



- им. Н. И. Лобачевского. Сер. Биология. Н. Новгород : Изд-во ННГУ, 2005. Вып. 1 (9). С. 85–98.
22. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. Минск : Высш. школа, 1973. 320 с.
23. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. М. : Практика, 1999. 459 с.
24. *Останко В. М.* Эйдологические, популяционные и ценогические основы фитосозологии на юго-востоке Украины. Донецк : Лебедь, 2005. 408 с.
25. *Кияк В. Г.* Малі популяції рослин і проблеми і перспективи досліджень // Ботаніка та мікологія : проблеми і перспективи на 2011–2020 рр. Київ, 2011. С. 18–20.
26. *Злобин Ю. А.* Популяционная экология растений : современное состояние, точки роста. Сумы : Универ. кн., 2009. 263 с.
27. *Миркин Б. М., Наумова Н. Г., Соломещ А. И.* Современная наука о растительности. М. : Логос, 2001. 264 с.
28. *Ермолаева Н. Н., Петрова Н. А., Шилова И. В.* Семенное возобновление *Delphinium pubiflorum* (DC.) Turcz. Ex Nutt в Саратовской области // Труды IX Междунар. конф. по экологической морфологии растений, посвященной памяти Ивана Григорьевича и Татьяны Ивановны Серебряковых. М., 2014. Т. 1. С. 184–187.
29. *Фирсова М. К.* Семенной контроль. М. : Колос, 1969. 280 с.

УДК 615.281

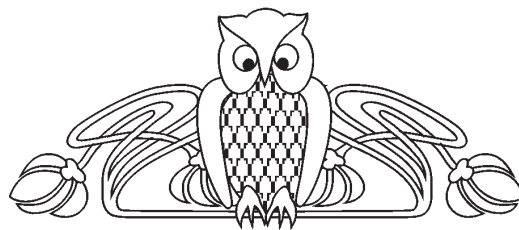
## РАЗРАБОТКА И ИСПЫТАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ОБРАЗЦОВ ИННОВАЦИОННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ СТРУКТУРЫ «ЯДРО–ОБОЛОЧКА»

Н. Ф. Шуршалова<sup>1</sup>, О. В. Нечаева<sup>2</sup>, М. М. Вакараева<sup>3</sup>,  
Е. И. Тихомирова<sup>3</sup>, Д. А. Заярский<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Саратовский государственный университет  
E-mail: francissella@rambler.ru

<sup>2</sup>Саратовский государственный медицинский университет  
E-mail: olgav.nechaeva@rambler.ru

<sup>3</sup>Саратовский государственный технический университет  
E-mail: ecology@sstu.ru



Разработаны варианты биологически активных препаратов по технологии структуры «ядро–оболочка», полученные путем послойного нанесения на поверхности носителей биосовместимого полимера. В качестве «ядра» использовали гетероциклическое соединение ряда енаминов и наноагрегаты флавоноидов; в качестве оболочки – полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода. Установлено значительное повышение антимикробной активности разработанных препаратов. Выявлено сокращение сроков регенерации полнослойных ран у животных при использовании инновационного препарата на основе стабилизированных биополимером наноагрегатов флавоноидов.

**Ключевые слова:** полиазолидинаммоний, антимикробная активность, биополимер, инновационные препараты, структура «ядро–оболочка».

### Developing and Testing Laboratory Samples of Innovative Biologically Active Preparations Based on the Core-shell Structure

N. F. Shurshalova, O. V. Nechaeva, M. M. Vakaraeva,  
E. I. Tikhomirova, D. A. Zayarskiy

We developed various options of biologically active agents based on the core–shell structure technology. They were obtained by layering biocompatible polymer on the surface of the carriers. As a core, we used a heterocyclic compound comprising of enamine and flavonoid nanoaggregates. As a shell, we used poly azolidine ammonium modi-

fied by iodine hydrate-ions. Our results implied a significant increase in antimicrobial activity of the preparations developed by us. Using innovative preparation based on flavonoid nanoaggregates stabilized by a biopolymer, we observed faster wound regeneration in animals.

**Key words:** poly azolidine ammonium, antimicrobial activity, biopolymer, innovative preparations, core–shell structure.

DOI: 10.18500/1816-9775-2015-15-3-76-80

Одним из перспективных направлений применения нанотехнологических методов в медицинской и фармацевтической практике является создание структуры «ядро–оболочка». Препараты, созданные по такому принципу, характеризуются высокой биологической активностью и обеспечивают возможность адресной доставки биологически активных и лекарственных средств. Это позволяет обеспечить защиту активного вещества от действия ферментов макроорганизма, а также увеличивает его биодоступность [1].

