

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Медико-профилактический факультет с отделением микробиологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи

Махианова Гузель Раисовна

**N-[(ПИРИДИН-4-КАРБОНИЛАМИНО) КАРБАМОТИОИЛ] ФУРАН-2-
КАРБОКСАМИД – НОВАЯ, СВЯЗЫВАЮЩАЯ РИБОСОМУ БАКТЕРИЙ
ПЕРСПЕКТИВНАЯ АНТИМИКРОБНАЯ МОЛЕКУЛА**

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор



Ал. Х. Баймиев

Уфа – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	3
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Антибиотик. Что это?	7
1.2. Классификация антибиотиков по механизму действия	10
1.3. Механизм устойчивости к антибиотикам	21
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
2.1. Объекты исследования	23
2.2. Питательные среды и условия стерилизации	24
2.3. Тестовые штаммы для определения антибиотической активности	24
2.4. Определение антибиотической чувствительности	25
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	27
3.1. Скрининг бактериальных штаммов	28
3.2. Исследование на клинических штаммах	29
3.3. Активность молекулы на штаммах пробиотических бактерий	33
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	39
ВЫВОДЫ	40
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	41

Список сокращений и условных обозначений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

50S – большая субчастица рибосомы

30S – малая субчастица рибосомы

мРНК – матричная РНК

рРНК – рибосомная РНК

тРНК – транспортная РНК

МПК – минимальная подавляющая концентрация

МБК – микроорганизмы в популяции

Сокращения названий микроорганизмов

E.Coli – *Escherichia coli*

E. aerogenes – *Enterobacter aerogenes*

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

K. pneumoniae – *Klebsiella pneumonia*

K. oxytoca – *Klebsiella oxytoca*

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

C. albicans – *Candida albicans*

C. koseri – *Citrobacter koseri*

M. morganii – *Morganella morganii*

P. mendocina – *Pseudomonas mendocina*

Ps. putida – *Pseudomonas putida*

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день во всём мире увеличился рост устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам. Причина устойчивости к антибиотикам – естественный отбор благодаря бесконтрольному, чрезмерному использованию антимикробных лекарственных средств (например, несоблюдение курса лечения) не только в медицине, но и в ветеринарии, животноводстве и сельском хозяйстве.

Лечение антибиотиками – один из основных методов лечения в современной медицине для борьбы с инфекциями. Список патогенных возбудителей постоянно растёт и это не может не пугать. Устойчивость к антибиотическим препаратам является огромной проблемой во всём мире, связанной с высокой смертностью. Резистентность микроорганизмы приобретают путём горизонтального переноса генов или благодаря возникновению мутаций.

Появление множественной лекарственной резистентности среди возбудителей внебольничных и нозокомиальных инфекций, ставит под угрозу ценность антибиотиков. Поэтому, остро стоит проблема поиска новых антимикробных препаратов. Также, необходимы усилия, чтобы притормозить скорость к резистентности путём изучения возникающих мутаций микроорганизмов, а также изучение самого механизма резистентности.

Чтобы антибиотик можно было использовать для лечения, нужно узнать его мишень действия. В половине случаев такой мишенью является рибосома. Часть известных антибиотиков подавляет синтез белка, которая нарушает работу рибосомы на разных стадиях трансляции. Сами антибиотики имеют маленький размер, но способны блокировать работу важнейшей органеллы клетки.

Цель работы – изучение антимикробной активности химически модифицированной молекулы, разрушающей работу рибосомы по отношению клинических штамм бактерий – возбудителей нозокомиальных инфекций, по отношению к музейным и пробиотическим штаммам.

На основе указанной темы были поставлены следующие **задачи**:

- определить антибактериальные свойства молекулы, нарушающей синтез белка, относительно клинически значимых штаммов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*.
- определить антибактериальную активность молекулы в отношении клинических условно-патогенных и пробиотических штаммов.
- определить чувствительность исследуемых микроорганизмов по отношению к тестируемым химическим соединениям диско-диффузионным методом.
- дать сравнительную характеристику молекулы N-[(пиридин-4-карбониламино) карбамотиоил] фуран-2-карбоксамида относительно антибиотиков тетрациклиновой группы.

На основании химического строения вещества, не имеющего ничего схожего с известными ингибиторами биосинтеза белка трудно предсказать, является ли рибосома или аппарат трансляции мишенью для новой молекулы.

Новизна результатов

Благодаря разработке уникальной репортёрной системы, которая в сочетании с классическим тестом на эффективность ингибирования роста может определить механизм действия антибиотика, было отобрано вещество среди множества молекул, экспрессия которого увеличивается в случае ингибирования работы рибосомы. Для этого вещества ранее не было показаны результаты ни механизма действия, ни факт подавления

бактериального роста. В будущем, на их основе будут разрабатываться новые уникальные антибактериальные препараты.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Антибиотик. Что это?

Антибиотик – это препарат природного или полусинтетического происхождения, который подавляет рост и развитие микроорганизмов, приводя их к гибели, и широко используется для борьбы с бактериальными инфекциями.

Антибактериальные препараты являются одними из важнейших открытий в истории человеческого существования. Они спасли множество жизней и внесли огромный вклад в борьбу с инфекционными заболеваниями, которые были основными причинами болезни и смерти большого количества людей на протяжении долгого существования человека, хотя люди долгое время не знали, что в подавляющей части инфекции вызываются бактериями.

Не все вещества, которые уничтожают бактерий можно назвать антибиотиками. До обнаружения патогенных микроорганизмов, в ходе экспериментов и опыта были найдены различные способы борьбы с инфекциями – к примеру, спирт, мыло и т.д. Эти методы использовались для стерилизации медицинских инструментов, для обработки ран и околораневых поверхностей. Поэтому, необходимо понимать, что из себя представляют средства для дезинфекции и препараты, которые применяются для лечения.

Противоинфекционные препараты, полученные естественным или полусинтетическим путём, подавляют или уничтожают микроорганизмы, связанные с инфекционными болезнями внутри организма растений, людей и животных. Такие лекарства выборочно действуют на определённые виды бактерий. Дезинфицирующие препараты – это химические или физические вещества, которые используются на неживых объектах и не для приёма

внутри организма. Например, для обработки различной поверхностей, кожи и слизистой.

Мы обычно связываем начало современной «эпохи антибиотиков» с именами Пола Эрлиха и Александра Флеминга. Немецкий врач Поль Эрлих, отметил, что некоторые химические красители окрашивают бактериальные клетки, но не окрашивают животные клетки. Это открытие, привело к тому, что появилась необходимость создания таких веществ, которые бы убивали бактерии, но не причиняли вред животному организму.

«Представьте организм, инфицированный определённым типом бактерии. Было бы легко его вылечить, имея вещество, специфически действующее на эту бактерию и не действующее на клетки организма. Такие вещества были бы магическими пулями» – Пауль Эрлих (Demain, Sanchez S, 2015).

