическими и таллийорганическими соединениями, замещенными конденсированными диазобицикло-нондиенами, комплексом меди с органическими лигандами, а также соединениями ряда фенилпентендиона, гидроиндазола, оксимов, халконов и полифункциональнозамещенных эфиров, гидроксциклогексанонов, енаминов, циклогексенонов, тетрагидротриазолохиназолоинов, семикарбазонов, которые были синтезированы на кафедре органической и биоорганической химии Института химии Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского, а также в Энгельском Технологическом институте СГТУ. Перечень соединений представлен в таблице 2.

Антимикробную 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 титровали в стерильной дистиллированной воде до получения рабочей концентраций 1000 мкг/мл. Затем получали ряд двойных разведений препаратов в МПБ, в которые вносили взвеси микроорганизмов.

Таблица 2 - Перечень исследованных соединений

№ п/п	Лабораторный шифр	Полное название соединения
1	2	3
Гидроиндазолы		
1.	ГИД-5	3,6-дигидрокси-6-метил-5-ацетил-4-(3-нитрофенил)-2-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-индазол
2.	ГИД-6	3,6-дигидрокси-4-(4-метоксифенил)-5-ацетил-6-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-индазол
3.	ГИД-7	3,6-дигидрокси-4-(4-метоксифенил)-5-ацетил-6-метил-2-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-индазол
4.	ГИД-10	3,6-дигидрокси-6-метил-5-ацетил-2,4-дифенил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-индазол
5.	ГИД-13	Этил4,5-дигидро-3-гидрокси-6-метил-4-фенил-2Н-индазол-5-карбоксилат
6.	ГИД-14	Этил4,5-дигидро-3-гидрокси-6-метил-4-(3-нитрофенил)-2Н-индазол-5-карбоксилат
7.	ГИД-25	3,6-дигидрокси-4-(3-нитрофенил)-5-ацетил-6-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-индазол
8.	ГИД-27	3,6-дигидрокси-4-фенил-5-ацетил-6-метил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-индазол
9.	ГИД-57	3,6-дигидрокси-6-метил-5-ацетил-4-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-индазол
10.	ГИД-58	3,6-дигидрокси-6-метил-5-ацетил-4-(4-метоксифенил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-индазол
Гидроксициклогексаноны		
11.	ГЦГ-1	Этил3-ацетил-4-гидрокси-2-(4-метоксифенил)-4-метил-6-оксоциклогексанкарбоксилат
12.	ГЦГ-2	Этил3-ацетил-4-гидрокси-4-метил-6-оксо-2-фенилциклогексанкарбоксилат
13.	ГЦГ-3	Этил3-ацетил-4-гидрокси-4-метил-2-(3-нитрофенил)-6-оксоциклогексанкарбоксилат
14.	ГЦГ-4	4,6-диацетил-5-(4-метоксифенил)-3-метилциклогекс-2-енон
15.	ГЦГ-38	Диэтил 2-(3,4-диметоксифенил)-4-гидрокси-4-метил-6-оксоциклогексан-1,3-дикарбоксилат
16.	ГЦГ-39	Диэтил-2-(3-метокси-4-гидроксифенил)-4-гидрокси-4-метил-6-оксоциклогексан-1,3-дикарбоксилат
17.	ГЦГ-40	2,4диацетил-3-(3-этокси-4-гидроксифенил)-5-гидрокси-5-метилциклогексанон
18.	ГЦГ-41	Диэтил2-(3-этокси-4-гидроксифенил)-4-гидрокси-4-метил-6-оксоциклогексан-1,3-дикарбоксилат
19.	ГЦГ-42	Диэтил 4-гидрокси-4-метил-5-метилен-6-оксо-2-фенилциклогексан-1,3-карбоксилат
Конденсированные замещенные диазобицикло-нондиены		
20.	НД-1	5,9-Диметил-7-фурил-6-ацетил-5-гидрокси-1-окса-2-азабицикло(4,3,0)нондиен 2,8
21.	НД-2	5,9-Диметил-7-(3-нитрофенил)-6-ацетил-5-гидрокси-1,2-диазабицикло(4,3,0)нондиен 2,8
22.	НД-3	7-(3-нитрофенил)-5-гидрокси-1,2-диазабицикло(4,3,0)нондиен 2,8
Азотсодержащие гетероциклические соединения – конденсированные дигидропиридины		

1	2	3
23.	ГГХ-1	2,4-Ди(4-метоксифенил)-5-оксо-1,4,5,6,7,8-гексагидрохинолин
24.	ГГХ-2	2-Фенил-4(4-нитрофенил)-5-оксо-1,4,5,6,7,8-гексагидрохинолин
25.	ГГХ-3	2-Фенил-4(4-метоксифенил)-5-оксо-1,4,5,6,7,8-гексагидрохинолин
26.	ГГХ-4	7,7-Диметил-2-фенил-4(4-метоксифенил)- 5-оксо-1,4,5,6,7,.8-гексагидрохинолин
27.	ГГХ-5	7,7-Диметил-2,4-дифенил-4(4-метоксифенил)- 5-оксо-1,4,5,6,7,.8-гексагидрохинолин
28.	ГГХ-6	5-оксо-1,4,5,6,7,.8-гексагидрохинолин
29.	ГГХ-7	2,4-Дифенил-5-оксо-1,4,5,6,7,8-гексагидрохинолин
Енамины		
30.	Е-4	Этил 2-метил-4-(1-пиперидил)-6-(3-нитрофенил)циклогекса-1,3-диенкарбоксилат
31.	Е-5	Диэтил 4-аллиламино-6-гидрокси-6-метил-2-фенилциклогекс-3-ен-1,3-дикарбоксилат
32.	Е-6	Диэтил 4-аллиламино-6-гидрокси-6-метил-2-(4-метоксифенил)-циклогекс-3-ен-дикарбоксилат
33.	Е-13	Диэтил 4-(адамантилметиленамино)-6-гидрокси-6-метил-2-фенилциклогекс-3-ен-1,3-дикарбоксилат
34.	Е-14	Диэтил 4-(адамантилметиленамино)-6-гидрокси-6-метил-2-(4-метоксифенил)-циклогекс-3-ен-1,3-дикарбоксилат
35.	Е-15	Диэтил 4-(адамантилметиленамино)-6-гидрокси-6-метил-2-(3-нитрофенил)-циклогекс-3-ен-1,3-дикарбоксилат
36.	ФДЕ	Фенил-диэтоксикарбонил-ениламин
37.	А-1	Адамантилметилен-аминоциклогексен-дикарбоксилат
38.	А-2	Адамантилметилен-циклогексен-дикарбоксилат
39.	А-3	Адамантилметилен-енамин
40.	Т-1	Тетрагидро[1,2,4]-триазоло[3.4- <i>b</i>]хиназолин
41.	Т-2	Триазолохиназолин
42.	ДФЦ	Диэтоксикарбонил-(фенил)-циклогексадиениламин
43.	ФДТ	Фурил-диэтоксикарбонил-(толил)-циклогекса-1,5-диениламин
Кетоны		
44.	ЦГД-1	5,5-Диметил-2-(1,3-дифенил-3-оксопропил)-циклогександион-1,3
45.	ЦГД-2	2-(1-Метил-3-фенил-3-оксопропил)-циклогександион-1,3
46.	ЦГД-3	2- Циклогексил-циклогександион-1,3
47.	ЦГД-4	1-Оксопропилциклогександион
Кислородсодержащие гетероциклы - Кумарины		
48.	КМ-1	7-Амино-4-метилкумарин
49.	КМ-2	6,7-Диоксикумарин
50.	КМ-3	3-Карбоксикумарин
51.	КМ-4	3-Ацетамидокумарин
52.	КМ-5	4-Метил-7-оксикумарин
53.	КМ-6	4-Метил-7,8-диоксикумарин
54.	КМ-7	4-Метил-6,7-диоксикумарин
55.	КМ-8	4-Метил-6-оксикумарин
Комплекс меди с органическими лигандами		
56.	Комплекс меди (II)	Комплекс меди (II) с 5,7-Диокси Cu(6,7-ДК) кумарином
Оксимы		

57.	О-8	Этил 5-ацетил-4-гидрокси-4-метил-6-фенил-2-(фениламино)циклогекс-1-ен-карбоксилат
1	2	3
58.	О-20	Этил-3-ацетил-4-гидрокси-6-(гидроксиимино)-2-(4-метоксифенил)-4-метилциклогексанкарбоксилат
59.	О-21	Этил-3-ацетил-4-гидрокси-6-(гидроксиимино)-2-фенил-4-метилциклогексанкарбоксилат
60.	О-24	Диэтил-6-(гидроксиимино)-2-(4-метоксифенил)-4-метилциклогекс-4-ен-1,3-карбоксилат
61.	О-28	Этил-3-ацетил-4-гидрокси-6-(гидроксиимино)-2-(3-нитрофенил)-4-метилциклогексанкарбоксилат
62.	О-52	3-(4-метоксифенил)-2,4-ацетил-1-(гидроксиимино)-5-метилциклогекс-5-ен
63.	О-56	9-(4-метоксифенил)-4,8-диметилбицикло[3.3.1]нон-3,7-диен-2,6-дион диоксим
Конденсированные пираны		
64.	ТГХ-1	7,7-Диметил-2,4-дифенил-5-окси-5,6,7,8- тетрагидро-4Н-хромен
65.	ТГХ-2	7,7-Диметил-2-фенил-4-(4-метоксифенил)-5-оксо-5,6,7,8- тетрагидро-4Н-хромен
66.	ОХ	5-Оксо-4Н-хромен
Конденсированные пиридины		
67.	ГХ	7,7-Диметил-2,4-дифенил-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидрохинолин
Селенорганические соединения		
68.	ХЦС	Хлорцинкат 2-фенил-5,6-тетраметиленселенопириллия
Семикарбазоны		
69.	С-7	Диэтил-4-гидрокси-4-метил-6-семикарбазоно-2-фенилциклогексан-1,3-дикарбоксилат
70.	С-8	Диэтил-4-гидрокси-4-метил-6-семикарбазоно-2-(3,4-диметоксифенил)-циклогексан-1,3-дикарбоксилат
71.	С-9	диэтил-4-гидрокси-4-метил-2-(4-метоксифенил)-6-семикарбазоноциклогексан-1,3-дикарбоксилат
72.	С-10	диэтил-4-гидрокси-4-метил-6-семикарбазоно-2-(2-тиенил)-циклогексан-1,3-дикарбоксилат
73.	С-11	Диэтил-4-гидрокси-4-метил-6-семикарбазоно-2-(3-нитрофенил)-циклогексан-1,3-дикарбоксилат
74.	С-12	Диэтил-6-метил-4-тиосемикарбазидо-2-фенилциклогекс-3,6-диен-1,3-дикарбоксилат
Тетрагидротриазолохиназолины		
75.	ТГТ-1	7-Ацетил-8-гидрокси-5,8-диметил-6-фенил-6,7,8,9-тетрагидро-[1,2,4]тризоло[3,4- <i>b</i>]хиназолин
76.	ТГТ-2	Этил-5,8-дигидрокси-6-(3-нитрофенил)-6,7,8,9-тетрагидро-[1,2,4]-тризоло[3,4- <i>в</i>]хиназолин-7-карбоксилат
77.	ТГТ-3	Этил-5,8-дигидрокси-8-метил-6-фенил-6,7,8,9-тетра- гидро-[1,2,4]-тризоло[3,4- <i>в</i>]хиназолин-7-карбоксилат
Серусодержащие гетероциклические соединения – циклические конденсированные тиопираны		
78.	ГТХ-1	7,7-Диметил-2,4-дифенил-5-окси-5,6,7,8-тетрагидро-4Н-тиохромен
79.	ГТХ-2	5,7,7-Триметил-2,4-дифенил-5-окси-5,6,7,8-тетрагидро-4Н-тиохромен
80.	ГТХ-3	7,7-Диметил-2,4-дифенил-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидротиохромен
81.	ГТХ-4	7,7-Диметил-2-фенил-4-(4-метоксифенил)- 5-оксо-5,6,7,8-тетрагидротиохромен
Таллийорганические соединения		
82.	1Г	Дифенилталлийбромид

