

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Специальность: 06.04.01 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТЕАЗЫ PARC  
ДЛЯ ЭРАДИКАЦИИ ДВУВИДОВЫХ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК**

Работа завершена:

«13» 06 2023 г.



(А.Б. Рыскулова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

д.б.н., доцент

«13» 06 2023 г.



(А.Р. Каюмов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., доцент

«13» 06 2023 г.



(А.Р. Каюмов)

Казань – 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>                                                                        | <b>4</b>  |
| <b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>                                                                                  | <b>5</b>  |
| <b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>                                                                        | <b>7</b>  |
| 1.1 Формирование биопленки .....                                                                      | 7         |
| 1.2 Устойчивость биопленок.....                                                                       | 9         |
| 1.3 Взаимодействие <i>S. aureus</i> и <i>P. aeruginosa</i> в смешанных биопленках ...                 | 11        |
| 1.4 Инфекции, вызванные бактериальными биопленками .....                                              | 14        |
| 1.5 Исследование новых стратегий лечения инфекций, вызванных бактериальными биопленками.....          | 16        |
| 1.6 Ферментативный гидролиз биопленок .....                                                           | 18        |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>                                                                               | <b>22</b> |
| <b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....</b>                                                                  | <b>24</b> |
| <b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>                                                                     | <b>24</b> |
| 2.1 Исследуемые соединения.....                                                                       | 24        |
| 2.2 Штаммы.....                                                                                       | 24        |
| 2.3 Питательные среды .....                                                                           | 24        |
| 2.4. Условия культивирования бактерий .....                                                           | 25        |
| 2.5 Определение способности бактерий образовывать биопленки [Woodward <i>et al.</i> , 2000] .....     | 25        |
| 2.6 Определение повышения эффективности антибиотиков против бактерий в присутствии протеазы РАРС..... | 26        |
| 2.7 Резазуриновый тест.....                                                                           | 26        |
| 2.8 Оценка жизнеспособности клеток [Herigstad <i>et al.</i> , 2001] .....                             | 27        |
| 2.9 Флуоресцентная микроскопия.....                                                                   | 27        |
| 2.10 Статистическая обработка результатов .....                                                       | 28        |
| <b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЯ .....</b>                                                   | <b>29</b> |

|                                                                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1 Оценка эффективности разрушения биопленок, образованных <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> и <i>S. aureus</i> + <i>P. aeruginosa</i> протеазой РАРС.....                | 29        |
| 3.2 Исследовать возможность применения протеазы РАРС в комбинации с антибиотиками для повышения их эффективности в отношении клеток в составе моно- и двувидовых биопленок ..... | 34        |
| <b>ВЫВОДЫ.....</b>                                                                                                                                                               | <b>40</b> |
| <b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>                                                                                                                                    | <b>41</b> |

|      |                                          |
|------|------------------------------------------|
| Кол  | Коллаген                                 |
| РАРС | Рибонуклеотидная протеаза 1, цитин триаз |
| НА   | Нитрогенная аминокислота                 |
| АТФ  | Аденозин трифосфат                       |
| СР   | Супероксиддисмутаза                      |
| МР   | Матрикс                                  |
| ДНК  | Дезоксирибонуклеиновая кислота           |
| СВ   | Супероксиддисмутаза                      |
| НОНО | Нитрогенная аминокислота                 |
| РНС  | Рибонуклеотидная протеаза                |
| НАДФ | Никотинаминадениндинуклеотид             |
| ФАДН | Флавинадениндинуклеотид                  |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

|      |                                            |
|------|--------------------------------------------|
| EPS  | Внеклеточное полимерное вещество           |
| ECM  | Внеклеточный матрикс                       |
| BM   | Основная среда                             |
| LB   | Питательная среда Лурия-Бертани            |
| ОП   | Оптическая плотность                       |
| KOE  | Колонии образующая единица                 |
| PAPC | Протеаза-активатор протеина С плазмы крови |
| PIA  | Polysaccharide intercellular adhesin       |
| PNAG | poly-N-acetyl- $\beta$ -(1-6)-glucosamine  |
| QS   | Чувство кворума (quorum sensing)           |
| AIPs | Аутоиндуцирующие пептиды                   |
| eDNA | Внеклеточная ДНК                           |
| SCV  | Небольшой колониальный вариант             |
| HQNO | гидроксихинолин-N-оксид                    |
| PBS  | Phosphate-buffered saline                  |
| NADH | 1,4-Никотинамидадениндинуклеотид           |
| FADH | Дигидрофлавинадениндинуклеотид             |

## ВВЕДЕНИЕ

В естественных условиях биопленки являются преобладающим способом роста микроорганизмов и часто ассоциируются с постоянными клиническими инфекциями. Биопленка определяется как совокупность микроорганизмов, организованных в один или несколько слоев, которые могут прикрепляться к различным типам поверхностей, таким как оборудование для производства продуктов питания, системы кондиционирования воздуха, протезы, мочевые и сосудистые катетеры, сердечные устройства, медицинское оборудование и поверхности ран [Pozo, 2018].