В 1904 году он начал масштабную работу, для того, чтобы найти лечение от болезни, которая в то время не лечилась – от сифилиса. Сифилис является венерической болезнью, вызывается спирохетой *Treponema pallidum*, а в начале 1900-х годов лечили эту болезнь неорганическими солями ртути. Процесс лечения имел много побочных эффектов и был малоэффективен. Поэтому, Пауль Эрлих совместно с химиком Альфредом Бертхаймом и бактериологом Сахатиро Хата стали синтезировать производные мышьяка с высоким содержанием токсичного средства атоксил и начали испытания на кроликах, которых заражали сифилисом. Испробовав 605 соединений мышьяка, в 1909 году они получили 606-й препарат, который излечил кроликов от сифилиса, и дал возможность для ограниченных испытаний на людях, заражённых сифилисом. Препарат был назван Сальварсаном и имел большой успех, пока его в 1940-х годах не вытеснил пенициллин.

Подход систематического скрининга молекул для поиска специфической активности, который ввёл Пол Эрлих, стал основным для

поиска лекарств в фармацевтической промышленности и позволил найти тысячи лекарств и внедрить их в клиническую практику.

В 1928 году Александром Флемингом, шотландским микробиологом, был случайно обнаружен пенициллин. Он заметил, кое-что необычное в одной из чашек Петри на агаре с бактериями *S. aureus*. Чашка была загрязнена грибом, которая подавляла рост бактерий. Зона вокруг этого грибка была прозрачной, словно грибок выделял что-то, что препятствовало росту бактерий. Позже, Флеминг идентифицировал этот грибок как редкий штамм плесневого гриба – *Penicillium notatum*. Также он определил, что пенициллин, а точнее его «сок», способен убивать широкий спектр патогенных бактерий, таких как стафилококк, стрептококк, менингококк и другие грамположительные бактерии. Затем он поставил перед помощниками Стюартом Крэддоком и Фредериком Ридли трудную задачу выделения чистого пенициллина из плесени. Его попытки оказались провальными, в течение десятилетия прогресс не был достигнут. Всё это время Флеминг отправлял свою плесень *Penicillium* всем, кто её запрашивал, в надежде, что они могут выделить пенициллин для клинического использования. Но к началу 30-х годов интерес к осуществлению мечты Пола Эрлиха о поиске «волшебной пули» уменьшился.

В 1940 году, как только Флеминг собирался уйти в отставку, Эрнст Чейн и Говард Флори, заинтересовались пенициллином. В Оксфордском университете Эрнст Чейн 1929 году нашёл в статье Флеминга по пенициллину и предложил своему руководителю Говарду Флори попытаться очистить это соединение. В 1939 году Говард Флори собрал команду, в которую входил эксперт по грибкам Норман Хитли, работавший над выращиванием *Penicillium spp.* в больших количествах и Эрнст Чейн, который выделял и очищал пенициллин из экстракта плесени. Флори наблюдал за экспериментами на животных. 25 мая 1939 года группа вводила 8 мышам вирулентный штамм *Streptococcus*: 4-м из них также ввели пенициллин, а остальные 4 мыши были в качестве контролей. Рано утром

следующего дня все контрольные мыши были мертвы; мыши, которым ввели пенициллин были ещё живы. Эрнст Чейн назвал результат «чудом». Вскоре им удалось массово производить пенициллин для использования во время Второй мировой войны.

После открытия пенициллина были также выведены и другие антибиотики. Также, в течение 20-го века были созданы и синтетические соединения, которые называли «синтетические антибактериальные агенты». Благодаря устойчивости к найденным природным антибиотикам, улучшилось качество развития их модификации, для того, чтобы сделать их более эффективными и устойчивыми к микроорганизмам.

1.2. Классификация антибиотиков по механизму действия

Антибиотики можно классифицировать по-разному, но в данной работе их лучше разделить в соответствии с механизмом действия. Особый механизм действия, который нарушает определённый процесс у бактерий, является высокоселективным для большинства антибиотиков, поскольку подобные процессы не будут происходить в клетках человека или структура их участников сильно отличается. Основным механизмом действия является угнетение биосинтеза клеточной стенки, нарушение мембранной структуры, подавление синтеза белка, синтеза нуклеиновых кислот или метаболические нарушения (рис. 1) [12].

Главная причина, из-за чего нам необходимо искать новые антибиотики – увеличение количества бактерий, устойчивых к существующим антибиотикам. Из-за различий в бактериальных геномах, лекарственная устойчивость бывает «врождённой» и «приобретённой», благодаря мутаций между бактериями и обмена генетическим материалом.

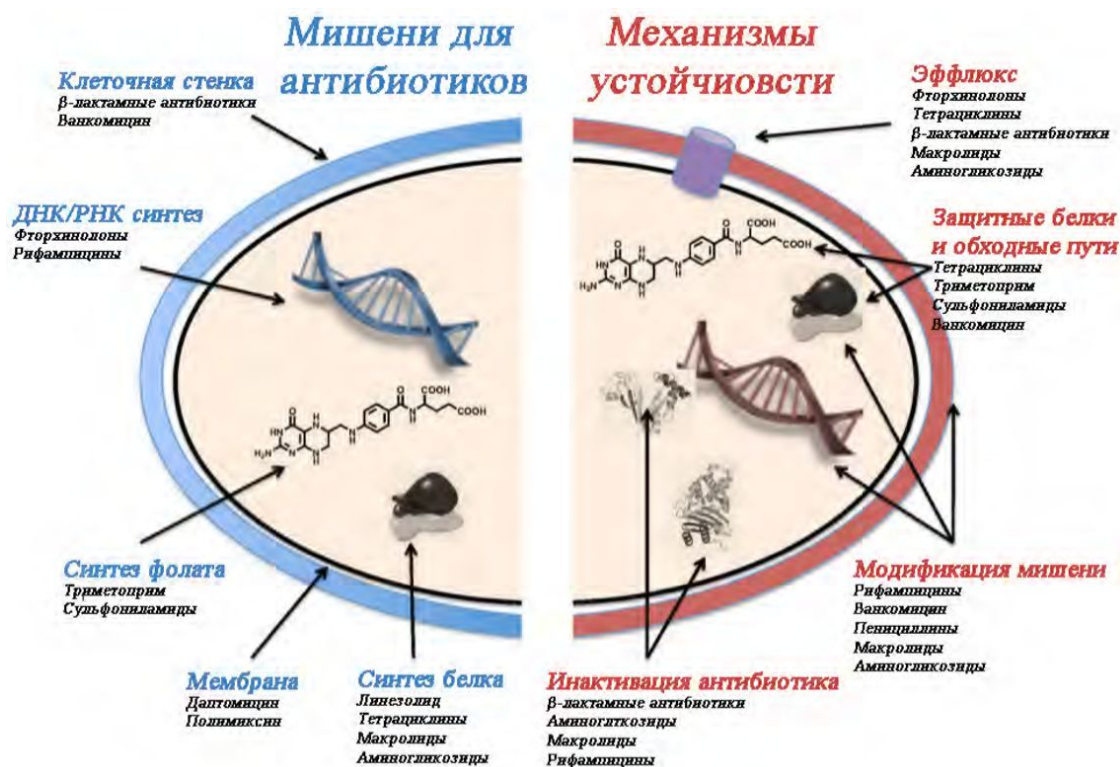


Рисунок 1 – Распространённые мишени действия антибиотиков и механизмы возникновения устойчивости.

