

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

Кафедра микробиологии
и физиологии растений

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ
ПОЛИАЗОЛИДИНАММОНИЯ С РАЗЛИЧНЫМИ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Специальности 020201 Биология

Биологического факультета

Чернышовой Людмилы Александровны

Научный руководитель:

доцент, к.б.н

Н. Ф. Шуршалова

Зав.кафедрой :

доктор биологических наук,

профессор

С. А. Степанов

Саратов 2016

Введение

Актуальность темы. Устойчивость бактерий к антимикробным препаратам остается одной из самых серьезных проблем современной медицины. В процессе эволюции многие микроорганизмы адаптировались к присутствию в среде антимикробных препаратов, что привело к возникновению устойчивости к ним. Разработка лекарственного средства (в том числе и антибиотиков) – это длительный многолетний процесс, который включает несколько этапов. На этапе доклинических испытаний проводится отбор новых перспективных соединений с антимикробной активностью [1].

Одним из перспективных путей преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов является поиск и внедрение в практику новых антибактериальных веществ, в том числе с отличным от широко применяемых антибиотиков строением и механизмом действия.

В связи с этим особое внимание проявляется в отношении новых биосовместимых полимерных соединений, или биополимеров, имеющих очень важное значение в химии всех живых организмов.

Поэтому, поиск веществ с антибактериальной активностью среди новых модифицированных биополимерных соединений и изучение их антибактериального действия на различные микроорганизмы является актуальной задачей, определившей необходимость проведения настоящего исследования и позволившей сформулировать его цель и задачи.

Цель и задачи исследования. Целью нашей работы явилось изучение антимикробной активности нового полимерного соединения полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в зависимости от его физико-химических характеристик в отношении стандартных тест-штаммов микроорганизмов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Изучить антимикробную активность исходного полимера ПААГ-М на модели стандартных тест-штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, и грибов рода *Candida*.

2. Оценить антибактериальное действие модификаций полимера с различной молекулярной массой по отношению к тест-штаммам микроорганизмов.

3. Определить антимикробную активность вариантов полимера с различными концентрациями гидрат-ионов йода в отношении исследуемых штаммов микроорганизмов.

Материалы и методы. Работа была выполнена на кафедре микробиологии и физиологии растений СГУ имени Н. Г. Чернышевского.

В работе в качестве экспериментальных моделей по изучению антимикробной активности нового полимера были использованы стандартные тест-штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов рода *Candida*.

Объектом исследования явился биосовместимый полимер полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ-М), синтезированный сотрудниками кафедры информационной безопасности автоматизированных систем Саратовского государственного технического университета имени Ю. А. Гагарина. Данное соединение представляет собой неограниченно растворимый в воде биополимер. По результатам комплексных токсикологических испытаний он был отнесен к IV классу токсичности [2].

Работу проводили с различными вариантами ПААГ-М, отличающимися физико-химическими свойствами: различной молекулярной массой (<100, 100-200, 200-350 и 400-500 кДа) и содержанием гидрат-ионов йода (6; 12,5; 25; 50 мкг/мл).

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 [3].

Структура и объем работы. Диплом изложен на 37 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа включает 3 таблицы и 4 рисунка. Список использованных источников включает в себя 34 наименований.

Основное содержание работы

На первом этапе работы была изучена антимикробная активность исходного варианта биосовместимого полимера поласолидиламмония, модифицированного гидрат-ионами йода (ПААГ-М) с молекулярной массой 500 кДальтон и содержанием ионов йода 100 мкг/мл на модели стандартных тест-штаммов бактерий и грибов рода *Candida*.

Для первичного скрининга использовали стандартные тест-штаммы бактерий *Escherichia coli* 113-13, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* 209 P, *Bacillus cereus* 8035. Штаммы *E. coli* 113-13 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 являются представителями грамотрицательных палочек, *S. aureus* 209 P – грамположительных кокков, *B. cereus* 8035 – грамположительных спорообразующих палочек, а тест-штамм рода *Candida* 16 является представителем микроскопических дрожжеподобных грибов.

В ходе проведенных исследований было установлено, что полимерное соединение проявляло различную антибактериальную активность по отношению ко всем стандартным тест-штаммам микроорганизмов.

Полимер ПААГ-М характеризовался самым эффективным антибактериальным действием в отношении грамположительных бактерий – *S. aureus* 209 P и *B. cereus* 8035. МПК для каждого из этих микроорганизмов составила 32 мкг/мл и 250 мкг/мл соответственно, причем при данных концентрациях проявлялось бактерицидное действие вещества.

