

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ
ПОЛИАЗОЛИДИНАММОНИЯ С РАЗЛИЧНЫМИ ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

Направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Салихова Руслана Римовича

Научный руководитель

доцент кафедры микробиологии

и физиологии растений, к.б.н., доцент _____ Н. Ф. Шуршалова

Зав. кафедрой микробиологии

и физиологии растений, д.б.н., профессор _____ С. А. Степанов

Саратов 2017

Введение

Актуальность темы. Первый широко известный антибиотик (пенициллин) был открыт почти 90 лет назад. Трудно даже вообразить, сколько миллионов жизней было спасено благодаря этому открытию. Антибиотики стали одними из самых востребованных и широко распространенных фармацевтических препаратов. Казалось, найдено универсальное лекарство от большинства болезней. Так в 1969 г. в Конгрессе США, Вильям Стюарт (Surgeon General) заявил, что пришла пора «закрывать книгу инфекционных болезней» [1]. Но уже в скором времени стало ясно, что «книга не только не закрыта, но и даже до конца не прочитана». Из-за поразительной способности микроорганизмов адаптироваться к новым условиям, многие антибиотики перестали быть эффективными.

Особенно остро эта проблема встала в конце двадцатого столетия, когда эра антибиотиков начала подходить к концу, а новые способы сдерживания микроорганизмов были либо еще не найдены, либо недостаточно совершенны.

В 2001 году антибиотикорезистентность была названа глобальной угрозой человечеству [2]. На сегодняшний день существует большое количество научных учреждений, главная цель которых — изучение антибиотикорезистентности. Так в нашей стране находится Смоленский НИИ Антимикробной Химиотерапии, крупнейшие центры, в которых изучают устойчивость к антибиотикам, находятся в Европе и США.

Проблема антибиотикорезистентности выражена не только в медицине, во многих отраслях промышленности микроорганизмы наносят колоссальный ущерб экономике. Таким образом, поиск новых способов преодоления антибиотикорезистентности особенно актуален.

Введение в использование новых соединений, либо структурная и химическая модификация уже существующих антибиотиков является одним из перспективных методов преодоления устойчивости к антимикробным препаратам.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось изучение антимикробной активности нового полимерного соединения полиазолидинаммония и его модификаций в отношении стандартных тест-штаммов микроорганизмов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Определить антимикробные свойства исходных вариантов полимера на модели стандартных тест-штаммов бактерий.
2. Изучить антибактериальную активность ПААГ с различной молекулярной массой.
3. Определить антимикробное действие модификаций полимера, содержащих различные концентрации гидрат-ионов йода.
4. Провести сравнительную оценку антимикробного действия исследуемых вариантов полимера.

Материалы и методы. Работа выполнена на базе кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского.

В работе в качестве экспериментальных моделей по изучению антимикробной активности новых образцов полимерного соединения были использованы стандартные тест-штаммы грамотрицательных и грамположительных бактерий.

Объектом исследования стал биосовместимый полимер полиазолидинамоний и его модификации, синтезированный сотрудниками кафедры информационной безопасности автоматизированных систем Саратовского государственного технического университета имени Ю. А. Гагарина

В работе применялся метод двукратных серийных разведений, рабочие концентрации изучаемых образцов полимеров находились в диапазоне от исходных концентраций до 4 мкг/мл.

Данное соединение представляет собой неограниченнорастворимый в воде полимер, по результатам ранее проведенных токсикологических испытаний он относится к IV классу токсичности [3]. По структуре полиазолидинаммоний является полиэлектролитом, относящимся к классу поликатионов с высокой плотностью заряда, неограниченно растворим в воде.

Работа проводилась с различными вариантами полимера, отличающимися молекулярной массой полимерной цепи (<100, 100-200, 200-300, 400-600 кДа) а также содержанием гидрат-ионов йода (5, 10, 15 мкг/мл). Кроме того, образцы полимеров различались между собой исходной концентрацией активного вещества (10, 20, 35%).