1.2.1. Антибиотики, нарушающие биосинтез клеточной стенки

В дополнение к цитоплазматической мембране большинство бактерий содержат слой пептидогликана (длинная дисахаридная цепь, связанная пептидным мостиком) снаружи клеточной стенки.

Пептидогликан состоит из цепи, образованной повторяющимся комплексом 2-х аминокислот – N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Тетрапептид присоединён к каждой молекуле N-ацетилмурамата. Между тетрапептидами соседних цепей образуется транспептидазный пептидный мостик. Следовательно, пептидогликан образует прочный каркас клеточной стенки [12].

Во время деления микробных клеток активируется муреингидролаза, которая разрушает транспептидные мостики и этим расщепляет пептидогликан (муреин).

Вещества, которые нарушают клеточную стенку бактерий, могут мешать синтезу пептидогликанов или разрушать связи между их цепями. В то же время снижается прочность клеточной стенки, и растущие бактерии погибают.

К антибиотикам, разрушающим клеточную стенку бактерий, относятся β -лактамы, гликопептидные антибиотики, циклосерин и бацитрацин (рис. 2).

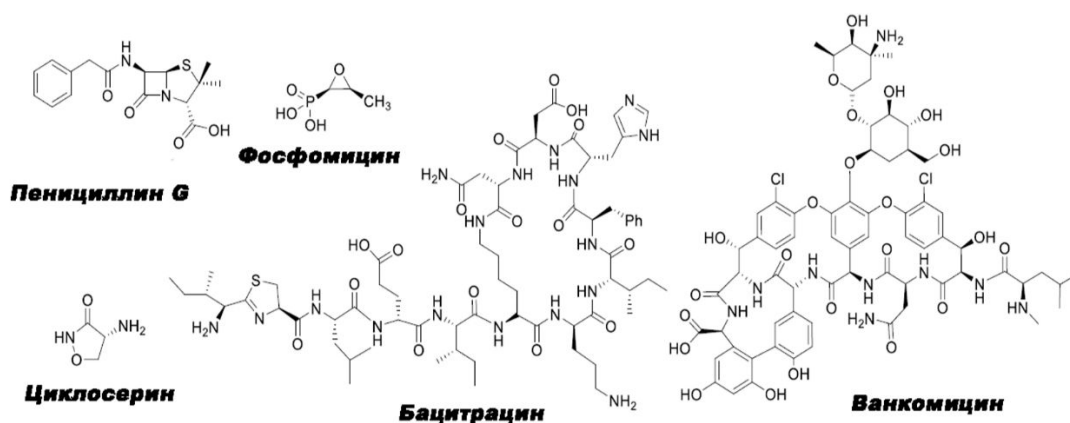


Рисунок 2 – Антибиотики, нарушающие биосинтез клеточной стенки

β -лактамы. Являются наиболее широко используемой группой антибиотиков. Они характеризуются наличием в структуре β -лактамовых колец. Эта группа включает в себя цефалоспорины, карбапенемы, монобактамы и производные пенициллина.

Большинство β -лактамовых антибиотиков нарушают формирование пептидогликанового слоя клеточной стенки бактерий, необратимо связываются с белками, которые участвуют в его образовании [12]. Пенициллины, которые были получены самыми первыми, хорошо ингибируют как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. Из-за быстро развивающейся устойчивости благодаря ферментам, которые разрушают β -лактамовое кольцо, разрабатывались новые производные пенициллина, с пролонгированной устойчивостью. Также были разработаны ингибиторы β -лактамаз, для применения с пенициллинами.

Гликопептиды. Эти антибиотики подавляют синтез клеточной стенки разрушая синтез пептидогликанов. Гликопептиды связываются с D-аланил-D-аланиновой частью боковой цепи пептида пептидогликана предшественника. Первая лекарственная молекула этого класса, которая была выделена в 1953 году – ванкомицин. Этот антибиотик предотвращает связывание этой субъединицы D-аланила с пенициллин-связывающими белками и, следовательно, ингибирует синтез клеточной стенки. Циклосерин – антибиотик, обладающий широким спектром действия, который разрушает синтез пептидогликана. Подавляет фермент аланин рацемазу и D-аланин лигазу. Возникновение лекарственной устойчивости в основном связана с мутацией в белках-мишенях антибиотика.

Фосфомицин – антибиотик, производный фосфоновой кислоты. Фосфомицин нарушает первую стадию цитоплазматического биосинтеза клеточной стенки бактерий, благодаря подавлению фермента UDP-N-ацетилглюкозамин-3-енолпирувилтрансферазы. Лекарственная устойчивость вызывается модификацией белка-мишени или модификацией генов самого антибиотика.

1.2.2. Антибиотики, подавляющие синтез белка

Синтез белка происходит на макромолекулярных структурах, называемых рибосомами. Бактериальные рибосомы и трансляционный механизм представляют собой одну из основных мишеней для антибиотиков в клетке. Таким образом, структурные и биохимические исследования антибиотиков, нацеленных на рибосомы, обеспечивают не только понимание механизма действия и устойчивости антибиотиков, но и понимание фундаментального процесса синтеза белка.

Рибосома представляет собой крупную макромолекулу со сложной асимметричной четвертичной структурой, которая преобразует генетическую информацию, кодируемую в матричной РНК (мРНК), в

полипептидную последовательность, которая включает белки и ферменты клетки. Это преобразование называется трансляцией.

Сама рибосома, была открыта американским клеточным биологом Джорджем Паладе в 1955 году. Он описал её как небольшую частицу в цитоплазме, которая связана с мембраной ЭПС. За открытие структурной органеллы в 1974 году Джордж Паладе и Кристиан Де Дюв получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за то, что обнаружили что рибосомы осуществляют синтез белка в клетках. В 1988 стала известна трёхмерная структура рибосомы.

Для того, чтобы синтезировать белок, рибосома должна быть обеспечена а) последовательностью аминокислотных остатков в полипептиде белковой цепи; б) аминокислотным материалом, из которого следует построить белок; в) энергией. Сама рибосома катализирует сборку аминокислот в пептидные цепи определённой последовательности. Порядок чередования аминокислотных остатков исходит от ДНК, т.е. генома клетки.