83.	2Г	Пивалат дифенил таллия
84.	3Г	Бис-(трифторацетат) фенил таллия
1	2	3
85.	4Г	п- Толилталлий бис-(трифторацетат)
86.	5Г	Ди-(4-третбутилфенил) таллий трифторацетат
87.	6Г	Ди-(п-толил) таллий трифторацетат
88.	7Г	Ди-(4-карбометоксифенил)-таллий хлорид
89.	8Г	4-Бромфенилталлий-бис-(трифторацетат)
90.	9Г	Фенилталлий бис-(пивалат)
91.	10Г	Фенилталлий бис-(ацетат)
92.	11Г	Дихлорид фенилталлия
93.	12Г	Бис-(пентабромбензоат)-фенил таллия
94.	13Г	Ди-(ацетил)-таллий трифторацетат
95.	14Г	Ди-(пентафторфенолят) фенил таллия
Соединения ряда фенилпентендиона		
96.	ПНВ-1	2,4-дихлор-1,3,5-трифенил-2-пентен-1,5-дион
97.	ПНВ-Б	1,3,5-трифенил-2-пентен-1,5-дион
98.	ПНВ-1А	2,4-дифенилбицикло[3.3.1]нон-2-ен-9-он
99.	ПНВ-1Б	2-(4'-метоксифенил)-4-фенилбицикло[3.3.1]нон-2-ен-9-он
100.	ПНВ-1В	2-фенил-4-(4'-метоксифенил)бицикло[3.3.1]нон-2-ен-9-он
Соединения ряда халкона		
101.	ХА-35	этил-3-бензилиден-2,4-диоксопентанон
102.	ХА-36	3-(4-метоксибензилиден)-пентан-2,4-дион
103.	ХА-37	3-(3-нитробензилиден)-пентан-2,4-дион
104.	ХА-44	3(4-(диметиламино)бензилиден)пентан-2,4-дион
105.	ХА-47	Этил-2-(4-гидроксibenзилиден)-3-оксобутанкарбоксилат
Циклогексеноны		
106.	ЦГ-11	Диэтил-4-метил-6-оксо-2-фенилциклогекс-4-ен-1,3-карбоксилат
107.	ЦГ-15	диэтил-2-(4-метоксифенил)-4-метил-6-оксоциклогекс-4-ене-1,3-карбоксилат
108.	ЦГ-16	диэтил-2-(3-нитрофенил)-4-метил-6-оксоциклогекс-4-ене-1,3-карбоксилат
109.	ЦГ-17	диэтил-2-метил-4-метил-6-оксоциклогекс-4-ене-1,3-карбоксилат
110.	ЦГ-18	этил-5-ацетил-6-(4-метоксифенил)-4-метил-2-оксоциклогекс-3-енкарбоксилат
111.	ЦГ-22	4,6-диацетил-3-метил-5-(3-нитрофенил)циклогекс-2-енон
112.	ЦГ-23	5-(2,6-бис(этоксикарбонил)-3-метил-5-оксоциклогекс-3-енил)-2-метоксибензенсульфо кислота
113.	ЦГ-30	этил-5-ацетил-6-фенил-4-метил-2-оксоциклогекс-3-енкарбоксилат
114.	ЦГ-48	диэтил-2-(3,4-диметоксифенил)-4-метил-6-оксоциклогекс-4-ене-1,3-карбоксилат
115.	ЦГ-53	диэтил-2-(3-гидрокси-4-метоксифенил)-4-метил-6-оксоциклогекс-4-ен-1,3-карбоксилат
Полифункциональнозамещенные эфиры		
116.	ПЭ-43	2,2'-ди-(3-(3-метоксифенил)-2,4-диацетил-5-гидрокси-5-метилциклоген-1-ил)-диэтиловый эфир
117.	ПЭ-45	2,2'-ди-(3-фенил-2,4-диацетил-5-гидрокси-5-метилциклоген-1-ил)-диэтиловый эфир
118.	ПЭ-46	2,2'-ди-(3-(3-метокси-4-гидроксифенил)-2,4-диацетил-5-гидрокси-5-метилциклоген-1-ил)-диэтиловый эфир
119.	ПЭ-49	2,2'-ди-(3-(3-нитрофенил)-2,4-диацетил-5-гидрокси-5-метилциклоген-1-ил)-диэтиловый эфир
120.	ПЭ-50	Тетраэтил-4,4'-(2,2'-оксибис(этан-2,1-диилбис(окси)))бис(6-гидрокси-2-

(4-метоксифенил)-6-метициклогекс-3-ен-1,3-карбоксилат)

Посевы бактерий инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов, а затем высевали по 0,1 мл бульонной культуры на поверхность МПА в чашки Петри для определения характера действия препарата путем подсчета количества выросших колоний (КОЕ).

Определение антиоксидантной активности исследуемых соединений проводили на хемилюминометре в системе свободнорадикального окисления, инициированного перекисью водорода в растворе нормальной лошадиной сыворотки (Архипова, 1988), предварительно отобрав препараты с низкой биологической агрессией в системе бактериофага Т4 – штамм *Escherichia coli* В (Фонштейн, Сурайкина, Таль, 1975).

Лиофильное высушивание *Y. pestis* EV НИИЭГ осуществляли на коллекторном аппарате системы К.Е. Долинова на базе Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» (Инструкция по лиофильному высушиванию..., 1979).

Для изучения влияния полимерного соединения на биологические свойства микроорганизмов использовали полиазиолидинаммоний, модифицированный гидрат ионами галогенов (ПААГ), а также его комплексы с растительными биофлавоноидами (пр-во ООО НПО «Альтернатива», г. Саратов).

Исследование токсичности гетероциклических соединений с антимикробной активностью и полиазиолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов, проводили в два этапа по общепринятым методикам: биотестирование на тест-объектах *Daphnia magna* и определение острой токсичности на лабораторных животных (Гуськова, 1990.; Лойт, 1992; Методическое руководство по биотестированию воды, 2002; Гуськова, 2003; Хабриев, 2005).

Формирование субмикронных агрегатов флавоноидов велось из пчелиного прополиса (Заярский и др. Патент РФ № 2446852.). Распределение по размерам субмикронных агрегатов флавоноидов было определено Д.А. Заярским (2012) методами динамического рассеяния света. Измерения проведены с помощью установки для характеристики наночастиц Marven Zetasizer Nano ZS.

Оценку ранозаживляющего действия структур «ядро-оболочка», содержащих наноагрегаты флавоноидов, покрытые ПААГ, проводили на модели экспериментальных полнослойных ран. Для оценки эффективности лечения ран рассчитывали ежесуточное уменьшение площади ран в % по общепринятой методике (Кузин, Костюченко, 1990; Gul et al., 2008).

Статистическая обработка всех полученных данных проводилась по общепринятым методикам (Ашмарин, Воробьев, 1986). Расчёт 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). Статистические результаты считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Влияние многостенных углеродных нанотрубок на биологические свойства бактерий

Для изучения влияния многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) на биологические свойства бактерий использовали референс-штаммы *E. coli* 113-13, *S. aureus* 209 P, *B. cereus* 8035, которые отличались морфологическими свойствами и особенностью строения клеточной стенки. Взвесь суточной культуры исследуемых микроорганизмов вносили в пробирки с МПБ; в опытные образцы были добавлены нанотрубки, в качестве первого контроля использовали культивирование бактерий в

МПБ. Поскольку МУНТ представляют собой одну из форм углерода, то в качестве второго контроля проводили культивирование бактерий в МПБ с добавлением графита. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов, а затем высевали на МПА. После инкубации в течение 24 часов подсчитывали число КОЕ, оценивали морфологию колоний и рассчитывали жизнеспособность бактерий. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние многостенных углеродных нанотрубок на жизнеспособность исследуемых микроорганизмов

Исследуемые микроорганизмы	Число КОЕ (M ± m)		
	Контроль 1 –МПБ	Контроль 2 – МПБ+графит	Опыт – МПБ+УНТ
<i>E. coli</i> 113-13	1072±23	1120±19*	1568±29*
<i>B. cereus</i> 8035	716±25	860±21*	Агрегация
<i>S. aureus</i> 209 P	1136±15	1018±31*	1264±22*

Примечание – * наличие достоверности при уровне значимости $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Анализ полученных результатов показал, что внесение графита (контроль 2) в МПБ с тестовыми бактериями достоверно не влияло на их рост и размножение. Добавление нанотрубок в МПБ с *E. coli* 113-13 приводило к стимуляции роста культуры, т.к. число КОЕ при последующем высеве на МПА было достоверно больше по сравнению с обоими контролями. При оценке влияния нанотрубок на морфологию колоний кишечной палочки была отмечена их агрегация в опытных образцах; изолированные колонии были непрозрачными и имели беловатый оттенок, их размеры были более крупные (5-6 мм) по сравнению с контрольными полупрозрачными и бесцветными колониями диаметром 2-3 мм (рисунок 1).

При культивировании *S. aureus* 209 P в МПБ с МУНТ количество колоний увеличивалось незначительно. Однако внесение нанотрубок в МПБ приводило к диссоциации колоний *S. aureus* 209 P с преобладанием пигментированных желтых, в отличие от контрольных образцов, в которых все колонии были белого цвета (рисунок 2).

Влияние нанотрубок на рост бацилл оценить было сложно, поскольку в чашках на поверхности МПА с посевами наблюдалась агрегация колоний. Изучение культуральных свойств *B. cereus* 8035 показало изменение морфологии колоний в опытных образцах: усиление складчатости поверхности колоний, диаметр которых достигал 8 мм. В посевах из контрольных образцов наблюдались однотипные округлые колонии с бугристой поверхностью диаметром 3-4 мм. Кроме того, колонии бацилл из опытных образцов образовывали большое количество корневидных отростков, что способствовало агрегации колоний (рисунок 3).

При изучении мазков, приготовленных из опытных и контрольных образцов *E. coli* 113-13 и *S. aureus* 209 P, не было выявлено каких-либо отличий: клетки бактерий имели сходные размеры и характерное взаимное расположение. В мазках, приготовленных из опытных образцов *B. cereus* 8035, наблюдались цепочки бацилл, которые в 3-4 раза превышали длину цепочек в контрольных образцах, что вероятно и способствовало возникновению агрегированных колоний.

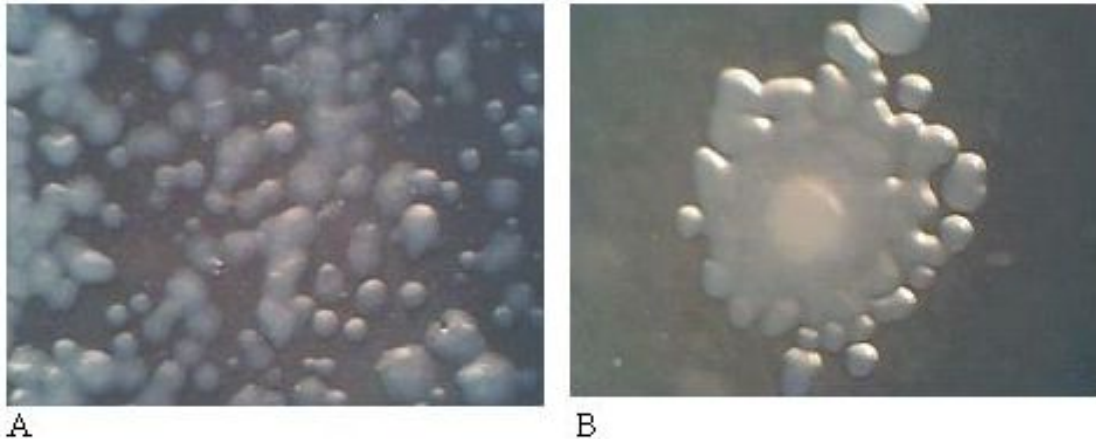


Рисунок 1 – Колонии *E. coli* 113-13, выросшие на МПА
 А) контроль 1 – пересев с МПБ; В) опыт – пересев с МПБ+МУНТ