В отношении *E. coli* 113-13 ПААГ-М обладал бактерицидным действием в концентрации 500 мкг/мл.

Концентрация ПААГ-М 500 мкг/мл для *P. aeruginosa* ATCC 27853 оказывала бактериостатическое действие, при этом синегнойная палочка утрачивала способность к пигментообразованию.

В отношении *Candida* 16 изучаемый полимер ПААГ-М проявлял фунгиостатическое действие в концентрации 1000 мкг/мл.

Таким образом, на первом этапе работы была установлена антимикробная активность биосовместимого полимера ПААГ-М с максимальными значениями показателей молекулярной массы (500 кДа) и концентрации ионов йода (100 мкг/мл) по отношению к стандартным тест-штаммам грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов рода *Candida*.

На втором этапе работы нами была изучена антимикробная активность четырех вариантов биосовместимого полимера полазолидиламмония, модифицированного гидрат-ионами йода (ПААГ-М₆) с различной молекулярной массой (<100, 100-200, 200-350 и 400-500 кДа) и минимальным содержанием ионов йода (6 мкг/мл) на модели стандартных тест-штаммов микроорганизмов.

В ходе проведенных исследований было установлено, что полимерные соединения ПААГ-М₆ с разной молекулярной массой проявляли различную антимикробную активность по отношению ко всем стандартным тест-штаммам микроорганизмов.

Было установлено, что стандартные штаммы грамотрицательных бактерий проявили высокую чувствительность к варианту полимера с наименьшей молекулярной массой. Так для *E. coli* 113-13 значения МПК ПААГ-М₆ с молекулярной массой <100 кДа составили 16 мкг/мл, а с молекулярной массой 100-200 кДа – 32 мкг/мл, причем при данных показателях проявлялось бактерицидное действие полимера. Для *P. aeruginosa* ATCC 27853 значения МПК данных вариантов полимера

составили 32 мкг/мл в обоих случаях с бактериостатическим характером действия. Увеличение молекулярной массы полимера приводило к снижению его антимикробной активности в отношении грамотрицательных бактерий.

Стандартные штаммы грамположительных бактерий проявили большую чувствительность к вариантам полимера с более высокой молекулярной массой 200-350 и 400-500 кДа. Так, значения бактерицидных МПК для *S. aureus* 209 P составили 16 и 32 мкг/мл соответственно. Показатели МПК полимера с молекулярной массой 500 кДа в отношении *B. cereus* 8035 составили 250 мкг/мл, при этом отмечали бактериостатический характер действия вещества.

Наименьшая эффективность полимерного соединения ПААГ-М₆ была отмечена в отношении стандартного штамма микроскопических грибов *C. aldicans* 16. Значения бактериостатических МПК были определены только у варианта полимера с максимальной молекулярной массой 400-500 кДа и составили для *C. aldicans* 16 1000 мкг/мл.

Таким образом, была установлена зависимость антимикробной активности изучаемого полимера от его молекулярной массы. Наблюдался избирательный характер действия разных вариантов полимера на грамположительные и грамотрицательные бактерии в зависимости от значений величины молекулярной массы.

В отношении грамотрицательных бактерий наибольшую активность проявили варианты ПААГ-М с низкой молекулярной массой полимерной цепи (<100 и 100-200 кДа), а в отношении грамположительных бактерий – варианты с большей молекулярной массой (200-350 и 400-500 кДа). Действие ПААГ-М в отношении клеток микроскопических грибов не зависело от его молекулярной массы и наблюдалось при максимальных значениях данного показателя. Первым барьером на пути взаимодействия микроорганизмов с антимикробными соединениями являются клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана, которые обеспечивают осмотический барьер и избирательное проникновение веществ в клетку.

Большая эффективность вариантов полимера с низкой молекулярной массой в отношении грамотрицательных бактерий связана с особенностями строения их клеточной стенки. Единственным местом проникновения в клетку различных веществ являются пориновые каналы, представляющие собой систему интегральных белков, через которые способны проходить химических соединений только с определенной молекулярной массой и пространственной организацией [4].

Для грамположительных бактерий важнейшим условием взаимодействия соединений с микробной клеткой является способность функционально-активных групп к межмолекулярной ассоциации с компонентами клеточной стенки. В составе исследуемых вариантов ПААГ-М основным действующим компонентом являются гидрат-ионы йода.