Бактериальная рибосома состоит из двух субчастиц – большой, с коэффициентом седиментации 50S и малой – с коэффициентом седиментации 30S (рис. 3). У бактерий и архей субъединица 50S обычно содержит 23S рРНК и 5S рРНК, а субъединица 30S содержит 16S рРНК. Длина малой субъединицы 30S – 1540 нуклеотидов и 21 белок, длина большой субъединицы 50S – 2900 нуклеотидов и 34 белка. Синтез пептидной связи происходит в субъединице 50S в пептидил-трансферазном центре, а распознавание кодонов происходит в сайте декодирования, который находится в малой субъединице.

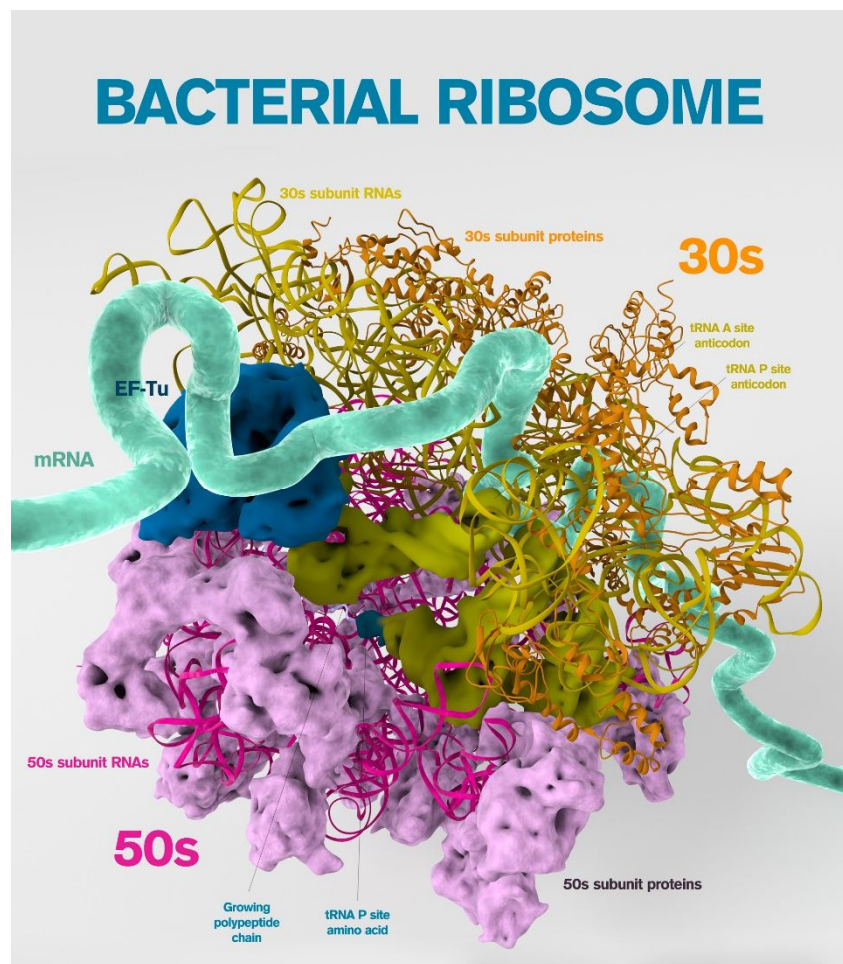


Рисунок 3 – Строение 70S рибосомы. 30S субъединица – жёлтая, 50S субъединица –фиолетовая.

Во время инициации синтеза белка малые и большие субъединицы объединяются и остаются вместе, т.к. отдельные аминокислоты добавляются в растущий пептид в соответствии с информацией, закодированной в мРНК. Разделяются они тогда, когда завершается сам синтез цепочки. Рибосома имеет 4 сайта для связывания РНК: А-, Р-, Е-сайты – нужны для связывания с транспортной РНК, и сайт связывания с мРНК.

Трансляция делится на 3 стадии: 1) инициацию, на которой происходит распознавание рибосомой стартового кодона AUG, кодирующего аминокислоту метионин, и происходит подготовка к началу синтеза. Субъединица 30S управляет инициацией трансляции, связывается

с матрицей мРНК в области, богатой пурином (последовательность Шайна-Далгарно) выше кодона инициации AUG; 2) элонгацию – непосредственный синтез полипептидной цепи и присоединение новых аминокислот. На стадии элонгации синтеза белка субъединица 30S выполняет функцию декодирования, поддерживая кодон-антикодонные взаимодействия, а при прекращении способствует распознаванию стоп-кодонов факторами высвобождения. 3) терминацию – завершение синтеза полипептидной цепочки и её отделение.

Ингибиторы 30S субъединиц

Аминогликозиды. Аминогликозиды – большая группа антибиотиков широкого спектра действия. Представляют собой положительно заряженные молекулы, присоединённые к наружной мембране, которая заряжена отрицательно, что в свою очередь приводят к образованию крупных пор и позволяет антибиотикам проникать внутрь бактерии. Основной целью действия является бактериальная рибосома; для того чтобы попасть в неё, антибиотик должен пройти через цитоплазматическую мембрану, а для этого требуется много энергии и кислорода. Именно из-за этого, аминогликозиды работают в аэробных условиях и имеют низкую активность против анаэробных бактерий. Они также одновременно работают с такими антибиотиками, которые ингибируют синтез клеточной стенки, т.к. это позволяет аминогликозидам проникать в клетки с большим успехом. Подавляют рост грамположительных и грамотрицательных бактерий. В 1944 г. С. Ваксман выделил первый аминогликозидный антибиотик стрептомицин из *Streptomyces griseus*. Неомицин, который продуцируется из *Streptomyces fradiae* был выделен в 1949 году, в 1957 году – канамицин из бактерии *Streptomyces kanamyceticus*, в 1960-х годах – гентамицин, который продуцируется *Micromonospora purpurea* и тобромицин, выделенный из актиномицета *Streptomyces tenebrarius*, в 1980-е годы – амикацин и нетилмицин, а в 1990-х годах – изепамицин.

Тетрациклины. Молекула тетрациклина состоит из четырёх шестичленных ароматических колец, соединённых с несколькими свободными радикалами в положениях 5, 6 и 7. Представляют собой амфотерное соединение с низкой растворимостью. Соли тетрациклина (гидрохлорид) являются довольно стабильными соединениями и имеют кислую реакцию. Выделяют природные (или полусинтетические): тетрациклин, окситетрациклин и синтетические тетрациклины: метациклин, доксициклин, миноциклин, демеклоциклин.