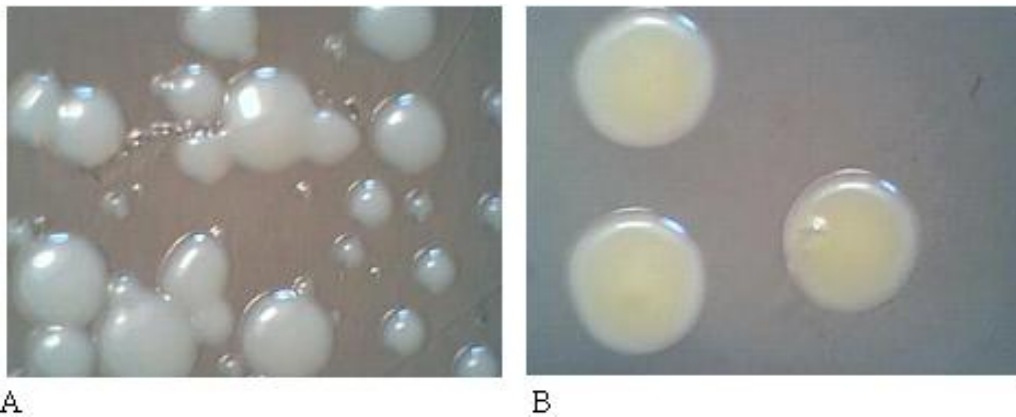


Рисунок 2 – Колонии *S. aureus* 209 P, выросшие на МПА
 А) контроль 1 – пересев с МПБ; В) опыт – пересев с МПБ+МУНТ

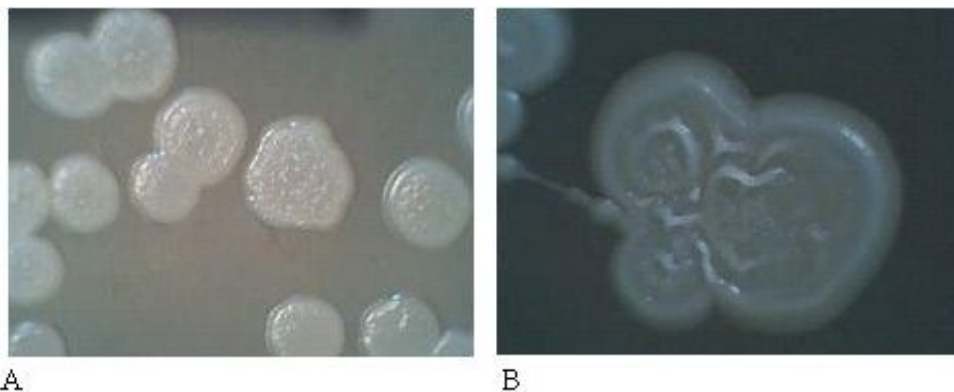


Рисунок 3 – Колонии *B. cereus*, выросшие на МПА
 А) контроль 1 – пересев с МПБ; В) опыт – пересев с МПБ+МУНТ

На следующем этапе работы была изучена способность исследуемых микроорганизмов утилизировать МУНТ и использовать их в качестве единственного источника углерода. Для этого взвесь суточной культуры бактерий инкубировали в пробирках с МПБ в течение 24 часов, после чего добавляли по 0,1 мл в пробирки с безуглеродной средой М-9: в опытные образцы добавляли МУНТ в концентрации 1

мкг/мл. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 24 часов и высевали на поверхность МПА в чашки Петри; через сутки подсчитывали количество выросших КОЕ.

Было выявлено, что нанотрубки не оказывают влияния на рост *E. coli* 113-13 и *S. aureus* 209 P (таблица 4), так как и в контрольных и в опытных образцах наблюдались колонии с характерными для данных бактерий культуральными свойствами, а количество колоний в опытных образцах достоверно не отличалось от контрольных значений. Установлено, что внесение в среду М-9 МУНТ приводило к увеличению количества колоний *B. cereus* 8035 по сравнению с контролем приблизительно на 62 %, что позволило считать возможным использование бациллами МУНТ в качестве единственного источника углерода.

Таблица 4 – Оценка способности исследуемых бактерий использовать многостенные углеродные нанотрубки в качестве единственного источника углерода

Исследуемые микроорганизмы	Число КОЕ (M ± m) на МПА	
	После культивирования на среде М-9	После культивирования на среде М-9+МУНТ
<i>E. coli</i> 113-13	1218±21	1227±19
<i>S. aureus</i> 209 P	1122±17	1128±24
<i>B. cereus</i> 8035	623±14	1020±18*

Примечание – * наличие достоверности при уровне значимости $p < 0,05$ по отношению к контролю.

На следующем этапе исследования нами были изучены адгезивные свойства референс-штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий *B. cereus* 8035, *S. aureus* 209 P, *E. coli* 113-13 после инкубации с МУНТ в течение 1 и 7 суток в МПБ. В качестве контроля использовали бульонную культуру микроорганизмов. Адгезивные свойства бактерий оценивали по трем показателям: среднему показателю адгезии (СПА), коэффициенту адгезии (КА) и индексу адгезии микроорганизма (ИАМ). Полученные результаты представлены в таблице 5.

Было установлено, что внесение в МПБ МУНТ не влияет на адгезивные свойства *B. cereus* 8035, поскольку как в опытных, так и в контрольных мазках отсутствовали эритроциты, имеющие на своей поверхности бактериальные клетки.

Таблица 5 – Влияние многостенных углеродных нанотрубок на адгезивные свойства референс-штаммов грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов

	СПА		КА, %		ИАМ	
	1 сут.	7 сут.	1 сут.	7 сут.	1 сут.	7 сут.
<i>B. cereus</i> 8035						
МПБ	0	0	0	0	–	–
МПБ+МУНТ	0	0	0	0	–	–
<i>S. aureus</i> 209P						
МПБ	1,44±0,57	0	64,70±11,4	0	2,2±0,26	–
МПБ+МУНТ	2,65±0,86*	3,21±0,64	72,46±10,8	76,24±8,62	3,6±0,72	4,2±0,62
<i>E. coli</i> 113-13						
МПБ	0	1,24±0,16	0	58,26±6,82	–	2,1±0,34
МПБ+МУНТ	1,57±0,65	1,82±0,42	65,23±9,8	69,18±8,4	2,4±0,56	2,8±0,38

Примечание – * наличие достоверности при уровне значимости $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Культивирование *S. aureus* 209P и *E. coli* 113-13 с добавлением МУНТ приводило к увеличению значений основных показателей, что свидетельствовало об увеличении адгезивных свойств исследованных микроорганизмов. На повышение адгезивной активности бактерий влияла также длительность совместного культивирования микроорганизмов и МУНТ. Так, по показателям ИАМ клетки золотистого стафилококка через сутки культивирования с добавлением МУНТ характеризовались среднеадгезивным уровнем, а через 7 дней – высокоадгезивным.

Внесение МУНТ в питательную среду с *E. coli* 113-13 оказывало меньшее влияние на адгезивные свойства клеток: по показателю ИАМ они характеризовались как низкоадгезивные. При совместном культивировании бактерий кишечной палочки в течение недели с МУНТ показатель ИАМ повышался до среднеадгезивного.

Далее нами было исследовано влияние МУНТ на клинические изоляты стафилококков в процессе воздействия некогерентного светодиодного излучения (405 нм; 23,5 – 80 мВт/см²). По данным литературы именно такой диапазон излучения обладает анальгетическим, противовоспалительным, а также бактериостатическим действием и используется в медицинской практике для фотодинамической терапии (Корсунская и др., 2010; Мумладзе и др., 2011). Также эти параметры излучения составляют максимальный спектр поглощения для МУНТ. Для воздействия были выбраны клинические изоляты золотистого и эпидермального стафилококков, которые играют важную роль в этиологии кожных форм стафилококковой инфекции: *S. aureus* № 92 (MRSA), *S. epidermidis* 19e (MSSE), *S. epidermidis* 11(MRSE).

В ходе проведенных исследований было выявлено стимулирующее действие МУНТ, т.к. происходило достоверное увеличение численности и жизнеспособности всех исследуемых микроорганизмов (таблица 6).

Наибольший стимулирующий эффект МУНТ наблюдался в отношении клеток *S. aureus* № 92 – увеличение количества КОЕ было в 2 раза по сравнению с контролем. В отношении *S. epidermidis* стимулирующее действие МУНТ было выражено слабее и составило 24 % для *S. epidermidis* № 19e и 11 % для *S. epidermidis* № 11.

Воздействие синего светодиодного излучения (405 нм) приводило к незначительному подавлению роста исследуемых микроорганизмов.

Таблица 6 – Влияние светодиодного излучения на выживаемость стафилококков

Исследуемые микроорганизмы	Число КОЕ (M ± m)			
	Контроль (высев с МПБ)	МПБ+МУНТ	Излучение	МУНТ+излучение
<i>S. aureus</i> № 92	515±23	1098±16*	413±9*	215±12*
<i>S. epidermidis</i> № 19e MSSE	621±18	815±21*	517±23*	12±3*
<i>S. epidermidis</i> № 11 MRSE	823±11	925±14*	627±21*	52±8*

Примечание – * наличие достоверности при уровне значимости $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Сочетанное воздействие синего светодиодного излучения (405 нм) и МУНТ сопровождалось более выраженным ингибированием роста исследуемых микроорганизмов: количество КОЕ снизилось в 2,5 раза и в 16 раз для *S. aureus* № 92 и *S. epidermidis* № 11 соответственно. Наиболее чувствительными оказались клетки *S. epidermidis* № 19e, т.к. число КОЕ снизилось в 52 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, проведенные исследования по оценке влияния МУНТ на биологические свойства микроорганизмов позволили установить их достоверное стимулирующее действие на рост и размножение преимущественно грамотрицательных бактерий (на примере *E. coli* 113-13), и способность вызывать изменения культуральных свойств всех исследованных микроорганизмов. Полученные результаты по сочетанному воздействию некогерентного светодиодного излучения и МУНТ позволяют рассматривать их в качестве перспективных фотосенсибилизаторов для усиления эффекта действия синего излучения на возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний. Установлена способность клеток *B. cereus* 8035 использовать МУНТ в качестве единственного источника углерода, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного микроорганизма, использующего МУНТ в метаболических реакциях, способствуя их утилизации.

Выявлено, что МУНТ повышают адгезивную способность референс-штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, что позволяет рекомендовать их для предварительного совместного культивирования с бактериями, входящими в состав пробиотиков. Это позволит повысить эффективность и биодоступность препаратов.

Изучение биологической активности полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов, и его аналогов в отношении микроорганизмов

Биологическую активность ПААГ в отношении референс-штаммов грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов *S. aureus* 209 P, *B. cereus* 8035, *E. coli* 113-13 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 определяли методом серийных разведений для установления МПК препарата. Была определена минимальная бактерицидная концентрация (МБК) ПААГ путем мерного высева на МПА материала из тех пробирок, в которых отсутствовал видимый рост бактерий. Посевы инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24 часов, после чего подсчитывали КОЕ в контрольных и опытных образцах. Полученные результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Биологическая активность полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов, в отношении стандартных штаммов микроорганизмов

	Концентрация, мкг/мл							
	<i>S. aureus</i> 209 P		<i>B. cereus</i> 8035		<i>E. coli</i> 113-13		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
	МПК	МБК	МПК	МБК	МПК	МБК	МПК	МБК
ПААГ	–	16	–	32	–	32	64	–

При культивировании *S. aureus* 209 P, *B. cereus* 8035 и *E. coli* 113-13 во всех пробирках видимый рост микроорганизмов отсутствовал, что не позволило нам установить МПК препарата. В контрольных пробирках наблюдался рост бактерий в виде равномерного помутнения. МПК ПААГ для *P. aeruginosa* ATCC 27853 составила 64 мкг/мл, однако при воздействии соединения в концентрации 32 мкг/мл синегнойная палочка утрачивала способность к пигментообразованию.

МБК ПААГ для *S. aureus* 209 P составила 16 мкг/мл, а для *B. cereus* 8035 и *E. coli* 113-13 – 32 мкг/мл. Более низкие концентрации препарата оказывали частичное бактерицидное действие, так как в опытных образцах на МПА наблюдался рост

культуры в виде единичных колоний (в отличие от контрольных образцов с равномерным ростом по всей поверхности питательной среды).

Концентрации ПААГ от 250 до 64 мкг/мл оказывали бактериостатическое действие на *P. aeruginosa* ATCC 27853, т.к. отмечен рост на МПА как в контрольных образцах. Рост в виде единичных колоний наблюдался при концентрации ПААГ 1000 и 500 мкг/мл, что свидетельствовало о частичном бактерицидном действии препарата на *P. aeruginosa*.

