

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

**НОВАЯ СЕРИНОВАЯ ПРОТЕИНАЗА ИЗ *ASPERGILLUS OCHRACEUS*
ДЛЯ ПОТЕНЦИРОВАНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ И
УСКОРЕНИЯ РАНОЗАЖИВЛЕНИЯ**

Работа завершена:

«7» 05 2021 г.

(Рафии Наср Аяя)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., доцент кафедры генетики

«7» 05 2021 г.

(Каюмов А.Р.)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«7» 05 2021 г.

(В.М. Чернов)

Казань – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Бактериальные биопленки и проблемы, связанные с ними.....	7
1.2 Состав микробной биопленки.....	8
1.3 Этапы образование биопленки	9
1.4 Инфекции, вызванные бактериальными биопленками	12
1.5 Способы борьбы с биопленками	13
1.6 Альтернативные методы борьбы с биопленками	15
1.7 Характеристика ферментов, перспективных для разрушения матрикса биопленок.....	19
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	23
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1 Штаммы.....	24
2.2 Исследуемые соединения	24
2.3 Питательные среды	24
2.4 Условия культивирования бактерий	24
2.5 Определение способности бактерий образовывать биопленки	25
2.6 Количественное определение связанного конго красного в жидкости.	26
2.7 Оценка содержания клеточных и внеклеточных компонентов биопленки	26
2.8 Сканирующая электронная микроскопия.....	27
2.9 Определение минимальной подавляющей и бактерицидной концентраций антимикробных препаратов	27
2.10 Определение повышения эффективности антибиотиков против бактерий в присутствии протеазы РАРС	28

2.11 МТТ анализ	28
2.12 Резазуриновый тест	29
2.13 Подсчет КОЕ с помощью Drop Plate анализа [Herigstad <i>et al.</i> , 2001] ..	30
2.14 Флуоресцентная микроскопия	30
2.15 Выделение РНК из культур клеток <i>S. aureus</i>	31
2.16 Количественная ОТ-ПЦР в реальном времени	32
2.17 Статистическая обработка результатов	33
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	34
3.1 Оценка эффективности протеазы PAPC для разрушения бактериальных биопленок	34
3.2 Исследование возможности повышения эффективности антибиотиков в отношении <i>S. aureus</i> протеазой PAPC	39
3.3 Оценка влияния протеазы PAPC на экспрессии экспрессию <i>ica</i> генов в клетках <i>S. aureus</i>	49
ВЫВОДЫ.....	51
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	52

ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее убедительных гипотез, объясняющих трудности лечения рецидивирующих инфекций, является способность бактерий образовывать в инфицированных тканях биопленки – связанные с поверхностью многоклеточные сообщества [Khoramian *et al.*, 2016]. Точная структура, химический состав и физиология биопленки зависят от природы обитающих в ней бактерий и окружающей среды. Однако важной общностью биопленок является то, что их структурная целостность критически зависит от внеклеточного матрикса, продуцируемого составляющими их клетками. Внеклеточный матрикс может иметь различный состав, и вносит значительный вклад в организацию сообщества [Lahiri *et al.*, 2021].

Формирование биопленок является важным элементом, определяющим патогенность и устойчивость бактерий к противомикробным препаратам [Usmani *et al.*, 2021]. Биопленки являются основной причиной различных инфекций, которые принято называть ассоциированными с образованием биопленок (*biofilm-associated infections*), среди которых зубной кариес, периодонтит, средний отит, муковисцидоз, хронический синусит, хронические раневые инфекции, костно-мышечные инфекции, некротический фасциит, инфекцию желчных путей, остеомиелит, бактериальный простатит, эндокардит, инфекции мочевыводящих путей. Биопленки способны значительно снижать или полностью блокировать проникновение антибиотиков за счет диффузного барьера или могут связывать антибиотики отрицательно заряженными экзополисахаридами. Более того, измененная физиология бактериальных клеток в биопленках и неправильная реакция иммунной системы могут привести к трудностям в уничтожении биопленок [Melchior 2006]. Бактерии в биопленках, возможно, в 10–1000 раз более устойчивы к противомикробным агентам по сравнению с планктонными формами [Melchior 2006].

Матрикс биопленки представляет собой набор полисахаридов, белков, нуклеиновых кислот, гликопротеинов и фосфолипидов [Greer *et al.*, 2021]. Имея это в виду, очевидно, что ферменты могут использоваться для разрушения биопленки [Khan *et al.*, 2021]. Ферментативная активность может быть направлена на матрикс биопленки, обеспечивая лучшее проникновение последующих используемых противомикробных агентов, или может быть нацелена на компоненты клеточной стенки патогена, чтобы вызвать их лизис [Kaplan *et al.*, 2018; Vuotto *et al.*, 2019]. Многочисленные ферменты, такие как гликозидгидролазы, протеазы и ДНКазы, разрушают различные компоненты биопленок, приводя к откреплению клеток и повышая клеточную восприимчивость к противомикробным препаратам [Kaplan, 2010]. Применение этих ферментов в комплексе с системными антибиотиками привело к значительным успехам в уничтожении бактериальных биопленок [Algburi *et al.*, 2017].

Целью работы является оценка потенциала новой Субтилизин-подобной протеиназы PAPC из *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D для деструкции микробных биопленок и повышения эффективности антимикробных препаратов в отношении бактерий в составе биопленок.

В работе решались следующие задачи:

- 1) Установить возможность деструкции биопленок грамположительных и грамотрицательных бактерий новой сериновой протеазой PAPC из *Aspergillus ochraceous*.
- 2) Охарактеризовать степень повышения эффективности антибиотиков в отношении бактерий *S. aureus* в составе биопленки в присутствии протеиназы PAPC.
- 3) Оценить влияние протеазы PAPC на экспрессию экспрессию *ica* генов в клетках *S. aureus*.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Казанский (Приволжский) федеральный
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Рафия Наср Аия -

Самоцитирование

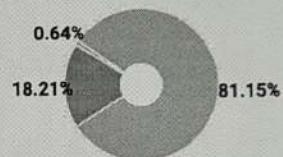
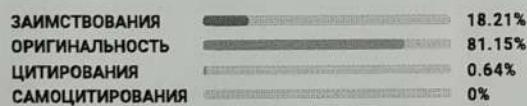
рассчитано для: Рафия Наср Аия -

Название работы: НОВАЯ СЕРИНОВАЯ ПРОТЕИНАЗА ИЗ ASPERGILLUS OCHraceus ДЛЯ ПОТЕНЦИРОВАНИЯ
АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ И УСКОРЕНИЯ РАНОЗАЖИВЛЕНИЯ

Тип работы: Магистерская диссертация

Подразделение: КФУ, ИФМИБ

РЕЗУЛЬТАТЫ



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 20.05.2021

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); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Модуль
поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU;
Перефразирования по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов;
Переводные заимствования

Работу проверил: Бабынин Эдуард Викторович

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.