Тетрациклины, такие как тетрациклин, хлортетрациклин, доксициклин или миноциклин, препятствуют связыванию тРНК с аминокислотой. Применяются для лечения мочеполовых инфекций, особенно если есть аллергия на β -лактамы. Побочные эффекты связаны с неизбирательным действием антибиотиков на синтез белка в микробных клетках и в крупных биологических клетках. Изменение рецепторных сайтов на малой субъединице рибосомы и активное выделение антибиотика из клетки бактерии, привели к развитию лекарственной устойчивости.

Ингибиторы 50S субъединиц

Хлорамфеникол. Он был выделен из штамма *Streptomyces venezuelae* в 1949 году, и действует на грамположительной бактерии. Блокирует активность пептидилтрансферазы путём связывания с 23S рРНК субъединицы 50S. Ингибирует синтез белка и предотвращает связывание т-РНК с сайтом А рибосомы.

Макролиды. Известным представителем макролитов является эритромицин, который был выведен в 1949 году из штамма *Saccharopolyspora erythraea*. Эти антибиотики были введены для решения проблемы с устойчивостью к метициллину и широко используются для лечения грамположительных инфекций. Они влияют на раннюю стадию синтеза белка, а их действие аналогичны с действием пенициллина, поэтому его дают если у пациента есть аллергия на пенициллины. Макролиды могут

предотвращать рост новых полипептидных цепей. Кетолиды – производные эритромицина. Так, например, телитромицин является первым кетолидом, использующийся в практике. Благодаря своей улучшенной эффективности связывания с рибосомами, он действует на штаммы, устойчивые к макролидам.

Оксазолидиноны. Оксазолидиноны – соединения, содержащие 2-оксазолидон. Линезолид – представитель нового класса антибиотиков этой группы, который является полностью синтетическим и ингибирует рост грамположительных бактерий. Оксазолидиноны влияют на синтез белка на нескольких стадиях: 1) ингибируют синтез белка, связываясь с РНК 23S субъединицы 50S; 2) подавляют ингибирование 70S и взаимодействуют с пептидил-т-РНК.



Рисунок 4 – Примеры антибиотиков, влияющих на синтез белка

1.2.3. Ингибиторы репликации ДНК

Хинолоны. Класс антибактериальных препаратов широкого спектра действия. Фторхинолоны ингибируют бактериальную ДНК-гиразу, которая расщепляет двухцепочечную ДНК, вводит отрицательные суперспирали и повторно запечатывает нарезанные концы. Это необходимо, чтобы избежать чрезмерного положительного суперскручивания, в момент разделения нити, чтобы обеспечить репликацию или транскрипцию.

Рифампицин. Рифамицины – полусинтетические антибиотики, полученные из *Streptomyces mediterranei*. Они были впервые получены в 1957 году из образца почвы, собранного на берегу Франции. Активны против большинства грамположительные бактерии, некоторых грамотрицательных бактерий и микобактерии. Ингибируют бактериальную ДНК-зависимую РНК-полимеразу, что приводит к прекращению синтеза РНК. Резистентность возникает из-за мутаций в РНК-полимеразе.

Фидаксомицин. Фидаксомицин – макроциклический лактоновый антибиотик, полученный из *Dactylosporangium aurantiacum*. Ингибирует РНК-полимеразу препятствуя образованию открытого комплекса, и тем самым, останавливает транскрипцию. Безопасен по отношению к нормальной микрофлоры.

Нитромидазолы. Первый нитромидазол – метронидазол активен против различных грамположительных и грамотрицательных бактерий. Активируется либо в цитоплазме бактерий, либо в специфических органеллах. Ингибирует синтез белка, взаимодействуя с ДНК и вызывая потерю спиральной структуры ДНК и разрыв цепи. Он цитотоксичен для анаэробных бактерий, но механизм действия до конца не изучен.

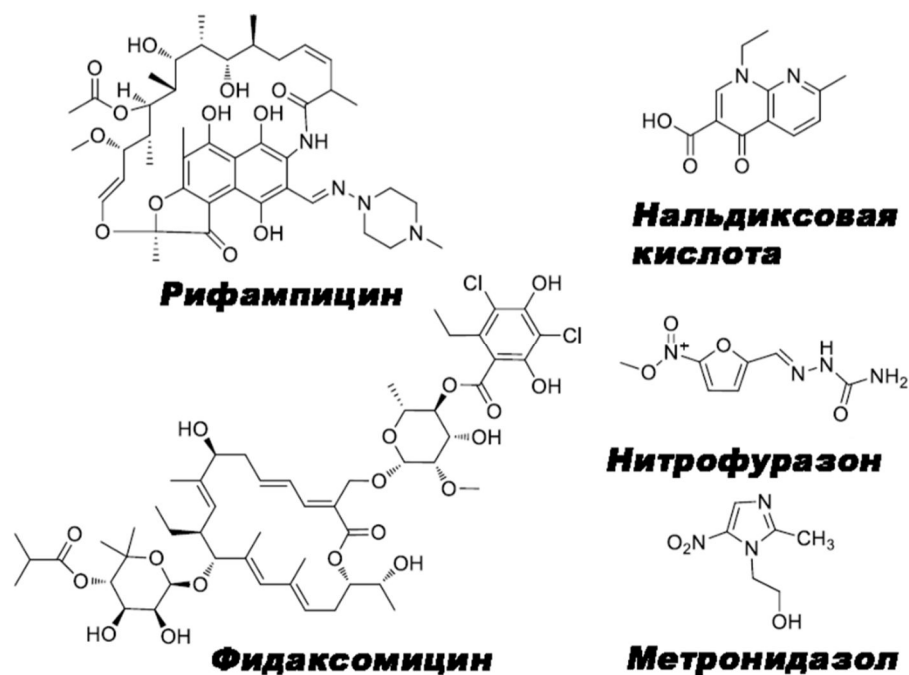


Рисунок 5 – Примеры антибиотиков, ингибирующих репликацию ДНК

1.2.4. Антибиотики, ингибирующие метаболизм фолиевой кислоты

Сульфонамиды и триметоприм. Каждый из этих препаратов (рис. 6) подавляет разные стадии метаболизма фолиевой кислоты. Пронтозил – самый первый сульфаниламид (стрептоцид), был открыт в 1939 году, но применялся ещё с начала 1900-х годов в текстильном и кожевенном производстве; до некоторых пор никто не проверял его на антимикробные свойства. Активны по отношению большинства грамотрицательных и грамположительных бактерий, но воздействие на человека связаны с серьёзными побочными эффектами. Устойчивость к сульфаниламидам обеспечивается благодаря мутациям в дигидроптероатсинтетазе.

Такие антибиотики, как триметоприм, действуют на поздней стадии синтеза фолиевой кислоты и ингибируют фермент дигидрофолатредуктазу.