Определение чувствительности стандартных и клинических тест-штаммов ко всем исследуемым соединениям проводилось методом двукратных серийных разведений. Определяли минимальную подавляющую концентрацию всех исследуемых соединений. Определение бактерицидного или бактериостатического действия соединений проводили высевом из всех опытных пробирок в чашки Петри на поверхность плотной питательной среды — агар Мюллера-Хинтона [4].

Структура и объем работы. Диплом изложен на 37 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа включает 6 таблиц и 4 рисунка. Список использованных источников включает в себя 31 наименование.

Основное содержание работы

На первом этапе работы была изучена антимикробная активность исходных вариантов полиазолидиламмонния, с различными концентрациями активного вещества, на модели стандартных тест-штаммов микроорганизмов.

В работе использовались стандартные тест-штаммы бактерий: *Escherichia coli* 113-13, *Bacillus cereus* 8035 и *Staphylococcus aureus* 209 P. Штамм *E. coli* 113-13 является представителем грамотрицательных палочек, *S. aureus* 209 P – грамположительных кокков, *B. cereus* 8035 – грамположительных спорообразующих палочек.

Было установлено, что из трех исходных вариантов полимера ни один не проявил антибактериальную активность в отношении тест-штамма *E. coli* 113-13.

Устойчивость *E. coli* 113-13 ко всем вариантам исходных вариантов полимеров объяснялось строением клеточной стенки. Проницаемость клеточной стенки у грамотрицательных видов гораздо ниже, чем у грамположительных бактерий. Данный эффект наблюдался при исследовании последующих образцов полимера.

Концентрация ПААГ₁ 17500 мкг/мл для *B. cereus* 8035 оказывала бактериостатическое действие. В отношении *S. aureus* 209P данный вариант полимера не проявлял антибактериальную активность.

ПААГ₂ проявил антимикробную активность в отношении *B. cereus* 8035 при концентрации активного вещества 5000 мкг/мл, в отношении *S. aureus* 209P при концентрации активного вещества 2500 мкг/мл.

ПААГ₃ являлся вариантом полимера с изначально меньшей концентрацией активного вещества, таким образом МПК для *B. cereus* 8035 составила 2500 мкг/мл, для *S. aureus* 209P 1250 мкг/мл.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что варианты полимера с изначально меньшей концентрацией активного вещества обладают более выраженным антибактериальным эффектом, по сравнению с образцами полимеров с большей концентрацией.

Данный эффект можно объяснить молекулярной структурой исследуемого варианта полимера. При высоких концентрациях полимер представляет из себя глобулярную молекулу, в которой активные центры оказываются скрытыми, в связи с чем полимер не может эффективно взаимодействовать с поверхностью бактериальной клетки.

При более низких концентрациях происходит разворачивание глобулы, и активные центры начинают взаимодействовать с клеточной стенкой бактерий. Поэтому, на основании полученных результатов было принято решение в

дальнейшей работе использовать варианты полимера с изначально более низкой концентрацией активного вещества.

Второй этап работы включал в себя оценку антибактериальной активности трех вариантов ПААГ с различными значениями молекулярной массы. В работе использовали разведения исходных вариантов полимерных образцов, и рабочие концентрации в интервале от 1000 до 4 мкг/мл.

Все варианты полимера на данном этапе работы проявили ярко выраженное бактерицидное действие.

Было установлено, что наибольшей антимикробной активностью обладает образец ПААГ₃, вариант полимера с наименьшей молекулярной массой по сравнению с другими образцами. Так, для *E. coli* 113-13 показатель МПК образца составил 125 мкг/мл, значение МПК 64 мкг/мл данного варианта полимера для *S. aureus* 209Р оказалось губительным. При концентрации 32 мкг/мл образец ПААГ₃ проявлял бактерицидное действие по отношению к тест-штамму *B. cereus* 8035.

Вариант полимера ПААГ₄ проявил антибактериальную активность в отношении *E. coli* 113-13 при концентрации 250 мкг/мл, при аналогичной концентрации он действовал и на штамм *S. aureus* 209Р. Наименее устойчивым к данному варианту полимера оказался штамм *B. cereus* 8035, значение МПК для которого составляло 125 мкг/мл.