Поскольку ПААГ проявил выраженную антимикробную активность в отношении референс-штамма *S. aureus* 209 P, представляло интерес изучить антимикробную активность соединения в отношении клинических изолятов *S. aureus*. Полученные результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Биологическая активность полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов, в отношении референс-штамма и клинических изолятов *S. aureus*

	Концентрация, мкг/мл													
	<i>S. aureus</i> 209 P		<i>S. aureus</i> № 2		<i>S. aureus</i> № 6		<i>S. aureus</i> № 21		<i>S. aureus</i> № 23		<i>S. aureus</i> № 92		<i>S. aureus</i> № 430	
	МПК	МБК	МПК	МБК	МПК	МБК	МПК	МБК	МПК	МБК	МПК	МБК	МПК	МБК
ПААГ	–	16	–	32	–	16	8	32	16	64	32	64	–	16

При культивировании референс-штамма *S. aureus* 209 P, а также клинических изолятов *S. aureus* № 2, *S. aureus* № 6 и *S. aureus* № 430 с ПААГ во всех пробирках видимый рост микроорганизмов отсутствовал. Поэтому для этих бактерий нам не удалось установить МПК. В контрольных пробирках наблюдался рост бактерий в виде равномерного помутнения.

МБК ПААГ в отношении клинических изолятов золотистого стафилококка оценивали по росту бактерий на поверхности МПА. Установлены значения МБК ПААГ для референс-штамма *S. aureus* 209 P и клинических изолятов *S. aureus* № 6 и № 430 – 16 мкг/мл; для *S. aureus* № 2 и № 21 – 32 мкг/мл, а для *S. aureus* № 23 и № 92 – 64 мкг/мл. Более низкие концентрации препарата характеризовались частично бактерицидным действием на исследованные микроорганизмы (рост бактерий в виде единичных изолированных колоний).

Была изучена также биологическая активность ПААГ в отношении референс-штаммов микроскопических грибов *Candida albicans* 18, *Aspergillus fumigatus* и *Mucor raceniosus*, оценку которой проводили методом серийных разведений на жидкой среде Сабуро с последующим посевом на среду Сабуро для определения минимальной фунгицидной концентрации. Полученные результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Биологическая активность полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов, в отношении стандартных штаммов микроскопических грибов

	МПК, мкг/мл		
	<i>C. albicans</i> 18	<i>A. fumigatus</i>	<i>M. raceniosus</i>
ПААГ	125	250	250

В ходе проведенных исследований было установлено, что МПК ПААГ для *C. albicans* 18 составляет 125 мкг/мл, а для *A. fumigatus* и *M. raceniosus* – 250 мкг/мл.

Концентрации ПААГ от 1000 до 250 мкг/мл оказывали частично фунгицидное действие на *C. albicans* 18, так как на среде Сабуро наблюдался рост в виде единичных изолированных колоний в отличие от контрольных высевов, где исследуемый микроорганизм давал сплошной рост.

Для *A. fumigatus* и *M. raceniosus* не удалось определить минимальную фунгицидную концентрацию, так как концентрации ПААГ 1000 и 500 мкг/мл оказывали частично фунгицидное действие.

На следующем этапе исследования нами была изучена биологическая активность ПААГ в зависимости от концентрации гидрат ионов йода, входящих в его состав, которые являются основным активным компонентом исследуемого полимерного соединения. В качестве экспериментальной модели использовали референс-штаммы *S. aureus* 209 P и *P. aeruginosa* ATCC 27853, поскольку в последние годы в клинической практике эти микроорганизмы приобретают все большую значимость как возбудители внебольничных и нозокомиальных гнойно-воспалительных заболеваний.

В работе использовали четыре варианта полимера: в ПААГ-2 концентрация гидрат ионов йода составляла 100 мкг/мл, в ПААГ-4 – 200 мкг/мл, в ПААГ-10 – 500 мкг/мл и в ПААГ-15 – 750 мкг/мл. Предварительное исследование острой токсичности всех вариантов полимера позволило отнести его к IV классу токсичности. Полученные результаты представлены в таблице 10.

Было установлено, что грамположительные бактерии оказались более чувствительными к ПААГ. Нам не удалось определить МПК соединения для стандартного штамма *S. aureus* 209 P, поскольку во всех пробирках видимый рост бактерий отсутствовал (в контрольных образцах наблюдался рост в виде равномерного помутнения).

Таблица 10 – Биологическая активность полиаэзолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов

Концентрация мкг/мл	ПААГ-2		ПААГ-4		ПААГ-10		ПААГ-15	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1000	–	–	–	–	–	–	–	–
500	–	–	–	–	–	–	–	–
250	–	–	–	–	–	–	–	–
125	–	–	–	–	–	–	–	–
64	–	–	–	–	–	–	–	–
32	–	+	–	–	–	–	–	–
16	–	+	–	+	–	–	–	–
8	–	+	–	+	–	–	–	–
4	–	+	–	+	–	+	–	–
2	–	+	–	+	–	+	–	–
К	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание – «+» – наличие роста, «–» – отсутствие роста.

Чувствительность референс-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 к йодсодержащему полимеру была ниже и зависела от содержания гидрат ионов йода. Так МПК

ПААГ-2 в отношении стандартного штамма синегнойной палочки составила 64 мкг/мл, ПААГ-4 – 32 мкг/мл, ПААГ-10 – 8 мкг/мл. Для ПААГ-15 не удалось определить МПК, так как во всех опытных пробирках видимый рост отсутствовал; в контрольных пробирках наблюдался рост в виде равномерного помутнения с пленкой на поверхности и интенсивным пигментообразованием.

Далее нами была проведена сравнительная оценка влияния различных концентраций раствора диоксида хлора и ПААГ, а также их комплекса на выживаемость санитарно-показательных микроорганизмов воды. Это связано с необходимостью поиска безопасных химических соединений с антимикробными свойствами в качестве альтернативы раствору диоксида хлора, который в настоящее время чаще всего применяют для обеспечения биологической безопасности водных ресурсов.

В качестве экспериментальной модели использовали стандартный штамм грамотрицательных бактерий *E.coli* 113-13. Антимикробные свойства препаратов исследовали с помощью метода серийных разведений. Через 24 часа инкубации бактерий и исследуемых соединений во всех пробирках видимый рост микроорганизмов отсутствовал. Далее проводили мерные высевы на чашки Петри с МПА и после инкубации при температуре 37 °С в течение 24 часов подсчитывали КОЕ. Полученные результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Влияние исследуемых веществ на выживаемость *E.coli* 113-13

Концентрация веществ, мкг/мл	Количество КОЕ							
	1000	500	250	120	60	30	15	К
Диоксид хлора	–	–	–	–	СР	СР	СР	СР
ПААГ	–	–	–	–	–	–	15±4	СР
Диоксид хлора+ПААГ	–	–	–	–	–	–	СР	СР

Примечание – СР - сплошной рост.

Было выявлено, что МБК раствора диоксида хлора составила 120 мкг/мл. Концентрации 60, 30 и 15 мкг/мл этого препарата оказывали на клетки кишечной палочки бактериостатическое действие, так как на МПА наблюдался равномерный рост по всей поверхности питательной среды. МБК ПААГ составила 30 мкг/мл, а его более низкие концентрации оказывали частично бактерицидное действие. При воздействии комплекса диоксида хлора и ПААГ на *E.coli* 113-13 МБК составила 30 мкг/мл; а концентрация комплекса 15 мкг/мл характеризовалась бактериостатическим действием.

Проведенные исследования позволили установить, что раствор диоксида хлора, ПААГ и комплекс этих препаратов являются эффективными бактерицидными препаратами в отношении кишечной палочки, как санитарно-показательного микроорганизма воды. Более эффективным в использовании оказался ПААГ, поскольку его МПК была в 4 раза ниже, чем у раствора диоксида хлора. Еще одним неоспоримым преимуществом этого препарата является его безопасность: ПААГ относится к IV классу токсичности и является малоопасным соединением, в отличие от раствора диоксида хлора, который относится к III классу токсичности и считается умеренно-опасным. Следовательно, ПААГ может быть рекомендован в качестве перспективного соединения для обеззараживания воды от микроорганизмов на различных этапах водоподготовки.

Таким образом, изучение биологической активности ПААГ и его модификаций в отношении микроорганизмов позволило установить выраженное антимикробное действие в отношении референс-штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также клинических изолятов коагулазопозитивных стафилококков, которое зависит от концентрации гидрат-ионов йода. Более чувствительными к действию ПААГ оказались грамположительные бактерии. Бактерицидное действие на грамотрицательные бактерии проявлялось в более высоких концентрациях, что, вероятно, связано с особенностью строения их клеточной стенки. Исследуемые препараты обладали фунгиостатическим и частично фунгицидным действием в отношении стандартных штаммов *C. albicans* 18, *A. fumigatus* и *M. raceniosus* в более высоких концентрациях по сравнению с их бактерицидным действием. ПААГ может быть использован как дезинфектант для профилактической и текущей дезинфекции.

Изучение биологической активности гетероциклических соединений

На первом этапе работы по изучению биологической активности гетероциклических соединений были изучены их антимикробные свойства. Среди 120 новых гетероциклических соединений различных классов был проведен отбор перспективных химических соединений, обладающих антимикробной активностью, на модели референс-штаммов микроорганизмов. Полученные результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Антимикробная активность исследуемых гетероциклических соединений

№ п/п	Лабораторный шифр вещества	МПК, мкг/мл			
		<i>E.coli</i> 113-13	<i>S.aureus</i> 209 P	<i>B. cereus</i> 8035	<i>C. albicans</i> 18
1	2	3	4	5	6
Енамины					
1.	А-2	100	25	50	–
2.	Е-4	–	1,60	–	6,75
Полифункциональнозамещенные эфиры					
3.	ПЭ-45	–	0,80	–	–
4.	ПЭ-46	–	0,80	–	–
5.	ПЭ-49	–	0,80	–	–
Семикарбазоны					
6.	С-9	–	1,60	–	–
7.	С-10	–	1,60	–	–
Соединения ряда фенилпентендиона					
8.	ПНВ-1	1,00	6,75	6,75	–
9.	ПНВ-Б	–	100	–	–
Халконы					
10.	ХА-44	–	1,60	–	–
11.	ХА-47	–	1,60	–	–

Примечание – «–» – отсутствие активности

В ходе проведенных исследований было установлено, что выраженной антимикробной активностью характеризовались гетероциклические соединения ряда енамина, полифункциональнозамещенных эфиров, фенилпентендиона, халкона и семикарбазона. Среди четырнадцати исследованных представителей ряда енамина анти-

микробной активностью обладали два препарата с лабораторным шифром Е-4 – этил-2-метил-4-(1-пиперидил)-6-(3-нитрофенил)-циклогекса-1,3-диен-карбоксилат и А-2 – адамантилметилен-циклогексен-дикарбоксилат. Соединение Е-2 характеризовалось выраженной антистафилококковой активностью и его МПК для *S. aureus* 209 Р составила 1,6 мкг/мл. Соединение А-2 проявляло антимикробную активность в отношении референс-штаммов исследуемых бактерий, однако, значения МПК были высокими и составили для *E. coli* 113-13, *B. cereus* 8035 и *S. aureus* 209 Р 100, 50 и 25 мкг/мл соответственно.

Из пяти представителей ряда полифункциональнозамещенных эфиров установлены бактерицидные концентрации в отношении *S. aureus* 209 Р трех соединений: 2,2'-ди-(3-(3-метокси-4-гидроксифенил)-2,4-диацетил-5-гидрокси-5-метилциклоген-1-ил)-диэтиловый (ПЭ-46), 2,2'-ди-(3-фенил-2,4-ди-ацетил-5-гидрокси-5-метилциклоген-1-ил)-диэтиловый (ПЭ-45) и 2,2'-ди-(3-(3-нитрофенил)-2,4-диацетил-5-гидрокси-5-метилциклоген-1-ил)-этиловый (ПЭ-49), МПК которых составила 0,8 мкг/мл. В отношении *E. coli* 113-13 и *B. cereus* 8035 исследованные препараты антимикробной активностью не обладали.

Среди шести соединений ряда семикарбазона была выявлена высокая антистафилококковая активность двух представителей: С-9 – диэтил-4-гидрокси-4-метил-6-семи-карбазоно-2-(4-метоксифенил)-циклогексан-1,3-дикарбоксилат и С-10 – диэтил-4-гидрокси-4-метил-6-семикарбазоно-2-тиенилциклогексан-1,3-ди-карбоксилат. Эти соединения обладали бактерицидным характером действия на клетки *S. aureus* 209 Р в концентрации 1,60 мкг/мл.

