

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: 06.03.01 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
Бакалаврская работа

**ПОТЕНЦИРОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ
БАКТЕРИЙ В СМЕШАННЫХ СООБЩЕСТВАХ С ПОМОЩЬЮ
ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ**


Работа завершена:

«7» 06 2023 г.  (Муталлапова Г.И.)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

«8» 06 2023 г.  (Тризна Е.Ю.)

Заведующий кафедрой

д.б.н., доцент

«9» 06 2023 г.  (Каюмов А.Р.)

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Особенности полимикробных взаимодействий в биопленке <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.2 Устойчивость к антибиотикам	10
1.3 Инфекционные заболевания, вызываемые <i>S. aureus</i> и <i>P. aeruginosa</i>	14
1.4 Методы борьбы с биопленками	16
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	24
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	25
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	25
2.1 Антибактериальные соединения, использованные в работе	25
2.2 Штаммы и плазмиды.....	25
2.3 Питательные среды и условия культивирования.....	25
2.4 Определение минимальной подавляющей концентрации	26
2.5 Выделение плазмидной ДНК	26
2.6 Электрофорез ДНК.....	27
2.7 Трансформация клеток <i>Escherichia coli</i> методом теплового шока	27
2.8 Скрининг трансформантов на гиперпродукцию белка	28
2.9 Гиперпродукция белка в клетках <i>Escherichia coli</i> и получение клеточных экстрактов	28
2.10 Очистка белков методом аффинной хроматографии на Strep-tactin сефарозе.....	29
2.11 Определение концентрации белка по методу Мэрион Брэдфорд.....	29
2.12 Электрофорез белков в денатурирующих условиях.....	30
2.13 Окрашивание белковых гелей Coomassie brilliant blue R250.....	30

2.14	Определение количества жизнеспособных клеток в составе биопленки	30
2.15	Окрашивание биопленок кристаллическим фиолетовым	31
2.16	Оценка жизнеспособности бактерий с помощью МТТ-теста.....	31
2.17	Статистическая обработка результатов	32
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1	Экспрессия леваназы SacC в клетках <i>Escherichia coli</i>	33
3.2	Очистка белка методом аффинной хроматографии на Strep-tactin сефарозе	35
3.3	Оценка сочетанного действия противомикробных препаратов и леваназы SacC в отношении моно- и двувидовых биопленок.....	36
	ВЫВОДЫ	41
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	42

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BCA	Бычий сывороточный альбумин
KOE	Колонии образующая единица
MПК	Минимальная подавляющая концентрация
ОП	Оптическая плотность
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
BM	Основная среда
LB	Питательная среда Лурия-Бертани
AA	Акриламид
BIS-AA	Бис-акриламид
DTT	Дитиотреитол
PBS	Фосфатный буфер
SB	Буфер для внесения
SDS	Додецилсульфат натрия
TBE	Трис-боратный электродный буфер
TEMED	Тетраметилетилендиамин
Tris	2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные биопленки представляют собой сложные сообщества бактерий, которые удерживаются вместе благодаря внеклеточному полимерному матриксу [Xu *et al.*, 2020]. Основная функция биопленки заключается в защите микроорганизма от неблагоприятных физических, химических и биологических факторов окружающей среды, таких как обезвоживание, ультрафиолетовое излучение, воздействие биоцидов, гуморальные и клеточные факторы иммунитета [Vestby *et al.*, 2020]. Бактериальные биопленки вызывают множество проблем в различных областях: очистка воды (биопленка может нарушить микробное сообщество активного ила); производство продуктов питания (образование биопленки патогенными микроорганизмами приводит к порче продуктов); имплантология (биопленки образуются на медицинском оборудовании: внутривенные катетеры, мочевые катетеры, кардиостимуляторы и контактные линзы); лечение хронических заболеваний [Harrell *et al.*, 2021; Fagerlund *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2020; Cangui-Panchi *et al.*, 2022; Eguia *et al.*, 2020; Neboyan *et al.*, 2022]. Терапия инфекций, связанных со смешанными биопленками, создает дополнительные проблемы, так как действие антибактериальных агентов, чаще всего, направлено на отдельные виды микроорганизмов, и они менее эффективны в отношении сообществ, состоящих из различных комбинаций микроорганизмов. Следовательно, существует необходимость в поиске альтернативных стратегий борьбы со смешанными биопленками, помимо терапии антибиотиками.

Внеклеточный матрикс представляет собой сложную смесь органических молекул, включающей в себя полисахариды, белки, внеклеточную ДНК и фосфолипиды [Nazir *et al.*, 2019]. Состав матрикса изменяется в зависимости от типа патогена, возраста биопленки и условий окружающей среды (рН, кислород, азот, температура, доступность питательных веществ) [Srinivasan *et al.*, 2021]. Внеклеточный матрикс в

бактериальных биопленках действует как барьер для защиты бактерий от антимикробных агентов. Помимо этого, он отвечает за удержание сообщества клеток биопленки в непосредственной близости, тем самым обеспечивая межклеточную связь и облегчая горизонтальный перенос генов [Vestby *et al.*, 2020]. Исходя из этого, использование ферментов для разрушения компонентов матрикса является перспективным подходом для уничтожения биопленок. Так, уже доказана эффективность таких ферментов, как дезоксирибонуклеаза I (ДНКаза I), дисперсин В, альгинат лиаза, протеаза, целлюлаза, альфа-амилаза, альфа-маннозидаза, лизостафин [Ceotto-Vigoder *et al.*, 2016; Bronnec *et al.*, 2022; Karygianni *et al.*, 2020; Pakkulnan *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022; Ghoreishi *et al.*, 2022].

Основную долю матрикса, как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий составляют полисахариды [Balducci *et al.*, 2023; Ellis *et al.*, 2023]. Полисахариды в матриксе активно участвуют в образовании и поддержании целостности биопленки. В связи с этим, представляет интерес поиск ферментов, способных гидролизовать полисахаридные компоненты матрикса, тем самым способствуя деградации биопленки.

Целью работы являлось установить возможность применения леваназы SacC для профилактики и лечения заболеваний, ассоциированных с образованием двувидовых биопленок *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Экспрессировать леваназу SacC из *Bacillus subtilis* в клетках *Escherichia coli*;
- 2) Провести очистку белка методом аффинной хроматографии на Streptactin сефарозе;
- 3) Провести оценку сочетанного действия противомикробных препаратов и леваназы SacC в отношении моно- и двувидовых биопленок *P. aeruginosa* и *S. aureus*.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Казанский (Приволжский) федеральный
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ ANTIPLAGIAT.СТРУКТУРА

Автор работы: Муталлапова Гузель Ильнуровна
Самоцитирование
рассчитано для: Муталлапова Гузель Ильнуровна
Название работы: ПОТЕНЦИРОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ БАКТЕРИЙ В СМЕШАННЫХ
СООБЩЕСТВАХ С ПОМОЩЬЮ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

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

СОВПАДЕНИЯ	3.05%	СОВПАДЕНИЯ	3.05%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	96.95%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	96.95%
ЦИТИРОВАНИЯ	0%	ЦИТИРОВАНИЯ	0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 25.05.2023

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 25.05.2023 12:59

Структура документа: Проверенные разделы: основная часть с.1-25
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.