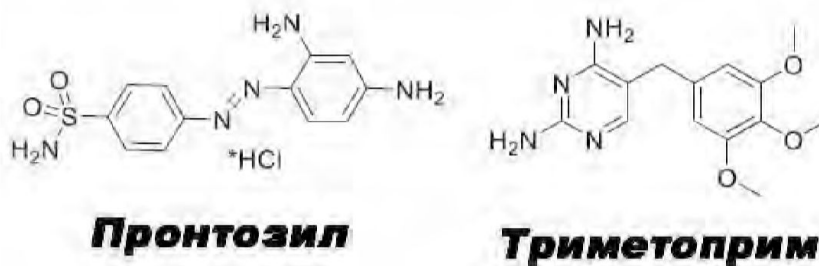


Рисунок 6 – Примеры антибиотиков, ингибирующие метаболизм фолиевой кислоты

1.3. Механизм устойчивости к антибиотикам

Для начала, необходимо понять, чем стойкость отличается от устойчивости. Если бактерия устойчива к конкретному антибиотику, то и все её дочерние клетки тоже будут устойчивыми. Стойкость же, обусловлена тем, что некоторые клетки в популяции бактерий могут находиться в стационарной фазе роста, поэтому антибактериальные препараты не смогут повлиять на клетки, которые не делятся и не растут.

Бактерии – генетически пластичные организмы, которые реагируют на многочисленные угрозы окружающей среды, включая присутствие молекул антибиотиков, которые могут поставить под угрозу их существование. Они развили очень древние механизмы защиты, чтобы противостоять воздействию молекул антибиотиков: выделяют антибиотические вещества, меняют содержание pH и кислорода и т.д.

Устойчивость к антимикробным препаратам происходит либо благодаря механизму мутации в генах, которые влияют на активность лекарственного препарата, либо благодаря приобретению чужеродной ДНК посредством горизонтального переноса.

Биохимические механизмы резистентности:

- Изменение структуры мембраны. Нарушение проницаемости микробной клеточной мембраны с помощью изменения химического

состава мембраны, что приводит к снижению её проницаемости для антибиотиков и других химических соединений.

- Эффлюкс – выведение антибиотика из бактериальной клетки. Антибиотик, проникший в клетку микроорганизма, активно выводится набором белков, образующих трансмембранные помпы, из-за чего снижается концентрация лекарства и бактерия не погибает.
- Бактериальные ферменты, которые могут инактивировать антибиотики. Бактерии синтезируют пенициллиназу, которая расщепляет антибиотики.
- Модификация состава или структуры мишени в бактерии может препятствовать взаимодействию антибиотика с мишенью. Явление вызвано появлением спонтанных генетических мутаций в кодирующем гене или наличие генов в его продуктах, которые модифицируют молекулу-мишень.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

В данной работе объектом исследования является молекула N-[(пиридин-4-карбониламино) карбамотиоил] фуран-2-карбоксамид, которая была выявлена при помощи искусственного интеллекта. Молекула подавляет синтез белка на бактериальной рибосоме, и при этом не затрагивает рибосомы эукариотических клеток. Молекулярная формула – $C_{12}H_{19}N_4O_3S$, Молекулярный вес - 290,3 г/моль (рис.7).

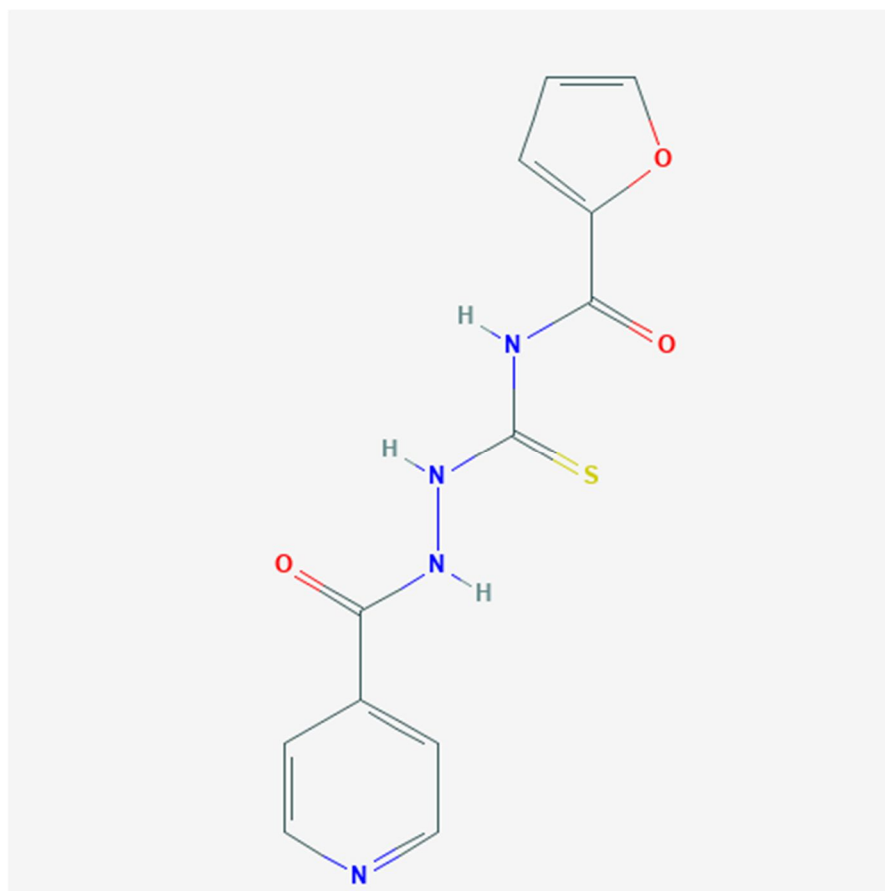


Рисунок 7 – Химическая структура молекулы N-[(пиридин-4-карбониламино) карбамотиоил] фуран-2-карбоксамида

2.2. Питательные среды и условия стерилизации

Поверхностное культивирование тестовых штаммов проводили на среде Мюллера-Хинтона. Состав питательной среды указан в таблице 1.

Таблица 1 – Состав питательной среды Мюллера-Хинтона

Компонент питательной среды	Концентрация компонента г/л
Мясной бульон	300,00
Гидролизат казеина	15,50
Крахмал	1,50
Агар-агар	17,00
Значение pH (при 25°C) – $7,3 \pm 0,2$	

Стерилизацию питательной среды проводили в автоклаве при давлении 1,1 атм. и температуре 121°C в течение 15 минут. После чего перемешали среду и разлили в стерильные чашки Петри.

Штаммы бактерий инкубировали при температуре 37°C, длительность поверхностного культивирования исследуемых микроорганизмов составил 24 часа с момента посева.