Из пяти соединений ряда фенилпентендиона только два препарата обладали антимикробной активностью по отношению к референс-штаммам микроорганизмов. Препарат ПНВ-1 (2,4-дихлор-1,3,5-трифенил-2-пентен-1,5-дион) характеризовался бактерицидным характером действия в отношении грамположительных бактерий – *S. aureus* 209 Р и *B. cereus* 8035, МПК для которых составила 6,75 мкг/мл. Наибольшую антимикробную активность ПНВ-1 проявлял в отношении референс-штамма *E. coli* 113-13 и его бактерицидная концентрация составила 1 мкг/мл. Препарат ПНВ-Б (1,3,5-трифенил-2-пентен-1,5-дион) проявил низкую антимикробную активность в отношении референс-штаммов бактерий по сравнению с ПНВ-1: установлено бактерицидное действие только в отношении *S. aureus* 209 Р, для которого МПК составила 100 мкг/мл.

Среди пяти исследованных соединения ряда халкона были отобраны два представителя: 4-(диметил-амино)бензилиден)пентан-2,4-дион (ХА-44) и этил-2-(4-гидроксибензилиден)-3-оксобутаноат (ХА-47), которые проявляли антистафилококковую активность в отношении *S. aureus* 209 Р, а МПК этих препаратов составила 1,6 мкг/мл. Однако эти вещества не проявили антимикробной активностью в отношении *E. coli* 113-13 и *B. cereus* 8035.

Из всех протестированных соединений только один представитель ряда енаминов Е-4 проявил выраженную активность в отношении референс-штамма *C. albicans* 18, при этом значение его МПК составило 6,75 мкг/мл.

Таким образом, скрининг гетероциклических соединений позволил отобрать 11 представителей различных классов, которые обладали антимикробной активностью по отношению к референс-штаммам грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также к низшим грибам. Для дальнейших исследований нами были выбраны препараты, для которых значения МПК составляло не более 10 мкг/мл.

На следующем этапе работы была проведена оценка представителей различных классов по показателям биологической агрессии и антиоксидантной активности. Установлено, что наименьшей биологической агрессией и наибольшей антиоксидантной активностью обладали соединения ряда конденсированных замещенных диазобицикло-нондиенов, кумаринов, конденсированных дигидропиридинов, циклических конденсированных тиопиранов, енаминов и кетонов. Для дальнейших исследований нами были отобраны 14 представителей гетероциклических соединений, показатели биологической активности которых представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Биологическая активность гетероциклических соединений

№ п\п	Лабораторный шифр соединения	Выживаемость бактериофага, % (M ± m)	Антиоксидантная активность, у.е. (M ± m)
1.	ЦГД-1	104±5,6*	2,77±0,14*
2.	ЦГД-3	114,5±17,1*	1,60±0,04*
3.	ЦГД-4	97±4,8*	1,71±0,06*
4.	КМ-1	66±2,4*	0,86±0,01*
5.	КМ-2	108±14,7*	1,34±0,06*
6.	ОХ	81±3,8*	1,95±0,08*
7.	ГГХ-4	78±3,4*	1,76±0,08*
8.	ГГХ-5	33±2,7*	2,41±0,09*
9.	ГГХ-6	47±4,3*	3,06±0,11*
10.	ГХ	59±3,2*	4,30±0,16*
11.	НД-3	58±2,8*	1,64±0,08*
12.	ФДЕ	37±2,1*	1,85±0,11*
13.	ДФЦ	87±5,1*	1,65±0,07*
14.	ФДТ	88±4,6*	1,70±0,04*

Примечание – * наличие достоверности при уровне значимости $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Те соединения, в которых сочетались низкая биологическая агрессия и высокая антиоксидантная активность использовали для создания экспериментальных сред защиты референс-штаммов бактерий, подвергнутых лиофильному высушиванию.

Влияние химической структуры гетероциклических соединений на их биологическую активность

Представляло интерес выявить зависимость биологической активности гетероциклических соединений от их химической структуры. Нами рассмотрен механизм ингибирующего действия исследованных производных кумарина, структурные формулы которых представлены на рисунке 4, который можно объяснить следующим образом.

Наибольшую ингибирующую активность проявляют молекулы, содержащие «плоские заместители» в гетероциклическом фрагменте, например, карбоксикумарин (рисунок 4 – а). Метилирование пиранового цикла кумарина в положении 4, в целом, сопровождается существенным ослаблением антифаговой активности испытуемых соединений. К усилению этого эффекта также приводит и включение электроноакцепторных заместителей в положения 6, 7, 8. Причем, если заместителем является только ОН-группа в положении 7, то ингибирующее действие производного возрастает в 1,5 раза, по сравнению с ситуацией, когда в этом положении находится объемный электроноакцепторный заместитель (в нашем случае, NH-группа) или планарная

ОН-группа, сопряженная водородной связью с ОН-группами либо в положении 8, либо в положении 6. Антифаговой активностью на уровне соединений метилкумарина (рисунок 4 – в) и 7,8-диоксикумарина (рисунок 4 – е) обладает и другой метилированный аналог кумарина со свободной ОН-группой в положении 6 – 6-оксикумарин (рисунок 4 – д).

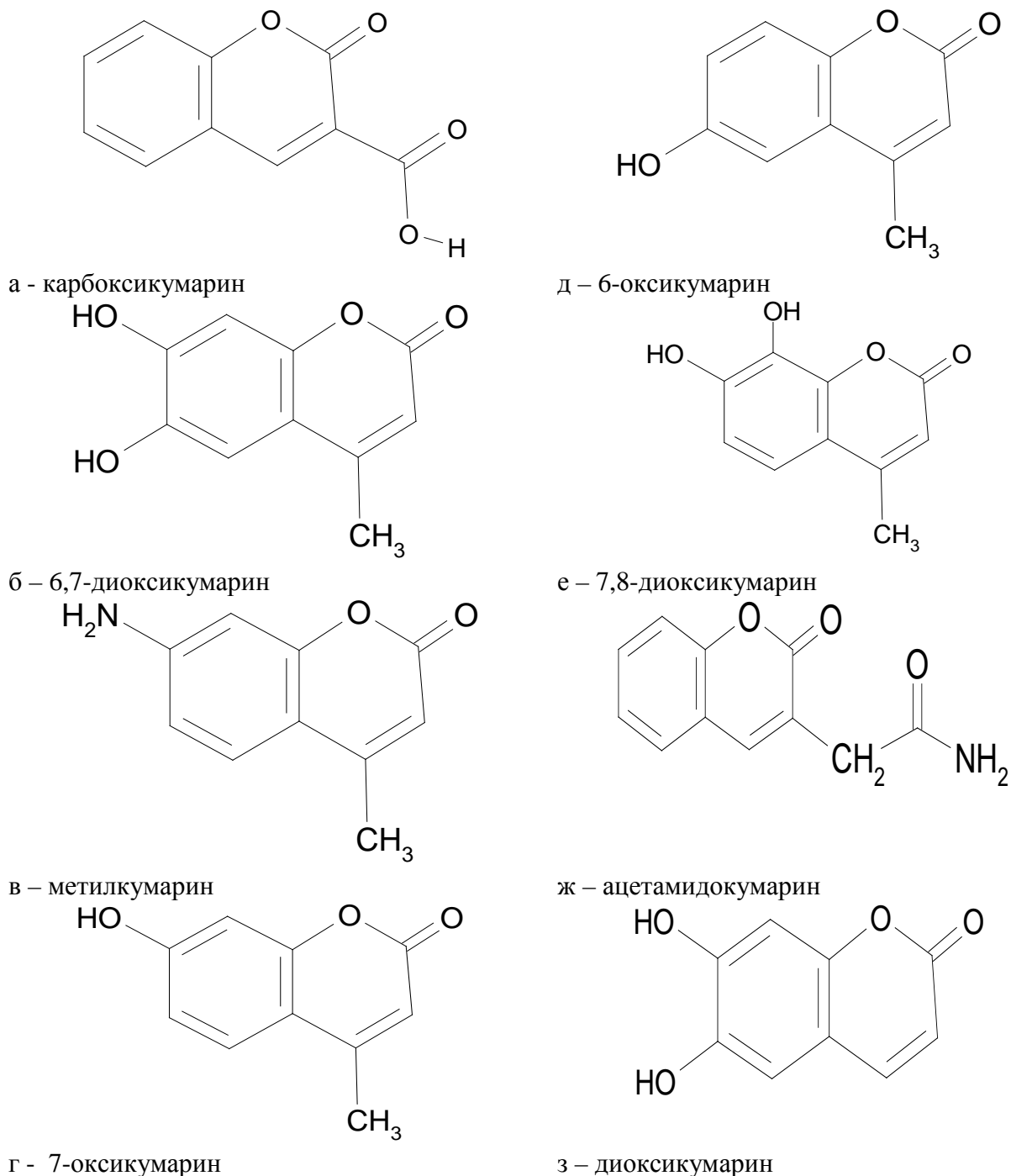


Рисунок 4 – Структурные формулы производных кумарина

Отличительная взаимосвязь структуры ингибитора с антифаговой активностью позволяет предположить, что инактивирующее действие метилированных производных кумарина обусловлено способностью этих молекул к стекинг-взаимодействиям с ДНК бактериофага Т4 не только благодаря плоской структуре кумаринового ядра,

но и возможностью стабилизации стекинг-структур водородными связями электроноакцепторных заместителей.

Определение токсичности гетероциклических и полимерных соединений

Параллельно с изучением биологической активности исследуемых гетероциклических и полимерных соединений было проведено их предварительное биотестирование на токсичность по общепринятым методикам с использованием тест-объекта *Daphnia magna Straus*. По результатам исследований были отобраны соединения с наименьшей токсичностью: 4 гетероциклических соединения (ПНВ-1 из ряда фенилпентендиона, ХА-44 из ряда халконов, ПЭ-46 из ряда полифункциональнозамещенных эфиров и Е-4 из ряда диенаминов), ПААГ и его модифицированные аналоги.

Далее провели оценку острой токсичности отобранных соединений по стандартной методике на лабораторных белых мышах (самцах) с внутрибрюшинным и пероральным способами введения препаратов.

Значение показателя LD_{50} для ПНВ-1 составило 420 мкг/кг; для соединений ХА 44, ПЭ 46 и Е 4 – 500 мкг/кг, что позволило отнести данные соединения к умеренно-опасными (III класс токсичности). Для ПААГ и его модифицированных аналогов не удалось установить значение LD_{50} , т.к даже введение максимально возможной концентрации препаратов (2000 мг/кг) не вызывало изменения общего состояния животных. Поэтому ПААГ и его модифицированные аналоги были отнесены к малоопасным соединениям IV класса токсичности.

Создание инновационных препаратов на основе гетероциклических соединений и полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов

Создание инновационных препаратов для медико-биологической и ветеринарной практики предполагает использование современных технологий и методических подходов при их конструировании. Одним из перспективных направлений является создание структур «ядро-оболочка».

В наших исследованиях была изучена биологическая активность структур «ядро-оболочка», созданных из наноагрегатов флавоноидов (ядро) и ПААГ (полиэлектролитной оболочки). Антимикробную активность полученных структур изучали в сравнении с нестабилизированными наноагрегатами флавоноидов и полиэлектролитом в отношении референс-штаммов и клинических изолятов бактерий. Рабочие концентрации наноагрегатов флавоноидов составили от 10 до 2,5 мг/мл.

Установлено отсутствие антимикробной активности в отношении исследуемых микроорганизмов наноагрегатов флавоноидов (рост микроорганизмов с характерными культуральными признаками отмечен во всех опытных образцах).

Результаты антимикробной активности структур «ядро-оболочка», полученных путем модификации наноагрегатов флавоноидов ПААГ, представлены в таблице 14. Было установлено, что полимер ПААГ и структуры «ядро – оболочка», созданные на его основе, обладали выраженной антимикробной активностью, однако показатели МПК достоверно не отличались друг от друга.

Таким образом, было установлено, что структуры «ядро – оболочка», состоящие из наноагрегатов флавоноидов, покрытых полимерной оболочкой ПААГ, характеризуются антимикробными свойствами. По данным литературы биофлавоноиды, содержащиеся в прополисе, обладают выраженной регенерирующей способностью. Поэтому в качестве перспективного направления использования структур «ядро-оболочка», созданных на основе наноагрегатов флавоноидов и биосовместимого

полимера ПААГ, обладающего антимикробной активностью, можно рассматривать создание инновационного препарата для лечения неосложненных и гнойных ран.