В качестве ядра может быть использовано любое твердое вещество с заданными свойствами, нерастворимое или малорастворимое в воде и имеющее размеры от нескольких микрон до нескольких десятков нанометров. Для формирования



оболочки применяются биосовместимые полиэлектролиты, обладающие низкой токсичностью и высоким значением  $LD_{50}$ . В настоящее время препараты, созданные по технологии «ядро–оболочка», находят широкое применение в медицинской практике для лечения онкологических заболеваний и фотодинамической терапии [2–5].

Для борьбы с возбудителями инфекционных заболеваний в практической медицине и ветеринарии широкое применение находят химиотерапевтические препараты, в основе которых содержатся гетероциклические химические соединения. Однако ко многим из них у большинства патогенных и условно-патогенных микроорганизмов формируется лекарственная устойчивость [6–8]. Поэтому с целью преодоления развития множественной лекарственной устойчивости и распространения полирезистентных штаммов микроорганизмов осуществляется поиск новых высокоэффективных гетероциклических соединений, обладающих антимикробной активностью, а также применение новых современных технологий [9, 10].

Ранее нами была установлена высокая антимикробная активность полимерного соединения – полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода (ПААГ-М) в отношении стандартных и клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, микроскопических грибов [11, 12]. В зависимости от концентрации полимер проявлял бактериостатическое или бактерицидное действие на данные микроорганизмы.

В этой связи представляло интерес создание структуры «ядро–оболочка» на основе гетероциклических соединений с антимикробной активностью и наноагрегатов флавоноидов с использованием биосовместимого полимера для повышения их эффективности.

Целью нашей работы являлась разработка лабораторных моделей инновационных препаратов с антимикробной и регенеративной активностью на основе структуры «ядро–оболочка» и испытание их свойств.

### Материалы и методы

Объектом исследования являлся полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ-М), представляющий собой неограниченно растворимый в воде полимер с молекулярной массой полимерной линейной цепи порядка 100–200 кДа, на концах которой присоединены молекулы сахарозы [13]. По результатам токсикологических испытаний данное соединение было отнесено к IV группе токсичности.

Структуры «ядро–оболочка» создавали методом последовательной адсорбции 1% раствора ПААГ-М на поверхности носителя. В качестве «ядра» в первом варианте препаратов использовали гетероциклическое соединение ряда енаминов – адамантилметилен-циклогексен-дикарбоксилат (А-2). Во втором варианте «ядром» являлись наноагрегаты флавоноидов, которые, согласно литературным данным, характеризуются выраженной регенеративной активностью [14–17].

В качестве экспериментальных моделей использовали референс-штаммы грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* 113-13, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, грамположительных бактерий *Bacillus cereus* 8035, *Staphylococcus aureus* 209P, а также клинические изоляты золотистого стафилококка *S. aureus* № 2, 6, 21, 23(MRSA), 92(MRSA), 430 из музея кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии СГМУ им. В. И. Разумовского.

Антимикробную активность исследуемых препаратов определяли методом серийных разведений (МУК 4.2.1890-04.) в мясо-пептонном бульоне (МПБ) и устанавливали минимальную подавляющую концентрацию (МПК) каждого препарата [15]. Через сутки высевали по 0,1 мл бульонной культуры на поверхность мясо-пептонного агара (МПА) в чашки Петри для определения характера действия исследуемых препаратов и их минимальной бактерицидной концентрации (МБК).

Оценку ранозаживляющего действия структур «ядро–оболочка», содержащих наноагрегаты флавоноидов, покрытые полимером, проводили на модели экспериментальных полнослойных ран у лабораторных мышей по ежедневному изменению площади раневой поверхности [16, 17].

Все результаты, полученные при проведении исследований, обработаны методами вариационной статистики с определением средних арифметических величин ( $M$ ) и средней ошибки средней арифметической ( $m$ ) по формуле Петерса с использованием константы Молденгауэра [18].

### Результаты и их обсуждение

При создании высокоэффективного препарата с антимикробной активностью нами были проведены сравнительные исследования антибактериальных свойств ПААГ-М, А-2 и структур «ядро–оболочка» на их основе.

Было установлено, что все исследованные бактерии проявили высокую чувствительность к полимеру, однако наименьшей чувствительностью характеризовался стандартный тест-штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 (таблица).