Из трех изучаемых образцов, полимер ПААГ₅ (вариант полимера с максимальными значениями молекулярной массы, 400-600 кДа) показал наименьшую антимикробную активность по отношению ко всем трем тест-штаммам. Бактерицидное действие данного образца наблюдалось при концентрации 500 мкг/мл для *E. coli* 113-13, для *B. cereus* 8035 и *S. aureus* 209Р концентрация 250 мкг/мл оказалась губительной.

Таким образом, в результате проведенных исследований была выявлена прямая зависимость антибактериальных свойств различных вариантов полимеров от значений их молекулярной массы. Стало известно, что чем

меньше молекулярная масса полимера, тем выше его антибактериальная активность

Это объясняется особенностями строения клеточных стенок бактерий. Известно, что чем меньше молекулярный вес соединения, тем ему легче проникнуть в клетку. Кроме того, четко прослеживалась большая устойчивость штамма *E. coli* 113-13, как и на предыдущем этапе работы.

Следующий этап работы включал в себя оценку антимикробной активности модификаций полимера (ПААГ-М), содержащих различное количество гидрат-ионов йода.

Для точной оценки влияния ПААГ-М, модифицированного гидрат-ионами йода на стандартные тест-штаммы было решено использовать три образца полимера с одинаковой молекулярной массой (100-200 кДа) и различным содержанием гидрат-ионов йода (5, 10, 15 мг/л).

На данном этапе работы из трех исследуемых вариантов ПААГ-М₆ проявил самую низкую антимикробную активность по отношению к тест-штаммам. Так для *E. coli* 113-13 МПК составила 64 мкг/мл, а для *B. cereus* 8035 и *S. aureus* 209P – 32 мкг/мл.

Минимальная подавляющая концентрация образца ПААГ-М₇ для *E. coli* 113-13 и *S. aureus* 209P составила 16 мкг/мл, для *B. cereus* 8035 – 32 мкг/мл.

На данном этапе работы наиболее эффективное антимикробное действие проявил образец полимера ПААГ-М₈ по отношению ко всем трем стандартным тест-штаммам бактерий. Минимальная подавляющая концентрация данного образца для *E. coli* 113-13 составила 8 мкг/мл, для *B. cereus* 8035 и *S. aureus* 209P – 4 мкг/мл.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что наличие в составе соединения гидрат-ионов йода увеличивает антимикробные свойства полимера. Кроме того, наблюдалась тенденция в увеличении эффективности антимикробного действия всех вариантов ПААГ-М с увеличением содержания гидрат-ионов йода в отношении тест-штаммов бактерий

На заключительном этапе работы проводили оценку антибактериальной активности вариантов полиазолидинаммония, отличающихся по величине молекулярной массы (ПААГ₃, ПААГ₄, ПААГ₅) и содержанию гидрат-ионов йода (ПААГ-М₆, ПААГ-М₇, ПААГ-М₈).

Результаты проведенных исследований показали, что все варианты модификаций полиазолидинаммония проявляли различную антибактериальную активность в отношении всех трех тестовых культур

Была выявлена прямая зависимость антибактериального действия разных образцов полимера, от значений их молекулярных масс. Установлено, что чем меньше показатель молекулярной массы полимера, тем выше его антибактериальная активность в отношении стандартных тест-культур.

Это явление связано с тем, что при низких значениях молекулярной меняется структура молекулы полимера со сложной глобулярной до линейной разветвленной, такая молекулярная структура полимерного соединения способствует его лучшему взаимодействию с клеточной стенкой бактерий.

Так же стало известно, что наличие в составе молекулы гидрат-ионов йода увеличивает антимикробную активность полиазолидинаммония. Кроме того, эффективность антимикробного действия всех вариантов ПААГ-М на тест-культуры усиливалась с увеличением содержания гидрат-ионов йода.

Наибольшая антибактериальная эффективность была выявлена у образца ПААГ-М₇, который имел низкий показатель молекулярной массы (100-200 кДа) и высокое содержание гидрат-ионов йода (15 мкг/мл).

Полученные результаты позволяют осуществить выбор наиболее эффективных соединений с высокой антимикробной активностью, которые имеют определенные значения физико-химических показателей, что обеспечит их лучшее избирательное действие.