Таблица 14 – Влияние структур «ядро-оболочка» на выживаемость исследуемых микроорганизмов

№	Исследуемые микроорганизмы	МПК, мкг/мл
1	<i>S. aureus</i> 209 P	–
2	<i>S. aureus</i> № 2	–
3	<i>S. aureus</i> № 6	–
4	<i>S. aureus</i> № 21	–
5	<i>S. aureus</i> № 23	–
6	<i>S. aureus</i> № 92	–
7	<i>S. aureus</i> № 430	–
8	<i>B. cereus</i> 8035	–
9	<i>E. coli</i> M-17	–
10	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	64

Поскольку поиск химических соединений, обладающих выраженной антимикробной активностью и низкой токсичностью для макроорганизма, является актуальным и востребованным в медико-биологической и ветеринарной практике, представляло интерес изучить биологическую активность структур «ядро-оболочка», созданных на основе некоторых гетероциклических соединений, в сравнении с их немодифицированными аналогами, в отношении референс-штаммов и клинических изолятов бактерий. В исследованиях были использованы соединения ряда енаминов, поскольку они являются структурными аналогами противовирусных препаратов. Соединения А-1, А-3, Т-1 и Т-2 плохо растворялись даже при высокой концентрации диметилсульфоксида и их рабочие разведения представляли собой суспензии, в которых через некоторое время выпадал осадок. Из всех исследованных соединений лучшая растворимость была у соединения А-2, которое и было отобрано в качестве «ядра» для создания препарата. Антимикробная активность соединения А-2 представлена в таблице 15.

Таблица 15 – Антимикробная активность адамантилметилена-циклогексен-дикарбоксилата

№	Исследуемые микроорганизмы	МПК, мкг/мл
1	<i>S. aureus</i> 209 P	25
2	<i>S. aureus</i> № 2	50
3	<i>S. aureus</i> № 6	100
4	<i>S. aureus</i> № 21	25
5	<i>S. aureus</i> № 23	50
6	<i>S. aureus</i> № 92	100
7	<i>S. aureus</i> № 430	100
8	<i>B. cereus</i> 8035	50
9	<i>E. coli</i> M-17	100
10	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-

В ходе проведенных исследований было установлено, что МПК соединения А-2 для референс-штамма *S. aureus* 209 P и клинического изолята *S. aureus* № 21 составила 25 мкг/мл; для клинических изолятов *S. aureus* № 2 и № 23 – 50 мкг/мл, *S. aureus* № 92 и № 430 – 100 мкг/мл.

МПК А-2 для *B. cereus* 8035 составила 50 мкг/мл, а для *E. coli* 113-13 – 100 мкг/мл. Для *P. aeruginosa* ATCC 27853 не удалось определить МПК, т.к. во всех пробирках наблюдался рост в виде равномерного помутнения со слизистой пленкой на поверхности; при концентрации соединения А-2 100 мкг/мл наблюдалось нарушение пигментации.

При создании структуры «ядро-оболочка», в которой в качестве ядра было использовано соединение А-2, путем последовательной адсорбции формировалась полиэлектролитная оболочка из 1 % ПААГ. Биологическую активность данной структуры оценивали методом серийных разведений. Полученные результаты представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Биологическая активность структуры «ядро-оболочка» адамантилметилен-циклогексен-дикарбоксилата, модифицированного ПААГ

№	Исследуемые микроорганизмы	МПК, мкг/мл
1	<i>S. aureus</i> 209 P	0,4
2	<i>S. aureus</i> № 2	1,6
3	<i>S. aureus</i> № 6	1,6
4	<i>S. aureus</i> № 21	0,8
5	<i>S. aureus</i> № 23	0,8
6	<i>S. aureus</i> № 92	3,2
7	<i>S. aureus</i> № 430	6,4
8	<i>B. cereus</i> 8035	3,2
9	<i>E. coli</i> M-17	50
10	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	25

Установлено повышение биологической активности соединения А-2 после его модификации полимером ПААГ. На рисунке 5 представлены диаграммы МПК соединения А-2 и его модификации ПААГ в виде структуры «ядро-оболочка» в отношении референс-штаммов бактерий. Отмечено повышение антимикробной активности структуры «ядро-оболочка» в отношении *S. aureus* 209 P – в 62 раза, *B. cereus* 8035 – в 16 раз, *E. coli* 113-13 – в 2 раза. МПК модифицированного соединения А-2 для *P. aeruginosa* ATCC 27853 составила 25 мкг/мл.

На рисунке 6 представлены диаграммы МПК соединения А-2 и структуры «ядро-оболочка» на его основе в отношении референс-штамма и клинических изолятов золотистого стафилококка. Выявлено повышение антимикробной активности созданного препарата в отношении *S. aureus* № 2, № 21 и № 92 – в 32 раза, *S. aureus* № 430 – в 16 раз.

Отмечен синергидный эффект взаимодействия гетероциклического соединения с полимером, который в итоге приводил к повышению антимикробных свойств ПААГ. Особенно ярко это проявлялось в отношении *P. aeruginosa* ATCC 27853, поскольку происходило увеличение значения МПК в 2,5 раза.

Проведенные исследования позволили установить антимикробную активность структуры «ядро-оболочка» на основе соединения А-2 и ПААГ, которая в большей степени выражена в отношении референс-штаммов и клинических изолятов грамположительных бактерий. Более высокие значения МПК в отношении референс-штаммов грамотрицательных бактерий, вероятно, связаны с особенностями строения их клеточной стенки.

Таким образом, полученные результаты позволяют нам рассматривать соединение ряда енаминов адамантилметилен-циклогексен-дикарбоксилат в комплексе с

ПААГ как перспективный антимикробный препарат, а создание комплексов «ядро-оболочка» на основе гетероциклических соединений и биосовместимых полимеров эффективными для повышения биологической активности синтетических препаратов.

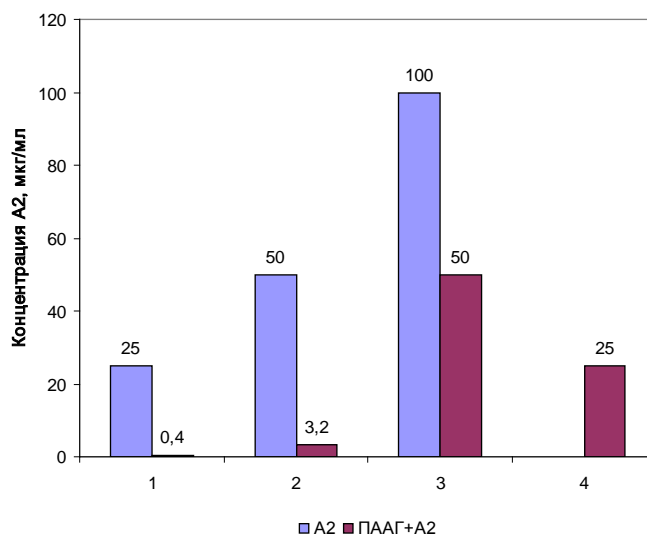


Рисунок 5 – МПК А2 и структуры «ядро-оболочка» ПААГ+А2 в отношении референс-штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий:

1 - *S. aureus* 209 P; 2 - *B. cereus* 8035; 3 - *E. coli* 113-13; 4 - *P. aeruginosa* ATCC 27853

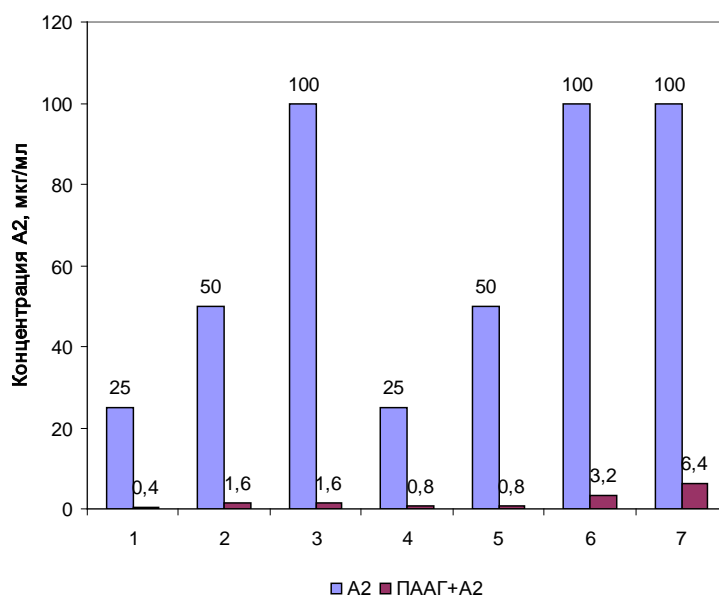


Рисунок 6 – МПК А-2 и структуры «ядро-оболочка» ПААГ+А2 в отношении референс-штамма и клинических изолятов коагулазоположительных стафилококков:

1 - *S. aureus* 209 P; 2 - *S. aureus* № 2; 3 - *S. aureus* № 6; 4 - *S. aureus* № 21;
5 - *S. aureus* № 23; 6 - *S. aureus* № 92; 7 - *S. aureus* № 430

На следующем этапе работы нами была изучена ранозаживляющая способность наноагрегатов флавоноидов и структур «ядро-оболочка», созданных на их основе путем обработки ПААГ. Оценку ранозаживляющих свойств препаратов проводили по

ежесуточному уменьшению площади полнослойных ран. Полученные результаты представлены на диаграмме (рисунок 7).

Было установлено, что в опытной группе животных наблюдается статистически достоверное уменьшение площади раневой поверхности, начиная со вторых суток эксперимента, а полное заживление ран происходит на 8 сутки. В контрольной группе животных, раны которых не обрабатывали, полное заживление ран наступало на 14 сутки от начала эксперимента. Полное заживление ран контрольной группы мышей, раны которых обрабатывали суспензией, содержащей наноагрегаты флавоноидов, происходило на 11 сутки.

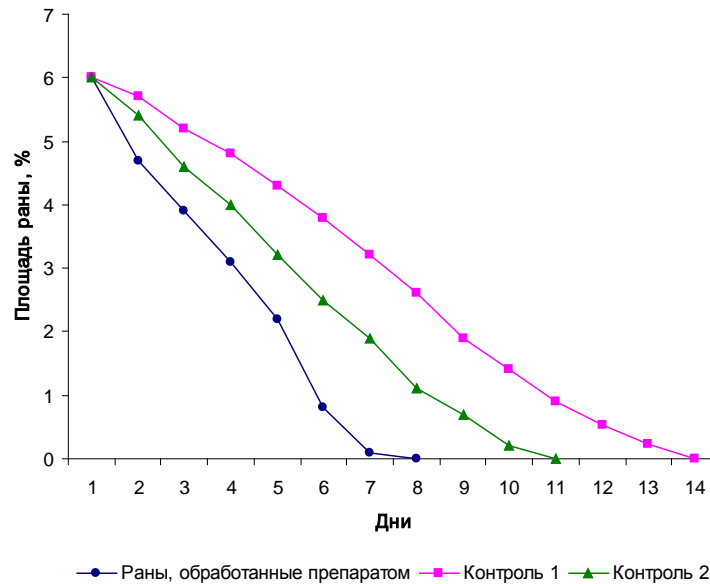


Рисунок 7 – Динамика изменения площади экспериментальных ран

Полученные результаты позволяют предположить, что большая эффективность структур «ядро-оболочка» по сравнению с нестабилизированными агрегатами биофлавоноидов связана с синергидным эффектом и большей биодоступностью созданных нами инновационных препаратов. Помимо этого, наличие в составе структур «ядро-оболочка» ПААГ, для которого ранее нами была установлена выраженная антимикробная активность, снижает риск развития воспаления и контаминации раневой поверхности различными микроорганизмами. Следовательно, препарат, содержащий структуры «ядро-оболочка», созданные на основе наноагрегатов флавоноидов, покрытых биосовместимым полимером ПААГ, может быть рекомендован как эффективное ранозаживляющее средство.

Далее нами были изучены фильтрующие свойства гранул органобентонита и созданных на их основе структур «ядро-оболочка», модифицированных полимером ПААГ, в отношении санитарно-показательных микроорганизмов воды. Исследование перспектив использования ПААГ в качестве компонента фильтрующих систем проводили с использованием гранул органобентонита, которые были предоставлены ООО НПП «Лисскон» (г. Саратов).

В качестве экспериментальной модели использовали грамотрицательные бактерии *E. coli* 113-13, как санитарно-показательный микроорганизм воды. Из суточной культуры исследуемого микроорганизма готовили взвесь в физиологическом растворе по оптическому стандарту мутности 10 Ед (ГИСК им. Тарасевича), а затем титровали ее до рабочей концентрации 1×10^3 м.к./мл.