## Антимикробная активность ПААГ-М, А-2 и структуры «ядро–оболочка» на их основе

№	Исследуемый штамм	Концентрация соединения, мкг/мл			
		ПААГ-М		А-2	ПААГ-М+А-2
		МПК	МБК	МПК (МБК)	(МПК) МБК
1	<i>S. aureus</i> 209 P	2	16	25	0,4
2	<i>S. aureus</i> № 2	2	32	50	1,6
3	<i>S. aureus</i> № 6	2	16	100	1,6
4	<i>S. aureus</i> № 21	2	32	25	0,8
5	<i>S. aureus</i> № 23	2	64	50	0,8
6	<i>S. aureus</i> № 92	2	64	100	3,2
7	<i>S. aureus</i> № 430	2	16	100	6,4
8	<i>B. cereus</i> 8035	2	32	50	3,2
9	<i>E. coli</i> 113-13	2	250	100	50
10	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	64	–	–	25

Примечание. «–» – отсутствие антимикробного действия.

Соединение ряда енаминов А-2 обладало выраженной антимикробной активностью и проявило бактерицидный характер действия, поэтому показатели МПК и МБК совпадали и для большинства исследованных микроорганизмов лежали в пределах от 25 до 100 мкг/мл. Наименьшей чувствительностью к гетероциклическому соединению характеризовался стандартный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853, для которого не удалось определить МПК. Так, при использовании всех рабочих концентраций препарата наблюдался рост в виде равномерного помутнения со слизистой пленкой на поверхности. При концентрации соединения А-2 100 мкг/мл у синегнойной палочки наблюдалось нарушение пигментации.

Модификация соединения А-2 ряда енаминов полимером ПААГ-М приводила к повышению биологической активности данного соединения. Полученные структуры «ядро–оболочка» характеризовались бактерицидным действием в отношении всех исследованных микроорганизмов. Наблюдалось уменьшение значений МПК инновационного препарата по сравнению с исходным гетероциклическим соединением для *S. aureus* 209 P, *S. aureus* № 6 и № 23 в 62 раза, *S. aureus* № 2, № 21 и № 92 – в 32 раза, *B. cereus* 8035 и *S. aureus* № 430 – в 16 раз, *E. coli* 113-13 – в 2 раза.

МПК модифицированного соединения А-2 для *P. aeruginosa* ATCC 27853 составила 25 мкг/мл, хотя при использовании соединения А-2 в исследуемых концентрациях МПК для синегнойной палочки установить не удалось. Помимо этого, во всех случаях наблюдался 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: происходило увеличение антимикробной активности структуры «ядро–оболочка» по сравнению с ПААГ-М в 2,5 раза.

Установлено, что повышение биологической активности структуры «ядро–оболочка» соединения А-2 и ПААГ-М в большей степени выражено в отношении стандартных и клинических штаммов грамположительных бактерий. Более высокие значения МПК в отношении стандартных штаммов грамотрицательных бактерий, вероятно, связаны с особенностями строения их клеточной стенки и сложностью проникновения через пориновые каналы крупных химических соединений с высокой молекулярной массой.

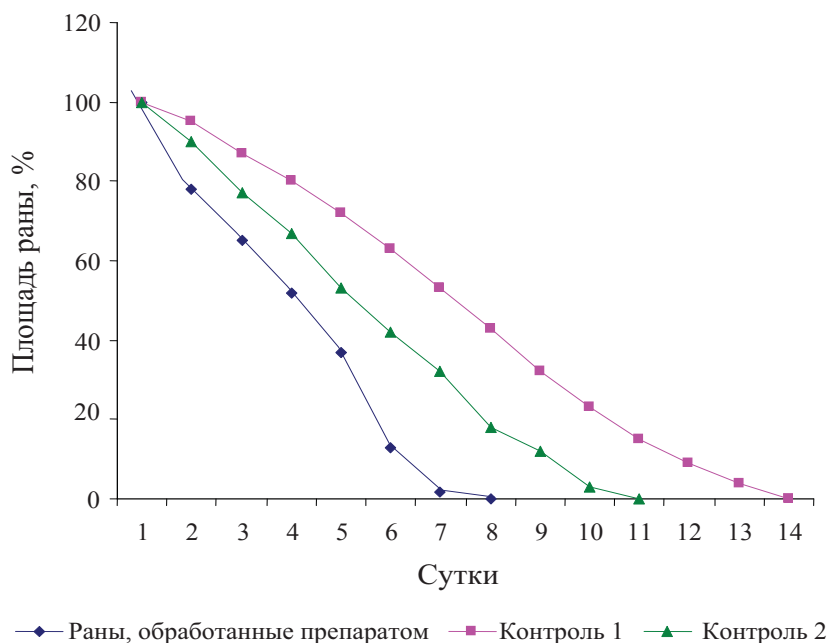
При создании инновационного ранозаживляющего препарата была проведена сравнительная оценка эффективности наноагрегатов флавоноидов, а также структуры «ядро–оболочка», в которых биофлавоноиды были стабилизированы ПААГ-М. Экспериментальные лабораторные мыши были разделены на 3 группы:

1 – опытная группа, раны которой обрабатывали инновационным препаратом;

2 – контрольная группа 1, раны которой обрабатывали;

3 – контрольная группа 2, раны которой обрабатывали суспензией нестабилизированных наноагрегатов флавоноидов.

Установлено, что в опытной группе животных наблюдалось статистически достоверное уменьшение площади раневой поверхности начиная со вторых суток эксперимента, а полное заживление ран происходило на 8-е сутки с полной эпителизацией и отсутствием гнойных осложнений (рисунок).



Динамика изменения площади экспериментальных ран у лабораторных мышей

Уменьшение площади раневого дефекта контрольных групп животных происходило медленнее. В первой контрольной группе животных полное заживление ран наступало на 14-е сутки от начала эксперимента, однако на 3-й день после проведения операции у мышей появлялись очаги нагноения подкожно-жировой клетчатки, а регенерация происходила с образованием рубца. Полное заживление ран второй контрольной группы мышей происходило на 11-е сутки, гнойные осложнения не возникали, однако длительно сохранялись гиперемия и отек близлежащих тканей, и регенерация раневого дефекта характеризовалась формированием нежного соединительнотканного рубца.

Установлено, что нанесение препаратов, содержащих как стабилизированные, так и нестабилизированные наноагрегаты флавоноидов, ускоряет заживление полнослойных ран кожи путем стимуляции репаративных процессов и усиливает барьерно-защитную функцию кожи.

Полученные результаты позволяют предположить, что большая эффективность структуры «ядро–оболочка» по сравнению с нестабилизированными агрегатами биофлавоноидов связана с синергидным эффектом и большей биодоступностью созданных инновационных препаратов. Помимо этого, наличие в составе структур «ядро–оболочка» полимера, обладающего антимикробной активностью, снижает риск развития воспаления и контаминации раневой поверхности различными микроорганизмами.

Таким образом, созданные препараты, содержащие структуры «ядро–оболочка» на основе биосовместимого полимера ПААГ-М и биологически активных носителей, являются более эффективными по сравнению с исходными и могут быть рекомендованы к использованию в медико-биологической и ветеринарной практике в качестве инновационных антимикробных и ранозаживляющих средств.

#### Список литературы

1. *Perr D., Karp J. M., Hong S.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy // *Nature Nanotechnology*. 2007. Vol. 2, № 12. P. 751–760.
2. *Orru F.* Design of functional colloidal magnetic nanoparticles for biomedical applications: PhD Thesis. Cagliari: University of Cagliari, 2012. 152 p.
3. *Nishio K., Ikeda M., Gokon N.* Preparation of size-controlled (30–100 nm) magnetite nanoparticles for biomedical applications // *J. of Magnetism and Magnetic Materials*. 2007. Vol. 310. P. 2408–2410.
4. *Szekeres M., Tóth I. Y., Illés E.* Chemical and colloidal stability of carboxylated core-shell magnetite nanoparticles designed for biomedical applications // *Intern. J. Molecular Sciences*. 2013. № 14. P. 14550–14574.
5. *Sen T., ShePard S. J., Mercer T.* Simple one-pot fabrication of ultra-stable core-shell superparamagnetic nanoparticles for potential application in drug delivery // *RSC Advances*. 2012. Vol. 2. P. 5221–5228.
6. *Козлов П. С.* Клиническое значение резистентности грамположительных бактерий // *Инфекции в хирургии*. 2009. Т. 7, № 1. С. 3–10.