Заключение

Проблема антибиотикорезистентности выражена не только в медицине, во многих отраслях промышленности микроорганизмы наносят колоссальный ущерб экономике. Предельно ясно, что проблему преодоления антибиотикорезистентности не решить за короткий промежуток времени. Именно в поиске новых и совершенствовании более ранних способов заключается возможность окончательно подчинить себе микроорганизмы. Кроме экономической выгоды, которую сулит преодоление антибиотикорезистентности, человечество получит возможность победить большое количество болезней, тем самым сохранив огромное число жизней. Из-за колоссальной распространенности устойчивости к антимикробным препаратам, данную проблему невозможно решить усилиями одного научного учреждения, необходимо международное сотрудничество, лишь общими усилиями можно найти способ преодоления данной проблемы.

Один из перспективных методов преодоления резистентности служит получение новых веществ, обладающих антимикробной активностью .

К таким веществам можно отнести полимерные соединения. на сегодняшний день ведутся работы по получению экспериментальных препаратов, являющихся модификациями полимерных соединений, что позволяет преодолеть устойчивость микроорганизмов к устаревшим антибактериальным препаратам [5].

Полиазолидинамоний является одним из таких перспективных соединений. Поэтому целью нашей работы было изучение антимикробной активности различных вариантов данного соединения в зависимости от их физико-химических свойств. При этом учитывались биологические особенности тестируемых штаммов микроорганизмов.

На первом этапе работы нами была изучена антибактериальная активность исходных вариантов полиазолидинамония, с различной начальной концентрацией активного вещества на модели стандартных тест-штаммов.

Стало известно, что исходные варианты проявляют различную антимикробную активность по отношению к тест-штаммам. Таким образом были определены варианты полимера, которые были использованы в дальнейшей работе.

На втором этапе работы производили оценку антибактериальной активности трех вариантов ПААГ с различными значениями молекулярной массы.

Все три варианта полимера использовавшиеся на данном этапе работы проявили бактерицидное действие.

Из исследованных на данном этапе образцов наибольшей антимикробной активностью обладал ПААГ₃, вариант полимера с наименьшей молекулярной массой. Так, для *E. coli* 113-13 показатель МПК образца составил 125 мкг/мл, зн 64 мкг/мл для *S. aureus* 209Р, 32 мкг/мл для *B. cereus* 8035.

Вариант полимера ПААГ₄ проявил антибактериальную активность в отношении *E. coli* 113-13 и *S. aureus* 209Р при концентрации 250 мкг/мл. Значение МПК для *B. cereus* 8035 составило 125 мкг/мл.

Полимер ПААГ₅ (вариант полимера с максимальными значениями молекулярной массы) показал наименьшую антимикробную активность по отношению ко всем трем тест-штаммам. Минимальная подавляющая концентрация составила 500 мкг/мл для *E. coli* 113-13, 250 мкг/мл для *B. cereus* 8035 и *S. aureus* 209Р.

Была выявлена прямая зависимость антибактериальных свойств различных вариантов полимеров от значений их молекулярной массы. Варианты полиазолидинаммония с минимальными значениями молекулярной массы обладали высокой антимикробной активностью.

Это объясняется особенностями строения клеточных стенок бактерий. Известно, что чем меньше молекулярный вес соединения, тем ему легче проникнуть в клетку. Кроме того, четко прослеживалась большая устойчивость штамма *E. coli* 113-13, как и на предыдущем этапе работы.

Следующий этап работы включал в себя оценку антимикробной активности модификаций полимера (ПААГ-М), содержащих различное количество гидрат-ионов йода.

На данном этапе работы из трех исследуемых вариантов полимера, ПААГ-М₆ проявил самую низкую антимикробную активность по отношению к тест-штамму. Так для *E. coli* 113-13 МПК составила 64 мкг/мл, а для *B. cereus* 8035 и *S. aureus* 209Р – 32 мкг/мл.

Минимальная подавляющая концентрация образца ПААГ-М₇ для *E. coli* 113-13 и *S. aureus* 209Р составила 16 мкг/мл, для *B. cereus* 8035 – 32 мкг/мл.