В качестве фильтра использовали гранулы органобентонита в чистом виде, а также после обработки 1 % раствором ПААГ. Гранулы помещали в стеклянную колонку высотой 30 см. Фильтрацию осуществляли путем пропускания трех объемов по 100 мл взвеси микроорганизмов через колонку с гранулами. Затем отбирали по 0,1 мл фильтрата из каждой пробы, вносили в чашку Петри с МПА и с помощью шпателя распределяли по всей поверхности плотной питательной среды. Посевы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 24 часов, после чего подсчитывали количество выросших колоний в 1 мл фильтрата. В качестве контроля проводили посев рабочей концентрации взвеси.

Нами было проведено фильтрование взвеси *E.coli* 113-13 с концентрацией микробных клеток, близкой по содержанию в сточных бытовых водах, через фильтрующие системы, содержащие гранулы органобентонита и гранулы, обработанные 1 % раствором ПААГ, которые представляли собой структуру «ядро-оболочка». Полученные результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Влияние полиазилидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов, на выживаемость *E.coli* 113-13

Контроль	Фильтрат, КОЕ/мл (M±m)	
	Гранулы органобентонита	Гранулы органобентонита+полимер
586±67	473±51	37±1,9*

Примечание – * наличие достоверности при уровне значимости $p < 0,05$ по отношению к контролю.

При проведении фильтрации через гранулы органобентонита наблюдалась частичная механическая задержка бактерий кишечной палочки, а количество КОЕ/мл достоверно не отличалось от контрольных значений. При этом в посевах фильтрата отмечено появление колоний, отличающихся по морфологическим свойствам от колоний *E.coli* 113-13, что свидетельствовало о присутствии в гранулах органобентонита посторонней микрофлоры.

При посеве фильтрата из системы с обработанными полимером гранулами органобентонита, отмечено уменьшение количества КОЕ/мл в среднем в 15 раз по сравнению с контролем. Было установлено также, что на степень обеззараживания влияет скорость фильтрации.

Для определения сохранения клеток *E. coli* 113-13 на гранулах, обработанных полимером, через 24 часа после фильтрования взвеси через фильтр пропускали стерильный физиологический раствор. Затем 0,1 мл полученного фильтрата высевали на поверхность плотной питательной среды аналогично вышеприведенным экспериментам. Через 24 часа культивирования наблюдалось отсутствие роста исследуемого микроорганизма на поверхности МПА.

Было установлено, что ПААГ, адсорбированный на гранулах органобентонита, обладает бактерицидными свойствами в отношении *E.coli* 113-13. Создание структур «ядро-оболочка» на основе органобентонита и полимера ПААГ может рассматриваться как перспективное направление в создании инновационных эффективных фильтрующих систем.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что созданные на основе ПААГ инновационные препараты являются более эффективными по сравнению с исходными, что позволяет рекомендовать их к внедрению в медико-биологической и ветеринарной практике.

Создание инновационных сред защиты на основе гетероциклических соединений с антиоксидантной активностью для микроорганизмов, находящихся в условиях действия стрессовых факторов в процессе хранения в коллекциях культур

Для оценки влияния гетероциклических соединений, обладающих антиоксидантной активностью, на выживаемость микроорганизмов, находящихся в условиях стресса, проводили лиофильное высушивание вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Выращенную культуру смывали средой высушивания – сахарозо-желатиновой средой (среда Файбича), состоящей из 10% сахарозы, 1,5 % желатины и 0,1% агара (рН 7,1-7,2) – СЖА. В опытные образцы в состав защитных сред вносили те гетероциклические соединения, в которых сочетались низкая биологическая агрессия и высокая антиоксидантная активность. Оптимальная концентрация исследуемых соединений была подобрана экспериментальным путем и составляла 5-100 мкг/мл. Приготовленную взвесь бактерий разливали в стерильные ампулы по 0,2 мл и лиофилизировали. Для оценки влияния синтетических антиоксидантов на выживаемость исследуемых бактерий, подвергнутых лиофилизации использовали методику ускоренного определения сроков хранения *Y. pestis* EV НИИЭГ (Методика определения термостабильности..., 1985).

Для проведения лиофилизации были отобраны 14 соединений из ряда конденсированных замещенных диазобикакло-нондиенов (НД-1), кумаринов (КМ-1, КМ-2), конденсированных дигидропиридинов (ГГХ-5, ГГХ-6), енаминов (ФДЕ,ДФЦ, ФДТ), циклических конденсированных тиопиранов (ГТХ-4), кетонов (ЦГД-1, ЦГД-3, ЦГД-4), конденсированных пиранов (ГХ) и пиранов (ОХ). Согласно методике был проведен расчет превышения сроков хранения лиофилизированных культур опытных образцов по сравнению с контролем. Полученные результаты представлены в таблице 18.

Установлено, что внесение в состав сред защиты исследованных гетероциклических соединений различных классов, обладающих антиоксидантной активностью, приводило к увеличению сроков хранения вакцинного штамма чумного микроба. Наименьшее увеличение сроков хранения (в 1,25-1,6 раза) наблюдалось при внесении в состав сред защиты соединений с лабораторным шифром ФДЕ, ГТХ-4, КМ-1 и КМ-2. Введение в состав сред соединений с лабораторным шифром ЦГД-4, Нд-3, ГГХ-5, ГГХ-6,ДФЦ и ФДТ увеличивало срок хранения *Y. pestis* EV НИИЭГ более чем в 2,5 раза по сравнению с контролем.

Наибольшим защитным действием характеризовались гетероциклические соединения с лабораторным шифром ГГХ-5, ОХ и ЦГД-1, введение которых в состав СЖА приводило к увеличению сроков хранения клеток вакцинного штамма чумного микроба в 4,20, 4,45 и 4,62 раза соответственно по сравнению с контролем. Следовательно, гетероциклические соединения, обладающие низкой биологической агрессией и высокой антиоксидантной активностью могут быть использованы в качестве компонентов защитных сред в процессе лиофилизации реферес-штаммов микроорганизмов для повышения их жизнеспособности в условиях стресса.

Таблица 18 – Влияние сред стабилизации, содержащих новые классы АО, на сроки хранения клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в лиофилизированном состоянии

№ п/п	Лабораторный шифр соединения	Растворитель	Оптимальная концентрация антиоксиданта, мкг/мл	Превышение срока хранения над контролем
1.	ЦГД-1	0,1 % ДМСО	20	4,62
2.	ЦГД-3	0,1 % ДМСО	20	1,75
3.	ЦГД-4	0,1 % ДМСО	10	2,4
4.	КМ-1	0,1 % этанол	5	1,25
5.	КМ-2	0,1 % ДМСО	40	1,6
6.	ОХ	0,1 % ДМСО	20	4,45
7.	ГТХ-4	0,1 % ДМСО	100	1,17
8.	ГТХ-5	0,1 % ДМСО	20	4,20
9.	ГТХ-6	0,1 % ДМСО	20	2,83
10.	ГХ	0,1 % ДМСО	10	2,5
11.	НД-3	0,1 % ДМСО	10	2,44
12.	ФДЕ	0,1 % ДМСО	10	1,49
13.	ДФЦ	0,1 % ДМСО	20	2,37
14.	ФДТ	0,1 % ДМСО	20	2,22

Примечание – * наличие достоверности при уровне значимости $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Таким образом, проведенные нами исследования позволили установить, что наноструктуры, представленные МУНТ, оказывают влияние на основные биологические свойства исследуемых микроорганизмов, что может быть использовано для повышения эффективности фотодинамической терапии, действия пробиотических препаратов, а также для создания комплексов микроорганизмов-деструкторов, необходимых для утилизации наноматериалов. Отобранные гетероциклические соединения с антимикробной активностью и низкими показателями острой токсичности могут рассматриваться как перспективные химиотерапевтические препараты. Гетероциклические соединения, характеризующиеся высокой антиоксидантной активностью, являются перспективными компонентами сред защиты, предохраняющими микробные клетки от окислительного стресса и повышающими их жизнеспособность в процессе лиофилизации. Созданные нами структуры «ядро-оболочка» на основе биосовместимого полимера ПААГ и отобранных соединений являются эффективными инновационными препаратами, которые могут быть использованы в медико-биологической и ветеринарной практике для повышения эффективности химиотерапевтических и ранозаживляющих средств, а также как компоненты фильтрующих систем нового поколения.

ВЫВОДЫ

1. Установлено стимулирующее действие многостенных углеродных нанотрубок на рост и размножение *E. coli* 113-13, что выражается в увеличении количества КОЕ в 1,5 раза по сравнению с контролем. Показатели КОЕ *B.cereus* 8035 и *S. aureus* 209 P достоверно не отличались от контрольных значений.

2. Показано изменение культурально-морфологических свойств микроорганизмов при совместном культивировании исследуемых бактерий с многостенными углеродными нанотрубками – отмечена агрегация и увеличение размеров колоний *E. coli* 113-13 и *B.cereus* 8035, восстановление пигментации колоний *S. aureus* 209 P. Внесение наноструктур в питательную среду повышает адгезивную способность бактерий: по показателям индекса адгезии микроорганизмов клетки *E. coli* 113-13 становятся среднеадгезивными, а *S. aureus* 209 P – высокоадгезивными.

3. Выявлено увеличение на 62% числа КОЕ референс-штамма *B.cereus* 8035 при росте на синтетической среде М-9 с добавлением многостенных углеродных нанотрубок по сравнению с контролем, что свидетельствует о способности этих бактерий использовать нанотрубки в качестве единственного источника углерода.

4. Сочетанное воздействие синего светодиодного излучения (405 нм) и многостенных углеродных нанотрубок способствовало ингибированию роста клинических изолятов *S. aureus* № 92 и *S. epidermidis* № 11 и № 19е в 16, 11 и 52 раза соответственно по сравнению с контролем, что позволяет рассматривать данные наноструктуры в качестве перспективных фотосенсибилизаторов.

5. Доказано антимикробное действие на референс-штаммы и клинические изоляты грамположительных и грамотрицательных бактерий и микроскопических грибов гетероциклических соединений различных из ряда фенилпентендиона семикарбазона, халкона и полифункциональнозамещенных эфиров, МПК которых составила 0,80-6,75 мкг/мл. Соединения ряда кумаринов, енаминов, кетонов, циклических конденсированных тиопиранов, конденсированных дигидропиридинов и пиридинов обладали высокой антиоксидантной активностью; их использование в качестве компонентов сред защиты при лиофилизации повышало сроки хранения вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в 1,5-4,6 раза по сравнению с контролем.

6. Квантовохимические расчеты габаритных пространственных размеров молекул исследуемых соединений позволили установить зависимость проявления антимикробных и антиоксидантных свойств от пространственных характеристик молекул, значений их молекулярной массы, распределения электронных зарядов и наличия определенных химических функциональных групп.

7. Установлена высокая антимикробная активность полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов, в отношении референс-штаммов и клинических изолятов грамположительных и грамотрицательных бактерий и микроскопических грибов: для *S. aureus* 209 P, *B. cereus* 8035 и *E. coli* 113-13 значения МПК были ниже 2 мкг/мл, для *P. aeruginosa* ATCC 27853 МПК составила 64 мкг/мл, а для микроскопических грибов – 125-250 мкг/мл. Доказано, что антимикробная активность ПААГ зависит от концентрации гидрат ионов йода; по показателям острой токсичности ($LD_{50} > 500$ мг/кг) он относится к IV классу токсичности.

8. Обоснована технология создания структур «ядро-оболочка» с использованием в качестве «ядра» различных биологически активных носителей и «оболочки» из биосовместимого полимера – полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов.

9. Экспериментальные препараты на основе структур «ядро-оболочка», содержащие в качестве ядра наноагрегаты флавоноидов, характеризовались антимикробными и ранозаживляющими свойствами. Использование в качестве «ядра» адамантилметилена-циклогексен-дикарбоксилата приводило к увеличению его антимикробной активности в отношении исследуемых бактерий.

10. Доказана эффективность использования экспериментальных фильтрующих систем с антимикробными свойствами на основе структур «ядро-оболочка» с «ядром» из наноструктурированного органобентонита для комплексной водоочистки.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в журналах из списка рекомендованных ВАК РФ

1. Трехмерная микроскопия бактериальной клетки с высоким пространственным разрешением / Н.П. Коннов, Ю.П. Волков, О.В. Новикова (Нечаева) [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2002. – Вып. I (83). – С. 86-90.