2.3. Тестовые штаммы для определения антибиотической активности

Для скрининга исследуемой молекулы использовали музейные штаммы микроорганизмов:

Escherichia coli №25922 ATCC

Pseudomonas aeruginosa №27853 ATCC;

Klebsiella pneumoniae №181210171-2;

Staphylococcus aureus №206 ATCC USA;

Candida albicans №181210169-1.

В качестве тестовых объектов для определения антимикробной активности исследуемой молекулы использовали различные клинические штаммы бактерий – возбудителей нозокомиальных инфекций из города Оренбург, представленные ниже:

Escherichia coli;

Morganella morganii;

Pseudomonas mendocina;

Klebsiella oxytoca;

Pseudomonas putida;

Pseudomonas aeruginosa;

Citrobacter koseri;

Enterobacter aerogenes.

2.4 Определение антибиотической чувствительности

Для определения антибиотической активности использовали диско-диффузионный метод, который широко применяется для определения устойчивости к противомикробным препаратам. Для проведения анализа бактериальную суспензию, содержащую интересующий изолят, разбавляют до определенной степени мутности, затем равномерно наносят на питательную среду. После чего специальные диски пропитывают стандартной концентрацией антибиотика и слегка придавливая равномерно помещают на поверхность питательной среды. Тестируемый антибиотик через некоторое время начинает распространяться вокруг дисков, создавая градиент концентрации антибиотика на питательной среде, при котором при котором самая высокая концентрация наблюдается на границе диска, а снижается концентрация при отдалении от диска. После инкубации в

течение 24 часов в чашке Петри наблюдается рост бактерий, при этом чем более чувствителен изолят к антибиотику, тем больше радиус круга вокруг диска будет чистым, то есть на нем будет отсутствовать рост бактерий (рис. 8).



Рисунок 8 – Определение антибиотической чувствительности диско-диффузионным методом

Область вокруг диска, пропитанного антибиотиком, на которой отсутствует рост бактерий называется зоной ингибирования. Эта зона показывает минимальную концентрацию антибиотика, достаточную для предотвращения роста бактерий. Затем эту зону измеряют в миллиметрах и с помощью стандартной таблицы определяют восприимчивость или резистивность изолята. Данный метод является качественным и с помощью него нельзя определить количественные характеристики, такие как минимальную подавляющую концентрацию (МПК).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Целью данной работы было изучить новую молекулу, обладающую антибактериальными свойствами. Не так давно антибиотики произвели революцию в медицине и облегчили современный образ жизни людей. Кроме их важнейшей роли в медицине, антибиотики также используются во множестве сфер жизни человека: ускорение роста домашнего скота, защита строительных материалов от различных патогенных организмов, лечение растений и т.д. Однако частое использование антибиотиков снижает их эффективность из-за увеличения устойчивости к ним различных микроорганизмов.

Антибиотики нацелены на подавление жизненно важных клеточных процессов, замедляя рост и убивая эти клетки. Но если бактерии подвергаются воздействию маленькой дозы антибиотиков, которой не хватает для уничтожения всех микроорганизмов в популяции (минимальная бактерицидная концентрация), то они могут мутировать и приспособиться к воздействию антибиотиков, обрести антибиотикорезистентность. Такие генетические мутации могут возникать в результате появления плазмиды, которая в дальнейшем кодирует ген устойчивости, а также в результате мутаций в бактериальной хромосоме.

В настоящее время устойчивых к антибиотикам бактерий становится все больше, в то время как открытие новых антибиотиков является достаточно редким событием. Большая часть используемых в современном мире антибиотиков были открыты в середине XX века. Таким образом, на данный момент в мире имеется ограниченное количество антибиотиков для борьбы с устойчивыми бактериями.

Учитывая важность антибиотиков для современной медицины, ученые ищут способы обнаружения и создания новых препаратов, которые имеют антибактерицидную активность, а также изучают все аспекты биорезистентности.

3.1. Скрининг бактериальных штаммов

Создание лекарственных препаратов начинается с определения белка-мишени, с которым связано то или иное заболевание. Для того, чтобы подавлять симптомы болезни нужно воздействовать на эту мишень путём повышения или понижения его активности.

Как только определяется мишень, идёт выбор молекулы, которая будет действовать на интересующий нас белок. Раньше этот процесс занимал довольно много времени, для этой цели приходилось проводить скрининг лабораторным путём, но сейчас этот этап проходит с применением компьютерных технологий. С помощью различных алгоритмов, скринируется взаимодействие белка-мишени и большого ряда различных химических соединений. Выбор осуществляется по оцениванию способности вещества воздействовать на мишень в необходимом месте и с определенной силой.

После отбора наиболее эффективных молекул проводят тестовые скрининг на различных лабораторных образцах. В результате скрининга определяются наиболее перспективные соединения, после чего их отправляют на доклинические и клинические исследования.

В данной работе лабораторный скрининг проводили на музейных штаммах микроорганизмов: *E. Coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans* (таблица 2). В результате исследований обнаружили что молекула N-[(пиридин-4-карбониламино) карбамотиоил] фуран-2-карбоксамида ингибировала рост грамотрицательных тестовых бактерий *K. pneumoniae*, при этом остальные тестовые штаммы проявляли антибиотикорезистентность к данной молекуле. Таким образом в связи с активностью в отношении штамма *K. pneumoniae*, молекула была отобрана как перспективная.

Таблица 2 – Результаты скрининга на музейных штаммах

Наименование препарата	<i>Escherichia coli</i> №25922 ATCC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> №27853 ATCC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №181210171- 2	<i>Staphylococcus aureus</i> №206 ATCC USA	<i>Candida albicans</i> №181210169- 1
8019-9854	-	-	±	-	-

3.2. Исследование на клинических штаммах

Для исследования были взяты 29 условно-патогенных штаммов, выделенных от пациентов с различными формами бактериальных инфекций, для сравнения эффективности выбранной молекулы также провели диффузионный анализ используя антибиотики с известными механизмами действия (таблица 3).

В результате исследований можно сказать, что молекула 8019-9854 обладает антибиотической активностью узкого спектра действия, в частности проявляет активность против всех грамотрицательных штаммов бактерий *E. coli* и *Ps. aeruginosa*, также проявляет среднюю активность против штаммов *K. oxytoca*, *C. koseri*, *E. aerogenes*, и слабую активность против *M. morganii* и *P. mendocina*. По сравнению с тетрациклином, который сохранил активность в отношении всех клинических штаммов, наша молекула проявляла большую антибактериальную активность только на клинических штаммах 20K *E. coli* и 21K *E. coli*.