В области медицины биопленки играют важную роль и образуются, примерно, в 80% инфекций (бактериальный вагиноз, фиброзная пневмония, инфекции дыхательных путей, инфекции барабанной полости, хронические раны, образование зубного налета, воспаление зубов, эндокардит и глазные инфекции).

По мере развития биопленки, эта микробная масса все больше приобретает устойчивость к внешним стрессам, таким как обезвоживание, радиация и антимикробные соединения, по сравнению с планктонными клетками. Более того, многовидовые биопленки, образованные бактериями/бактериями или грибами/бактериями, широко распространены в клинической практике и обеспечивают комменсальным микроорганизмам защиту от антимикробной терапии.

*Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, два основных нозокомиальных патогена, которые являются одними из наиболее распространенных штаммов способных демонстрировать как ряд совместных, так и конкурентных взаимодействий, встречающихся при заболевании дыхательных путей, что приводит к более тяжелым исходам по сравнению с инфекциями, вызванными одним видом [Gomes-Fernandes *et al.*, 2022]. Совместное инфицирование этими двумя бактериями ассоциируется с

более высокой воспалительной реакцией, увеличением хронического течения инфекций и повышенной толерантностью к антимикробным препаратам.

Несмотря на большое количество существующих антибактериальных препаратов, из-за их побочных токсических эффектов и проблем, связанных с биодegradацией, в настоящее время исследования, направленные на поиск эффективных альтернативных вариантов, остаются актуальными.

Помимо антибиотиков, для борьбы с двувидовыми биопленками были описаны различные ферменты, которые способны разрушать белки и полисахариды, участвующие в процессах образования биопленок [Suresh *et al.*, 2019; Baker *et al.*, 2016].

Ранее в нашей лаборатории было показано, что протеаза РАРС из *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D гидролизует матрикс моновидовых биопленок *S. aureus* и *P. aeruginosa* и способствует повышению эффективности антибиотиков в отношении клеток этих бактерий в составе биопленки.

**Целью** работы является оценка возможности использования протеазы РАРС из *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D для эрадикации двувидовых микробных биопленок *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

В работе решались следующие **задачи**:

- 1) Оценить эффективность разрушения биопленок, образованных *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* + *P. aeruginosa* протеазой РАРС.
- 2) Исследовать возможность применения протеазы РАРС в комбинации с антибиотиками для повышения их эффективности в отношении клеток в составе моно- и двувидовых биопленок.

## СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

### ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Рыскулова Аян Баратовна  
Самоцитирование рассчитано для: Рыскулова Аян Баратовна  
Название работы: Оценка возможности использования протеазы PARS для эрадикации двувидовых микробных биопленок  
Тип работы: Магистерская диссертация  
Подразделение:

### РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

|                 |        |                 |        |
|-----------------|--------|-----------------|--------|
| СОВПАДЕНИЯ      | 20.29% | СОВПАДЕНИЯ      | 20.29% |
| ОРИГИНАЛЬНОСТЬ  | 79.71% | ОРИГИНАЛЬНОСТЬ  | 79.71% |
| ЦИТИРОВАНИЯ     | 0%     | ЦИТИРОВАНИЯ     | 0%     |
| САМОЦИТИРОВАНИЯ | 0%     | САМОЦИТИРОВАНИЯ | 0%     |

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 04.06.2023

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 04.06.2023 15:16

Структура документа: Проверенные разделы: основная часть с.1-23  
Модули поиска: ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс\*; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley ; eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ: аналитика; СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Коллекция НБУ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика; Перефразирования по Интернету; Перефразирования по Интернету (EN); Перефразирования по коллекции издательства Wiley ; Патенты СССР, РФ, СНГ; СМИ России и СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Каюмов Айрат Рашитович

ФИО проверяющего

Дата подписи:



Подпись проверяющего



Чтобы убедиться в подлинности справки, используйте QR-код, который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.