

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.03.01- биология


ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Бакалаврская работа

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ
МЕТАБОЛИТОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Работа завершена:


"06" 05 2020 г.

 (Миронова А.В.)

Научный руководитель

к.б.н., ассистент

"06" 05 2020 г.

 (Тризна Е.Ю.)

д.б.н., доцент

"06" 05 2020 г.

 (Каюмов А.Р.)

Казань-2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Образование биопленки <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
1.2 Взаимодействие <i>P. aeruginosa</i> и <i>S. aureus</i> в полимикробной биопленке	11
1.3 Факторы антагонизма <i>S. aureus</i>	15
1.4 Способы борьбы с полимикробными биопленками	17
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	22
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	22
2.1 Антибактериальные вещества, использованные в работе	22
2.2 Бактериальные штаммы.....	22
2.3 Питательные среды	22
2.4 Условия культивирования бактерий	23
2.5 Определение минимальной подавляющей концентрации и минимальной бактерицидной концентрации	23
2.6. Получение бесклеточной культуральной жидкости.....	24
2.7 Подсчет КОЕ [Herigstad et al., 2000].....	24
2.8 Выделение геномной ДНК методом фенол-хлороформной экстракции	25
2.9 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	25
2.10 Очистка амплифицированных фрагментов ДНК после ПЦР	26
2.11 Резазуриновый тест	26
2.12 Статистическая обработка результатов	27
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЯ	28

3.1 Оценка влияния метаболитов <i>S. aureus</i> на жизнеспособность клеток <i>P. aeruginosa</i> и <i>K. pneumoniae</i> в составе биопленок в присутствии антибиотиков.....	28
3.2 Оценка плотности бактериальных клеток <i>S. aureus</i> при различных условиях культивирования и влияние внеклеточных метаболитов полученных при этих условиях на <i>P. aeruginosa</i> в составе биопленки и открепившемся состоянии.....	32
3.3 Оценка эффективности метаболитов <i>S. aureus</i> в отношении различных клинических штаммов <i>P. aeruginosa</i>	35
3.4 Оценка эффективности метаболитов различных штаммов <i>S. aureus</i> в отношении клеток <i>P. aeruginosa</i>	38
ВЫВОДЫ	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	42

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы отмечено, что развитие хронических инфекций зачастую ассоциировано со способностью большинства клинически-значимых патогенных микроорганизмов образовывать биопленки [Vjarnsholt, 2013]. Бактерии в составе биопленок обладают различной экспрессией генов, скоростью роста, поведением и внешним видом по сравнению со свободноживущими клетками. Кроме того, находясь в биопленке, бактерии становятся чрезвычайно устойчивы к действию антибиотиков, биоцидов и иммунной системе организма хозяина [Steinberg *et al.*, 2015]. Значительное снижение чувствительности бактерий в составе биопленок обусловлено множеством факторов, таких как низкая проницаемость внеклеточного матрикса, адаптация клеток к стрессу и переход в покоящееся состояние, в связи с ограниченным количеством питательных веществ внутри биопленки [Buch *et. al.*, 2019].

Хотя большинство исследований бактериальных биопленок посвящены моновидовым сообществам, в литературе все чаще сообщается что биопленки являются многовидовыми и могут включать несколько видов бактерий, грибов и вирусов [Pastar *et al.*, 2013; Blanchette *et al.*, 2018]. Устойчивость бактерий к противомикробным препаратам в полимикробных сообществах может быть в разы выше по сравнению с мономикробными биопленками бактерий того же вида [Cendra *et. al.*, 2019]. Однако, чувствительность бактерий в полимикробных биопленках к неблагоприятным условиям окружающей среды, в том числе воздействию антибиотиков и биоцидов напрямую зависит от характера взаимодействия членов сообщества [Parijs *et. al.*, 2018, Hotterbeekx *et al.*, 2016]. В случае синергизма в полимикробном сообществе наблюдается ряд преимуществ, по сравнению с мономикробными биопленками, таких как повышенный обмен генетической информацией и как следствие быстрое распространение генов устойчивости к

антибиотикам, метаболическое сотрудничество, которое предполагает использование метаболитов одного микроорганизма другим в качестве питательных веществ [Molin *et al.*, 2003, Wuertz *et al.*, 2004, Wolcott *et al.*, 2013]. Возникновение инфекций, связанных с образованием полимикробных биопленок в которых наблюдаются синергетические взаимодействия между членами сообщества, приводит к ухудшению общего состояния пациентов и серьезным проблемам при их лечении [Nguyen *et al.*, 2016, Limoli *et al.*, 2016].