7. *Deshpande L. M., Jones R. N.* Bactericidal activity and synergy studies of BAL9141, a novel pyrrolidinone-3-ylidene cephem, tested against streptococci, enterococci and methicillin-resistant staphylococci // *Clin. Infect. Dis.* 2003. Vol. 9. P. 1120–1124.
8. *Graffunder E. M., Venezia A. R.* Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials // *J. Antimicrob. Chemother.* 2002. Vol. 49, № 6. P. 999–1005.
9. *Нечаева О. В., Шуришалова Н. Ф., Заярский Д. А., Тихомирова Е. И., Сорокин В. В., Вакараева М. М., Веденева Н. В.* Биологическая активность соединений ряда енаминов и их модифицированных аналогов в отношении референс-штаммов и клинических изолятов бактерий // *Фундаментальные исследования.* 2013. № 12-1. С. 127–130.
10. *Нечаева О. В., Тихомирова Е. И., Шуришалова Н. Ф., Плотников О. П.* Перспективы использования гетероциклических соединений в медико-биологической практике // *Международ. журн. эксперимент. образования.* 2014. № 3–2. С. 186–187.
11. *Нечаева О. В., Заярский Д. А., Вакараева М. М., Веденева Н. В., Тихомирова Е. И.* Изучение биологической активности полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами галогенов, и его модификаций в отношении микроорганизмов // *Вестн. развития науки и образования.* 2014. № 1. С. 32–36.
12. *Нечаева О. В., Ульянов В. Ю., Заярский Д. А., Тихомирова Е. И., Вакараева М. М.* Влияние биосовместимого полимерного соединения на выживаемость возбудителей инвазивных микозов // *Проблемы мед. микологии.* 2014. Т. 6, № 2. С. 106.
13. Пат. 2492773 РФ. Способ хранения продуктов / *Заярский Д. А., Камалян А. Б., Нечаева О. В.*
14. Пат. 2446852 РФ. Способ получения экстрактов растительного сырья и продуктов пчеловодства / *Заярский Д. А., Портнов С. А., Матросов Н. А.*
15. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам // МУК 4.2.1890-04. М. : Изд. отдел Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава РФ, 2004. 91 с.
16. *Кузин М. И., Костюченко Б. М.* Раны и раневая инфекция : руководство для врачей. М. : Медицина, 1990. 592 с.
17. *Gul N. Y., Topal A., Cangul T.* The effects of topical tripeptide copper complex and helium-neon laser on wound healing in rabbits // *Veterinary Dermatology.* 2008. Vol. 19, № 1. P. 7–14.
18. *Ашмарин И. П.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л. : Изд-во мед. лит., 1986. 184 с.

УДК 579.26

## АССОЦИАТИВНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ПОБЕГОВ ЯБЛОНЬ (*MALUS P. MILL, 1754*) В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

**Х. Мохамед, А. М. Петерсон, А. В. Козлова**

Саратовский государственный университет  
E-mail: alexandra.peterson@yandex.ru

Изучены видовой состав, количественные показатели и встречаемость бактерий и грибов, ассоциированных с побегами яблонь в Саратовской области. С поверхности побегов выделено 12 видов бактерий и 4 вида грибов, из внутренней среды – 14 видов бактерий и 3 вида грибов. Наиболее распространёнными ассоциантами поверхности побегов яблонь оказались бактерии *Bacillus subtilis*, *Pantoea agglomerans*, грибы *Alternaria sp.* и *Fusarium tricinctum*, внутренней среды побегов – *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Penicillium sp.* Выявлена незначительная сорто-специфичность микробных ассоциаций побегов яблонь.

**Ключевые слова:** побеги яблонь, бактерии, грибы.

### Associative Microorganisms Shoots Apple Tree (*Malus P. Mill, 1754*) in Saratov Region

**H. Mohamed, A. M. Peterson, A. V. Kozlova**

Species composition, quantitative indicators and the occurrence of bacteria and fungi associated with apple shoots in the Saratov region were studied. On the surface shoots isolated 12 species of bacteria, and 4 species of fungi, of the internal environment – 14 species of bacteria

and 3 species of fungi. The most common surface associates apple shoots appeared bacterium *Bacillus subtilis*, *Pantoea agglomerans*, fungus *Alternaria sp.* and *Fusarium tricinctum*, internal environment shoots – *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Penicillium sp.* Few sorts specificity of microbial associations shoots of apple was found.

**Key words:** apple shoots, bacteria, fungi.

DOI: 10.18500/1816-9775-2015-15-3-80-84

### Введение

Любой растительный организм является средой обитания для огромного количества микроорганизмов, выполняющих множество значимых для хозяина функций. Поддерживая на поверхности своих органов, в тканях и клетках микробный консорциум, отдавая ему часть своих ресурсов, растения получают взамен улучшение минерального питания, защиту от фитопатогенов, фитофагов, абиотических стрессов и т.д. [1–6]. Исследования