Эффективность действия различных антимикробных средств на микроорганизмы зависит от их способности изменять проницаемость клеточной стенки и проникать внутрь клетки. Поэтому наибольший интерес представляют препараты, увеличивающие пассивный транспорт и проницаемость мембран. Сильное дестабилизирующее действие на мембраны клеток оказывают низкомолекулярные катионные поверхностно-активные вещества (ПАВ), к которым относятся варианты полимера ПААГ-М с молекулярной массой <100 и 100-200 кДа.

Поскольку основным действующим началом в составе полимера являются гидрат-ионы йода, представляло интерес оценить зависимость антимикробной активности от их содержания в составе полимера.

Далее нами была изучена антимикробная активность четырех вариантов модифицированного полимера (ПААГ-М) с различным содержанием ионов йода и максимальной молекулярной массой 500 кДа и на модели стандартных тест-штаммов бактерий и грибов рода *Candida*.

Было установлено, что увеличение концентрации гидрат-ионов йода в составе полимера приводило к повышению эффективности антимикробного действия всех вариантов ПААГ-М, что выражалось в снижении показателей

МПК. Однако общая тенденция избирательного характера действия на грамположительные и грамотрицательные бактерии в зависимости от величины молекулярной массы сохранялась для всех вариантов полимера.

Наименьшая эффективность полимерного соединения ПААГ-М была отмечена в отношении стандартного штамма микроскопических грибов *S. aldicans* 16. В ходе проведенного исследования нам не удалось установить зависимость противогрибковой активности ПААГ-М от молекулярной массы: варианты полимера ПААГ-М₆ и ПААГ-М_{12,5} не обладали противогрибковой активностью даже при использовании самых высоких рабочих концентраций препаратов.

Однако установлено, что противогрибковая активность ПААГ-М зависела от концентрации гидрат-ионов йода в составе препарата: ПААГ-М₆ и ПААГ-М_{12,5} не проявили антимикробную активность в отношении *S. aldicans* 16. Повышение концентрации гидрат ионов йода до 25 и 50 мкг/мл в составе препаратов ПААГ-М₂₅ и ПААГ-М₅₀ приводило к появлению противогрибковой активности исследуемых препаратов, хотя значения МПК были достаточно высокими и составили 500 и 250 мкг/мл соответственно.

Таким образом, выявлена прямая зависимость антимикробной активности полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, от концентрации в его составе гидрат-ионов йода в отношении стандартных тест-штаммов микроорганизмов.

Полученные результаты позволяют осуществлять выбор наиболее эффективных препаратов, характеризующихся антимикробной активностью, с заданными физико-химическими характеристиками, что обеспечит большую избирательность их действия.

Заключение

Приобретение резистентности – это биологическая закономерность, связанная с адаптацией микроорганизмов к условиям внешней среды.

К химиопрепаратам адаптируются не только бактерии, но и грибы, вирусы. Проблема формирования и распространения лекарственной

резистентности микробов особенно значима для внутрибольничных инфекций, вызываемых так называемыми «госпитальными штаммами», у которых, как правило, наблюдается множественная устойчивость к антибиотикам (полирезистентность) [5].

Для решения проблемы, связанной с распространением антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, требуется целенаправленный поиск новых химических соединений, обладающих антимикробной активностью в отношении как планктонных, так и биопленочных форм возбудителей.

Высокой антимикробной активностью характеризуются полимерные соединения. В настоящее время создаются экспериментальные препараты, представляющие собой модифицированные полимерными соединениями аналоги современных антибиотиков, что позволяет преодолеть возникшую к ним устойчивость микроорганизмов [6].

Одним из перспективных полимерных соединений с высокой антимикробной активностью является полиазилидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода. В этой связи необходимо было изучить зависимость антимикробных свойств вариантов ПААГ-М от их физико-химических характеристик. Кроме того, для повышения эффективности синтетических химиотерапевтических антимикробных препаратов необходимо учитывать биологические особенности возбудителей инфекционных заболеваний, связанных, например, со строением их клеточной стенки [7].

Учитывая вышеизложенное, нами был проведен анализ антимикробной активности полимерного соединения ПААГ-М в зависимости от его физико-химических характеристик в отношении стандартных тест-штаммов бактерий и грибов рода *Candida*.

На первом этапе работы была изучена антимикробная активность исходного варианта биосовместимого полимера полиазилидиламмония, модифицированного гидрат-ионами йода (ПААГ-М) с молекулярной массой

500 кДальтон и содержанием ионов йода 100 мкг/мл на модели стандартных тест-штаммов бактерий и грибов рода *Candida*.

В ходе проведенных исследований было установлено, что исходное полимерное соединение проявляло различную антибактериальную активность по отношению ко всем стандартным тест-штаммам микроорганизмов.