Среди наиболее распространенных внутрибольничных патогенов выделяют грамположительные кокки: *S. aureus*, *S. epidermidis*, энтерококки, а также грамотрицательные *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *E. coli* [Jamal *et al.*, 2018]. Все эти бактерии способны формировать как моно- так и полимикробные биопленки, включающие как патогенную, так и резидентную микрофлору организма хозяина. Так, показано, что хронические язвы, а также пневмония на фоне муковисцидоза являются следствием бактериальных инфекций смешанного рода, где доминирующими микроорганизмами являются *S. aureus* и *P. aeruginosa* [Tipton *et al.*, 2017]. При исследовании пациентов с катетер-ассоциированными инфекциями мочевыводящих путей наиболее часто идентифицируются смешанные сообщества, включающие бактерии *S. aureus*, *K. pneumonia* и *E. coli*. Установлено, что все эти бактерии способны образовывать плотные биопленки. Более того, взаимодействие *S. aureus* с *P. aeruginosa* в биопленке может изменять восприимчивость бактерий к различным антибиотикам [Beaudoin *et al.*, 2017]. По данным литературы, взаимодействия *S. aureus* и *P. aeruginosa* в зависимости от условий окружающей среды могут носить различный характер, как синергизм, так и антагонизм [Radlinski *et al.*, 2019, Hoffman *et al.*, 2006, Dalton *et al.*, 2011, Orazi *et al.*, 2020].

На сегодняшний день наблюдается высокая скорость развития резистентности у бактерий ко многим классам антибиотиков, что в разы снижает эффективность их использования, особенно по отношению к полимикробным бактериальным биопленкам. Повышенная скорость обмена

генами антибиотикорезистентности, недоступность бактерий для воздействия антимикробными препаратами, а также состояние персистенции затрудняют лечение заболеваний, ассоциированных с формированием смешанных биопленок. Устойчивость к антибиотикам и рецидив инфекций отражают неэффективность традиционно используемых антибиотиков при лечении стойких инфекций, связанных с биопленкой. Отсутствие эффективных методов лечения полимикробных инфекций вызывает необходимость разработки новых альтернативных методов профилактики и/или уничтожения бактериальных биопленок, а также их комплексное применение с классическим лечением антибиотиками [Tkhilaishvili *et. al.*, 2020]. Использование различных факторов антагонизма патогенных и резидентных бактерий может служить альтернативой современным подходам терапии бактериальных инфекций, связанных с формированием биопленок.

Целью работы было установить антимикробную активность внеклеточных метаболитов золотистого стафилококка против биопленок *P. aeruginosa* и *K. pneumonia*.

Для этого были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Оценить влияние внеклеточных метаболитов *S. aureus* ATCC на жизнеспособность клеток *P. aeruginosa* и *K. pneumonia* в составе биопленок в присутствии аминогликозидов и ципрофлоксацина;
- 2) Оценить плотность бактериальных клеток *S. aureus* при различных условиях культивирования и сопоставить влияние внеклеточных метаболитов полученных при этих условиях на *P. aeruginosa* в составе биопленки и открепившемся состоянии;
- 3) Оценить эффективность метаболитов *S. aureus* в отношении различных клинических штаммов *P. aeruginosa*;
- 4) Оценить эффективность метаболитов различных штаммов *S. aureus* в отношении клеток *P. aeruginosa*.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе Антиплагиат.Структура

Автор работы	Миронова Анна Владиславовна
Подразделение	Институт Фундаментальной Медицины и Биологии
Тип работы	Выпускная квалификационная работа
Название работы	АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS
Название файла	Миронова диплом (на проверку).docx
Процент заимствования	2.69 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	0.55 %
Процент оригинальности	96.76 %
Дата проверки	13:08:13 01 июня 2020г.
Модули поиска	Модуль поиска ИПС "Адилет"; Модуль выделения библиографических записей; Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Модуль поиска переводных заимствований по eLibrary (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по Wiley (RuEn); Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция Патенты; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов; Коллекция Wiley
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович ФИО проверяющего
Дата подписи	1 июня 2020



Подпись проверяющего