Эффективное антимикробное действие проявил образец полимера ПААГ-М₈ по отношению ко всем трем стандартным тест-штаммам бактерий. Минимальная подавляющая концентрация данного образца для *E. coli* 113-13 составила 8 мкг/мл, для *B. cereus* 8035 и *S. aureus* 209Р – 4 мкг/мл.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что наличие в составе соединения гидрат-ионов йода увеличивает антимикробные свойства полимера. Кроме того, наблюдалась тенденция в увеличении эффективности антимикробного действия всех вариантов ПААГ-М с увеличением содержания гидрат-ионов йода в отношении тест-штаммов бактерий.

На заключительном этапе работы проводили оценку антибактериальной активности вариантов полиазолидинаммония, отличающихся по величине молекулярной массы и содержанию гидрат-ионов йода.

Результаты проведенных исследований показали, что все варианты модификаций полиазолидинаммония проявляли различную антибактериальную активность в отношении всех трех тестовых культур.

Была выявлена прямая зависимость антибактериального действия разных образцов полимера, от значений их молекулярных масс. Установлено, что чем меньше показатель молекулярной массы полимера, тем выше его антибактериальная активность в отношении стандартных тест-культур.

Это явление связано с тем, что при низких значениях молекулярной массы меняется структура молекулы полимера со сложной глобулярной до линейной

разветвленной, такая молекулярная структура полимерного соединения способствует его лучшему взаимодействию с клеточной стенкой бактерий.

Так же стало известно, гидрат-ионы йода увеличивают антимикробную активность полиазиолидинаммония. Кроме того, была выявлена тенденция, к усилению эффективности антимикробного действия всех вариантов ПААГ-М на тест-культуры с увеличением содержания гидрат-ионов йода.

Наибольшая антибактериальная эффективность была выявлена у образца ПААГ-М₈, имевшем низкий показатель молекулярной массы (100-200 кДа) и высокое содержание гидрат-ионов йода (15 мкг/мл).

Полученные результаты позволяют осуществить выбор наиболее эффективных соединений с высокой антимикробной активностью, которые имеют определенные значения физико-химических показателей, что обеспечит их лучшее избирательное действие.

Выводы

1. Установлена антимикробная активность исходных вариантов полиазиолидинаммония по отношению к стандартным тест-штаммам бактерий: значения МПК составили от 5000 до 17500 мкг/мл

2. Вариант полиазиолидинаммония с низкой молекулярной массой (ПААГ₅) проявил наиболее эффективное антимикробное действие на тест-культуры бактерий, для которых показатель МПК составил от 250 до 500 мкг/мл.

3. Образец полиазиолидинаммония с содержанием йода 15 мкг/мл (ПААГ-М₈) проявил наиболее выраженное антимикробное действие в отношении стандартных тест-штаммов в концентрациях от 4 до 8 мкг/мл.

4. Выявлена прямая зависимость антимикробной активности полиазиолидинаммония от величины его молекулярной массы и содержания гидрат-ионов йода. С уменьшением значений молекулярной массы и увеличением содержания гидрат-ионов йода, усиливаются антимикробные свойства изучаемого полимера.

Список использованных источников:

1. Сидоренко, С. В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С. В. Сидоренко, В. И. Тишков // Успехи биологической химии. 2004. Т. 44. С. 263-306.
2. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам. [Электронный ресурс] // antibiotic.ru [Электронный ресурс] [сайт]. URL: <http://www.antibiotic.ru/files/pdf/execsumr.pdf> (дата обращения: 01.04.2016).
3. Вакараева, М. М. Оценка антимикробной активности полиазолидинаммония модифицированного гидрат-ионами йода, в зависимости от его физико-химических характеристик / М. М. Вакараева, В. Ю. Ульянов, О. В. Нечаева и др. // Саратовский научно-медицинский журнал 2015. № 3. С. 255-257.
4. Методические указания МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.
5. Дьякова, М. Г. Химическая модификация полимеров 4-винилбензилхлорида и антимикробные свойства образующихся гидроксилсодержащих полимеров / М. Г. Дьякова [и др.] // Вестник МИТХТ. 2012. Т. 7, № 2. С. 66-70.