На втором этапе работы нами была изучена антимикробная активность четырех вариантов биосовместимого полимера полазолидиламмония, модифицированного гидрат-ионами йода (ПААГ-М₆) с различной молекулярной массой (<100, 100-200, 200-350 и 400-500 кДа) и минимальным содержанием ионов йода (6 мкг/мл) на модели стандартных тест-штаммов микроорганизмов.

В ходе проведенных исследований было установлено, что полимерные соединения ПААГ-М₆ с разной молекулярной массой проявляли различную антимикробную активность по отношению ко всем стандартным тест-штаммам микроорганизмов.

Из четырех вариантов ПААГ-М с разной длиной полимерной цепи в отношении стандартных штаммов *E. coli* 113-13 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 наибольшую антимикробную активность проявили варианты с низкой молекулярной массой >100 и 100-200 кДа, а в отношении *S. aureus* 209 P и *B. cereus* 8035 – варианты с молекулярной массой 200-350 и 400-500 кДа. Особенности строения клеточной стенки грамотрицательных бактерий обуславливают их чувствительность к низкомолекулярным вариантам исследуемого полимера, поскольку благодаря наличию интегральных пориновых белков в клетку транспортируются химические соединения с невысокой молекулярной массой и определенной пространственной конформацией. В отношении грамположительных бактерий большая активность высокомолекулярных вариантов полимера, вероятно, связана с более эффективной блокировкой функциональных групп клеточной стенки.

Низкая активность ПААГ-М отмечена в отношении стандартного штамма *C. albicans* 16, что не позволило нам определить значения МПК и установить зависимость от длины полимерной цепи, что, вероятно, связано со сложностью проникновения химических соединений через плотную клеточную стенку грибов, содержащую хитин.

Поскольку основным действующим началом в составе полимера являются гидрат-ионы йода, представляло интерес оценить зависимость антимикробной активности от их содержания в составе полимера. Была установлена линейная зависимость повышения эффективности антимикробного действия ПААГ-М при повышении концентрации гидрат-ионов йода. Кроме того, препараты с высоким содержанием гидрат-ионов йода характеризовались антимикотической активностью, однако показатели значений МПК были высокими. Полученные результаты позволяют осуществлять выбор наиболее эффективных препаратов, характеризующихся антимикробной активностью, с заданными физико-химическими характеристиками, что обеспечит большую избирательность их действия.

Выводы

1. Минимальные подавляющие концентрации (МПК) полиазолидинаммония для *Staphylococcus aureus* 209 P и *Bacillus cereus* 8035 составляют 32 мкг/мл, причем при данных концентрациях проявляется бактерицидное действие вещества. В отношении *Escherichia coli* 113-13 данный полимер обладает бактерицидной активностью в концентрации 250 мкг/мл.

2. Исходный полимер ПААГ-М в концентрации 500 мкг/мл оказывает бактериостатическое действие на тест-штамм *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, и фунгиостатическую активность в отношении *Candida albicans* 16.

3. В отношении грамотрицательных бактерий наибольшую активность проявили варианты ПААГ-М с низкой молекулярной массой полимерной цепи (<100 и 100-200 кДа), а в отношении грамположительных

бактерий – варианты с большей молекулярной массой (200-350 и 400-500 кДа). Действие ПААГ-М в отношении клеток микроскопических грибов не зависело от его молекулярной массы.

4. Установлено, что увеличение концентрации гидрат-ионов йода в составе полимера приводит к повышению эффективности антимикробного действия всех вариантов ПААГ-М, что выражается в снижении показателей МПК с 32 мкг/мл до 2 мкг/мл.

Список использованных источников:

1. Бут, А. Современная микробиология: Прокариоты: в 2-х томах / А. Бут; под ред. А. Ленглера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. Т.1, Пер. с англ. М.: Мир, 2005. 496 с.
2. Меншиков, В. В. Лабораторные методы исследования в клинике / В. В. Меншиков. М.: Медицина, 1987. 365 с.
3. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.2.1890.04 // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2004. Т. 6, №4. С. 306–359.
4. Маянский, А. Н. Патогенетическая микробиология: руководство / А. Н. Маянский. Н. Новгород: Издательство Нижегородской государственной медицинской академии, 2006. 520 с.
5. Шабалов, Н. П. Неонатология. Госпитальные инфекции у новорожденных / Н. П. Шабалов, Т. Н. Касаткина. Москва: Медицина, 2008. 306 с.
6. Страчунский, Л. С. Макролиды в современной клинической практике / Л. С. Страчунский, С. Н. Козлов. М.: Издательство «Медицина», 1967. 413 с.
7. 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.