

Министерство образования и науки РФ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

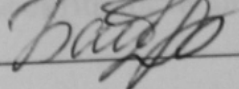
Направление: 06.04.01 - биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

РАЗРУШЕНИЕ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК С ПОМОЩЬЮ
ФИЦИНА ДЛЯ ТЕРАПИИ СТАФИЛОКОККОВЫХ
ИНФЕКЦИЙ

Работа завершена:

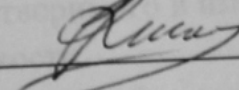
"__" ____ 20__ г.  (Байдамшина Д.Р.)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

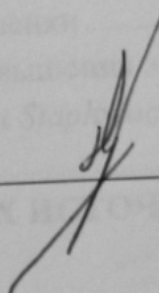
кандидат биологических наук,

доцент кафедры генетики

"__" ____ 20__ г.  (Каюмов А.Р.)

Заведующий кафедрой

доктор биологических наук

"__" ____ 20__ г.  (Чернов В.М.)

Казань-2017

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Образование биопленок у бактерий.....	7
1.2 Способы борьбы с биопленками.....	12
1.3 Характеристика ферментов, перспективных для разрушения матрикса биопленки.....	17
1.4 Иммобилизация ферментов на хитозане.....	18
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	22
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
2.1 Штаммы.....	23
2.2 Исследуемые соединения.....	23
2.3 Питательные среды.....	23
2.4 Условия культивирования бактерий.....	23
2.5 Определение способности бактерий образовывать биопленки.....	24
2.6 Определение стабильности ферментов.....	24
2.7 Определение минимальной подавляющей и бактерицидной концентраций.....	25
2.8 Определение повышения эффективности антибиотика против бактерий в присутствии фицина.....	26
2.9 Drop Plate анализ.....	26
2.10 Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.....	26
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЯ	28
3.1 Оценка эффективности разрушения биопленок стафилококка путем обработки фицином в растворимой и иммобилизованной на хитозане формах.....	28
3.2 Оценить стабильность растворимого и иммобилизованного на хитозане фицина в культуральной жидкости.....	33
3.3 Анализ структуры бактериальных биопленок после обработки фицином и оценка характера изменений биопленки.....	34
3.4 Исследование возможности повышения эффективности антибиотиков в отношении <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Staphylococcus epidermidis</i> фицина.....	37
ВЫВОДЫ	42
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	43

ВВЕДЕНИЕ

Биопленки – поверхностно ассоциированные сообщества микроорганизмов заключенных в полимерный матрикс, продуцируемый самими этими организмами. В прикрепленном состоянии бактерии приобретают множество преимуществ, которые помогают им оставаться в благоприятной экологической нише или в организме хозяина и выживать в неблагоприятных условиях. Адаптация к прикрепленному образу жизни приводит к изменению экспрессии поверхностных молекул, типа питания, появлению факторов вирулентности. Бактерии, живущие в составе биопленки до тысячи раз устойчивее к действию антибактериальных соединений, чем их планктонные формы [Petrova, Sauer, 2016].

К настоящему времени показано, что биопленки образуются на поверхности изделий медицинского назначения, таких как мочевые катетеры, эндотрахеальные трубки, ортопедические и грудные имплантаты, контактные линзы, внутриматочные приспособления и хирургические нити. Наиболее важной отличительной особенностью бактерий, находящихся в составе сообществ, является то, что бактерии внутри биопленки способны размножаться и вновь диссеминировать после завершения курса лечения, приводя к формированию хронических процессов и рецидивов заболевания. Так как бактерии в составе биопленки устойчивы к воздействию различных факторов, зачастую стерилизация медицинского оборудования не дает желаемого эффекта и происходит реинфицирование, сопровождаемое воспалением тканей и отторжением имплантатов. Биопленки также обнаруживают на поверхности ран, что способствует замедлению процесса их заживления и неэффективности антибактериальной терапии.

В течение долгого времени *Staphylococcus epidermidis* считался безвредным комменсалом кожи и слизистых оболочек организма человека. Тем не менее, в настоящее время известно, что вместе с *Staphylococcus aureus* он является одним из основных внутрибольничных патогенов, вызывающих инфекции на медицинских имплантатах, таких как центральные венозные

катетеры, мочевые катетеры, протезы клапанов сердца, ортопедические устройства и контактные линзы. *S. aureus* является возбудителем широкого спектра заболеваний, от кожных до смертельных системных нарушений. Многие из перечисленных заболеваний обусловлены образованием биопленок бактериями *S. aureus* и *S. epidermidis* [Vuong *et al.*, 2004, Saising *et al.*, 2012].

Предпочтительным способом лечения бактериальных инфекций является антибиотикотерапия. Использование антибиотиков направлено на предотвращение бактериального размножения (бактериостатическое действие), либо на их полное уничтожение (бактерицидное действие) [Dethlefsen, Relman, 2010]. Однако антибиотикотерапия оказывает негативное влияние на нормальную микрофлору организма хозяина, при этом является низкоэффективной в отношении патогенов, которые в ходе эволюции приобрели множественную устойчивость к антибиотикам.

Действие антибиотиков, используемых в настоящее время, обладает низкой эффективностью против биопленок [Vuong *et al.*, 2004]. Следовательно, одним из направлений в фармакологии является разработка препаратов, которые бы эффективно подавляли рост и образование ими биопленок. В настоящее время одним из подходов является покрытие поверхностей серебром или ферментами, которые разрушают матрикс биопленки.

Целью работы было установить возможность применения фицина для разрушения биопленок стафилококка и повышения эффективности антибиотиков в отношении этих бактерий.

В соответствии с поставленной целью в работе решались следующие **задачи**:

- 1) Исследовать эффективность разрушения биопленок стафилококка путем обработки фицином в растворимой и иммобилизованной на хитозане формах.

2) Оценить стабильность растворимого и иммобилизованного на хитозане фицина в культуральной жидкости.

3) Охарактеризовать структурные изменения биопленки после обработки раствором фицина.

4) Установить возможность повышения эффективности антибиотиков в отношении *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* в присутствии фицина.