2. Антифаговая и антиоксидантная активность замещенных кумаринов / О.В. Нечаева, Е.И. Тихомирова, О.П. Плотников [и др.] // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология. – 2007. – Т. 7, Вып. 2. – С. 3-7.

3. Изучение антимикробной активности некоторых карбо- и гетероциклических соединений / Н.Ф. Пермякова, О.В. Нечаева, Ю.А. Алексеева [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2009. – Том 11, № 2. – С. 30.

4. Изучение влияния углеродных нанотрубок на водную и биологические среды / О.В. Нечаева, Г.В. Торгашев, О.Е. Глухова [и др.] // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2009. – № 9. – С. 59-63.

5. Пермякова Н.Ф. Антимикробная активность некоторых новых карбо- и гетероциклических соединений / Н.Ф. Пермякова, О.В. Нечаева, Е.И. Тихомирова // Естественные и технические науки. – 2009. – № 5. – С. 93-97.

6. Оценка противомикробного действия некоторых новых карбо- и гетероциклических соединений / Н.Ф. Пермякова, О.В. Нечаева, М.С. Карнаухова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2009. – № 8. – С. 32-35.

7. Пермякова Н.Ф. Перспективные гетероциклические соединения с антимикробной активностью / Н.Ф. Пермякова, О.В. Нечаева, Е.И. Тихомирова // Фундаментальные исследования. – 2009. – № 9. – С. 66-67.

8. Пермякова Н.Ф. Использование синтетических антиоксидантов для сохранения жизнеспособности бактерий при действии стрессовых абиотических факторов / Н.Ф. Пермякова, О.В. Нечаева, А.Н. Кушнарченко // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2010 – Т. 10, Вып. 2. – С. 60-62.

9. Изучение влияния углеродных нанотрубок на водную и биологическую среды / М.В. Самарский, О.В. Нечаева, Н.Ф. Пермякова [и др.] // Нелинейный мир. – 2010. – Т. 8, № 2 – С. 74-75.

10. Антимикробная активность N-адамантил-метиленаминоциклогексендикарбоксилатов / Е.А. Зинина, Н.Ф. Шуршалова, О.В. Нечаева [и др.] // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2012. – Т. 12., Вып. 2. – С. 8-9.

11. Изучение фильтрующих свойств модифицированных органобентонитовых гранул в отношении санитарно-показательных микроорганизмов воды / Н.В. Веденева, О.В. Нечаева, Д.А. Заярский [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 6 (часть 4). – С. 906-908.

Публикации в других изданиях:

12. Универсальный малогабаритный комплекс СЗМ для работы в полевых условиях / Н.П. Коннов, В.Б. Байбурин, О.В. Новикова (Нечаева) [и др.] // Тезисы докладов XVIII Российской конференции по электронной микроскопии. – Черногоровка, 2000. – С. 74.

13. Volkov Y.P. Bacterial cell ultra structure three-dimensional image / Y.P. Volkov, O.V. Novikova (Nechaeva), N.P. Konnov // SPIE proceedings. – 2001. – V. 4434. – P. 251-255.

14. Volkov Y.P. Transmission electron microscopy study of thin sections of ultrasmall quantity of cell / Y.P. Volkov, O.V. Novikova (Nechaeva), N.P. Konnov // SPIE proceedings. – 2001. – V. 4434. – P. 256-259.

15. Plague and anthrax bacteria cell ultra structure 3D images / Y.P. Volkov, N.P. Konnov, R.A. Yakimenko, O.V. Novikova (Nechaeva) // SPEI proceedings. – 2001. – V. 4707. – P. 371-374.
16. Transmission electron microscopy study of flea lymph cell thin sections / Y.P. Volkov, N.P. Konnov, R.A. Yakimenko, O.V. Novikova (Nechaeva) // SPEI proceedings. – 2001. – V. 4707. – P. 367-370.
17. Волков Ю.П. Трехмерная визуализация ультраструктуры бактериальных клеток / Ю.П. Волков, О.В. Новикова (Нечаева), Н.П. Коннов // РЭМ 2001: Тезисы докладов XII Российского симпозиума по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел. – Черногловка, 2001. – С. 33.
18. Волков Ю.П. Электронномикроскопическое исследование структуры сверхмалых количеств клеток / Ю.П. Волков, О.В. Новикова (Нечаева), Н.П. Коннов // РЭМ 2001: Тезисы докладов XII Российского симпозиума по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел. – Черногловка, 2001. – С. 34.
19. The combination of the electrophoretic and electronic microscopy methods for determination of localization of the thallium-containing synthetic antioxidants on the surface of the plague microbe cells / V.N. Korsukov, O.V. Novikova (Nechaeva), N.P. Konnov [et al.] // International School for Young Scientists on Optics, Laser Physics & Biophysics: Workshop on Optical Technologies in Biophysics & Medicine III. – Saratov, 2001. – P. 111-117.
20. Локализация в клетках чумного микроба антиоксидантов, синтезированных на основе таллийорганических соединений / В.Н. Корсуков, О.В. Нечаева, Н.П. Коннов [и др.] // Композиты XXI века: Тезисы Международного симпозиума восточно-азиатских стран по полимерным композиционным материалам и передовым технологиям. – Саратов, 2005. – С. 42-45.
21. Алексеева Ю.А. Перспективы использования новых гетероциклических соединений, обладающих антимикробной активностью / Ю.А. Алексеева, О.В. Нечаева, Н.Ф. Пермякова // Молодежь и наука: итоги и перспективы: Материалы межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием. – Саратов, 2008. – С. 58-59.
22. Нечаева О.В. Влияние углеродных наноструктур на биологические свойства бактерий / О.В. Нечаева, Н.Ф. Пермякова, А.Н. Кушнаренко // Молодежь и наука: итоги и перспективы: Материалы межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием. – Саратов, 2008. – С. 85.
23. Антимикробная активность некоторых новых карбо- и гетероциклических соединений / Н.В. Поплевина, В.Е. Субботин, Н.Ф. Пермякова, Е.С. Зуйкова, А.Н. Кушнаренко, М.С. Карнаухова, Н.Н. Кузнецова, О.В. Нечаева // Сборник материалов Всероссийской молодежной выставки-конкурса прикладных исследований, изобретений и инноваций. – Саратов, 2009. – С.78.
24. Оценка антимикробной активности новых поликарбонильных карбо- и гетероциклических соединений / Н.Н. Кузнецова, Н.Ф. Пермякова, О.В. Нечаева [и др.] // Биология наука XXI века: Сборник тезисов 14 Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых. – Пушино, 2010. – Т 2. – С. 238-239.
25. Влияние углеродных нанотрубок на биологические свойства бактерий / А.Н.Кушнаренко, Н.Ф. Пермякова, О.В. Нечаева [и др.] // Биология наука XXI века: Сборник тезисов 14 Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых. – Пушино, 2010. – Т 2. – С. 240.
26. Синтез и биологическая активность некоторых карбо- и гетероциклических соединений / В.В. Сорокин, В.Е. Субботин, Н.В. Поплевина, А.П. Кривенько, Н.Ф. Пермякова, О.В. Нечаева [и др.] // Фармообразование 2010. Часть II. Научные основы создания новых лекарственных средств: Материалы 4-ой Всероссийской с международным участием научно-методической конференции. – Воронеж, 2010. – С. 367-368.
27. Влияние углеродных нанотрубок на биологические свойства бактерий / Н.В. Петрова, А.Н. Кушнаренко, Н.Ф. Пермякова, О.В. Нечаева // Первые Международные Беккеровские чтения: Сборник трудов – Волгоград, 2010. – Часть II. – С.148-149.

28. Оценка острой токсичности новых поликарбонильных карбо и гетероциклических соединений с антимикробной активностью / Н.Ф. Пермякова, М.С. Карнаухова, О.В. Нечаева [и др.] // *Фундаментальные науки и практика: Межвузовский сборник научных трудов с материалами 2-ой Международной телеконференции.* – 2010. – Т.1, №2 – С. 98.

29. Нечаева О.В. Влияние гетероциклических соединений, обладающих антиоксидантной активностью, на собственные антиокислительные системы бактериальной клетки / О.В. Нечаева, О.П. Плотников // *Биоантиоксидант: Тезисы докладов VIII Международной конференции.* – Москва, 2010. – С. 327-329.

30. Нечаева О.В. Изучение морфологических и культуральных свойств условно-патогенных бактерий при действии многостенных углеродных нанотрубок / О.В. Нечаева, Н.Ф. Пермякова, Е.И. Тихомирова // *Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности: Сборник научных трудов Научно-практического семинара с международным участием.* – Ульяновск, 2011. – С.186-188.

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

32. Исследование антимикробной и ранозаживляющей активности структур «ядро-оболочка» на основе наноразмерных агрегатов флавоноидов / Д.А. Заярский, О.В. Нечаева, Г.М. Шуб [и др.] // *Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2012: Материалы Всероссийской молодежной конференции.* – Саратов, 2012. – С. 278-280.

33. Биологическая активность наноразмерных агрегатов флавоноидов, стабилизированных полидиметил-диаллиламмонием йодид сахарозы / М.М. Вакараева, О.В. Нечаева, Д.А. Заярский [и др.] // *Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве: Материалы Международной научно-практической конференции.* – Саратов, 2013. – С. 13-15.

34. Изучение фильтрующих свойств модифицированных органомбентонитовых гранул в отношении санитарно-показательных микроорганизмов воды / Н.В. Веденева, О.В. Нечаева, Д.А. Заярский [и др.] // *Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве: Материалы Международной научно-практической конференции.* – Саратов, 2013. – С. 245-246.

35. Вакараева М.М. Влияние полидиметилдиаллиламмония йодида сахарозы на выживаемость коагулазоположительных стафилококков / М.М. Вакараева, О.В. Нечаева, Д.А. Заярский // *Экологические проблемы промышленных городов: Сборник научных трудов по материалам 6-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.* – Саратов, 2013. – Т.2. – С. 40-42.

36. Разработка инновационной фильтрующей системы на основе органомбентонита и биополимера Униконс / Н.В. Веденева, О.В. Нечаева, Д.А. Заярский [и др.] // *Экологические проблемы промышленных городов: Сборник научных трудов по материалам 6-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.* – Саратов, 2013. – Т.2. – С. 42-46.

Патент

Устройство для осаждения и заливки в эпоксидную смолу сверхмалых количеств клеток: Патент на полезную модель № 40318 / Н.П. Коннов, Ю.П. Волков, О.С. Кузнецов, О.В. Нечаева. Патентообладатель: Федеральное государственное учреждение Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Заявка №2004113812, Приоритет полезной модели 06.05.2004 г.

Монография

Перспективы использования гетероциклических соединений в медико-биологической практике / Нечаева О.В., Шуршалова Н.Ф., Тихомирова Е.И., Плотников О.П. – Саратов, 2013. – 123 с.

Благодарности

Выражаю искреннюю благодарность своему научному консультанту доктору биологических наук, профессору Тихомировой Елене Ивановне за ценные советы, всестороннюю поддержку и помощь в выполнении работы.

Я глубоко признательна сотрудникам кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского, лично заведующему кафедрой, доктору медицинских наук, профессору Шубу Геннадию Марковичу и профессору кафедры, доктору медицинских наук Швиденко Инне Григорьевне за понимание, поддержку и всестороннюю помощь.

Выражаю благодарность профессору кафедры органической и биоорганической химии института химии СГУ, доктору химических наук Сорокину Виталию Викторовичу за предоставленные для наших исследований синтезированные гетероциклические соединения и ценные консультации.

Особую благодарность выражаю доктору ветеринарных наук, Заслуженному ветеринарному врачу РФ, директору ГНУ «Саратовский НИВИ» Россельхозакадемии Ласкавому Владиславу Николаевичу за предоставленную базу и помощь в проведении микробиологических исследований и экспериментов на лабораторных животных по ранозаживляющей способности исследованных препаратов.

Я искренне признательна доктору медицинских наук, старшему научному сотруднику, заведующему лабораторией коллекционных штаммов Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора Плотникову Олегу Петровичу за всестороннюю помощь в проведении исследований, ценные консультации и моральную поддержку.

Выражаю признательность сотрудникам кафедры экологии Саратовского государственного технического университета имени Гагарина Ю.А. за бескорыстную практическую помощь в проведении исследований на базе научной биологической лаборатории и НОЦ «Промышленная экология», искреннюю поддержку и доброе отношение.