Таблица 3 – Зоны задержки роста клинических штаммов под действием антибиотиков

Клинические штаммы бактерий – возбудителей нозокомиальных инфекций (г. Оренбург)	Ампицилин 10 мкг AMP10	Амоксицилин 10 мкг AMX10	Цефотаксим 30 мкг CTX30	Имипенем 10 мкг IMI10	Меропенем 10 мкг MNP10	Азтреонам 30 мкг AT30	Ципрофлоксацин 5 мкг CIP5	Левифлоксацин 5 мкг LE5	Амикацин 30 мкг AK30	Амикацин 30 мкг AK30	Гентамицин 10 мкг GEN10	Доксициклина гидрохлорид 30 мкг DO30	Фосфомидин 200 мкг FO200	Нитроксилин 30 мкг NO30	Тетрацилин 30 мкг TE30	8019 – 9854 100 мкг
15K <i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	16	19	9	-	7	1	-	11	11	-	7	6
16K <i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	11	16	12	-	7	1	-	12	13	-	11	-
17K <i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	18	22	10	-	7	12	8	10	24	22	9	7
20K <i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	16	20	11	-	7	10	12	9	24	19	9	14
21K <i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	14	18	12	-	7	15	11	7	23	20	8	15
23K <i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	23	14	13	6	7	10	11	14	23	20	18	13
24K <i>Escherichia coli</i>	13	11	23	18	16	22	19	21	19	12	12	18	22	20	20	14
3ГC <i>Morganella morganii</i>	-	-	8	-	13	14	-	16	-	18	18	19	8	22	17	15
4ГC <i>Escherichia coli</i>	17	12	22	24	16	15	22	20	17	18	18	14	19	14	13	7
8ГC <i>Escherichia coli</i>	12	7	20	24	30	26	-	27	24	16	16	25	41	17	28	11
9ГC <i>Pseudomonas mendocina</i>	-	-	8	-	13	14	-	16	-	19	16	10	8	22	17	6

Продолжение таблицы 3

Клинические штаммы бактерий – возбудителей нозокомиальных инфекций (г. Оренбург)	Ампициллин 10 мкг AMP10	Амоксициллин 10 мкг AMX10	Цефотаксим 30 мкг CTH30	Имипенем 10 мкг IMI10	Меропенем 10 мкг MNP10	Азтреонам 30 мкг AT30	Ципрофлоксацин 5 мкг CIP5	Левифлоксацин 5 мкг LE5	Амикацин 30 мкг АК30	Амикацин 30 мкг АК30	Гентамицин 10 мкг GEN10	Доксициклина гидрохлорид 30 мкг DO30	Фосфомидин 200 мкг FO200	Нитроксалин 30 мкг NO30	Тетрациклин 30 мкг TE30	8019 – 9854 100 мкг
10ГС <i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-	14	19	-	-	-	10	6	6	15	-	6	6
12ГС <i>Escherichia coli</i>	18	12	-	-	10	9	14	8	-	14	-	-	17	-	12	6
13ГС <i>Escherichia coli</i>	17	14	-	-	9	-	16	6	-	14	-	7	28	7	12	7
14ГС <i>Pseudomonas mendocina</i>	-	-	-	-	13	9	13	6	-	12	-	8	17	-	8	-
15ГС <i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	16	20	12	6	7	18	10	14	22	15	19	15
19ГС <i>Pseudomonas mendocina</i>	10	12	20	21	17	20	12	19	12	18	-	15	22	9	15	7
196К/П <i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	11	11	10	6	-	12	-	8	12	-	8	-
294К/П <i>Pseudomonas mendocina</i>	-	-	-	-	15	15	-	3	40	19	19	38	-	8	30	-
22К/П <i>Morganella morganii</i>	11	-	-	-	-	-	8	25	25	20	19	21	16	9	2	-

Продолжение таблицы 3

Клинические штаммы бактерий – возбудителей нозокомиальных инфекций (г. Оренбург)	Ампициллин 10 мкг AMP10	Амоксициллин 10 мкг AMX10	Цефотаксим 30 мкг CTH30	Имипенем 10 мкг IMI10	Меропенем 10 мкг MNP10	Азтреонам 30 мкг AT30	Ципрофлоксацин 5 мкг CIP5	Левифлоксацин 5 мкг LE5	Амикацин 30 мкг АК30	Амикацин 30 мкг АК30	Гентамицин 10 мкг GEN10	Доксициклина гидрохлорид 30 мкг DO30	Фосфомидин 200 мкг FO200	Нитроксалин 30 мкг NO30	Тетрациклин 30 мкг TE30	8019 – 9854 100 мкг
163 <i>Morganella morganii</i>	-	-	-	-	-	-	7	37	37	28	26	20	15	15	27	-
48K/M <i>Klebsiella oxytoca</i>	17	10	18	22	15	17	24	20	20	15	12	16	24	20	19	7
29K/П <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	15	18	-	11	14	14	-	12	29	-	12	14
38K/M <i>Citrobacter koseri</i>	17	9	19	22	15	20	23	21	19	17	13	12	17	15	18	6
41K/П <i>Enterobacter aerogenes</i>	17	10	17	25	14	21	16	21	18	15	14	12	16	15	17	6
32K/M <i>Klebsiella oxytoca</i>	18	9	22	24	14	18	27	22	18	17	15	14	17	15	19	7
36K/П <i>Morganella morganii</i>	16	11	16	23	13	21	20	19	17	8	12	13	17	17	20	6
42K/П <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	11	22	25	14	22	25	22	21	17	14	14	17	20	17	7
31K/M <i>Escherichia coli</i>	14	8	17	21	19	20	20	20	19	17	12	13	16	16	17	7

3.3. Активность молекулы на штаммах пробиотических бактерий

Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при введении в организм в адекватных количествах приносят пользу здоровью хозяина. Данное определение было дано в 2001 году Продовольственной и сельскохозяйственной организацией объединённых наций и Всемирной организацией здравоохранения. Количество видов микроорганизмов, которые могут проявлять пробиотические свойства огромно. Спрос на них растёт во всём мире из-за постоянных публикаций в области исследования их потенциальной пользы для здоровья. Чаще всего они применяются в продуктах питания и кормовых добавках. Если говорить о питании, то наиболее важным штаммом являются молочнокислые бактерии, из них чаще всего используют те, что относятся к родам *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Bifidobacterium*. Основные виды пользы пробиотиков для здоровья, включают улучшение микрофлоры желудочно-кишечного тракта, повышение иммунной системы, снижение уровня холестерина, лечение синдрома раздражённого кишечника и улучшение метаболизма лактозы (Saarela M. и др; Nagpal R. и др. 2012).

Молочнокислые бактерии являются грамположительными, некоторые виды способны молочную кислоту в качестве основного конечного продукта.

В данной работе использовались различные штаммы пробиотических бактерий состоящие из *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Для определения активности молекулы N-[(пиридин-4-карбониламино) карбамотиоил] фуран-2-карбоксамид на пробиотические штаммы использовали диско-диффузионный метод, для этого были отобраны 20 штаммов пробиотических бактерий, состоящих из родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. (рис. 9 – 12)

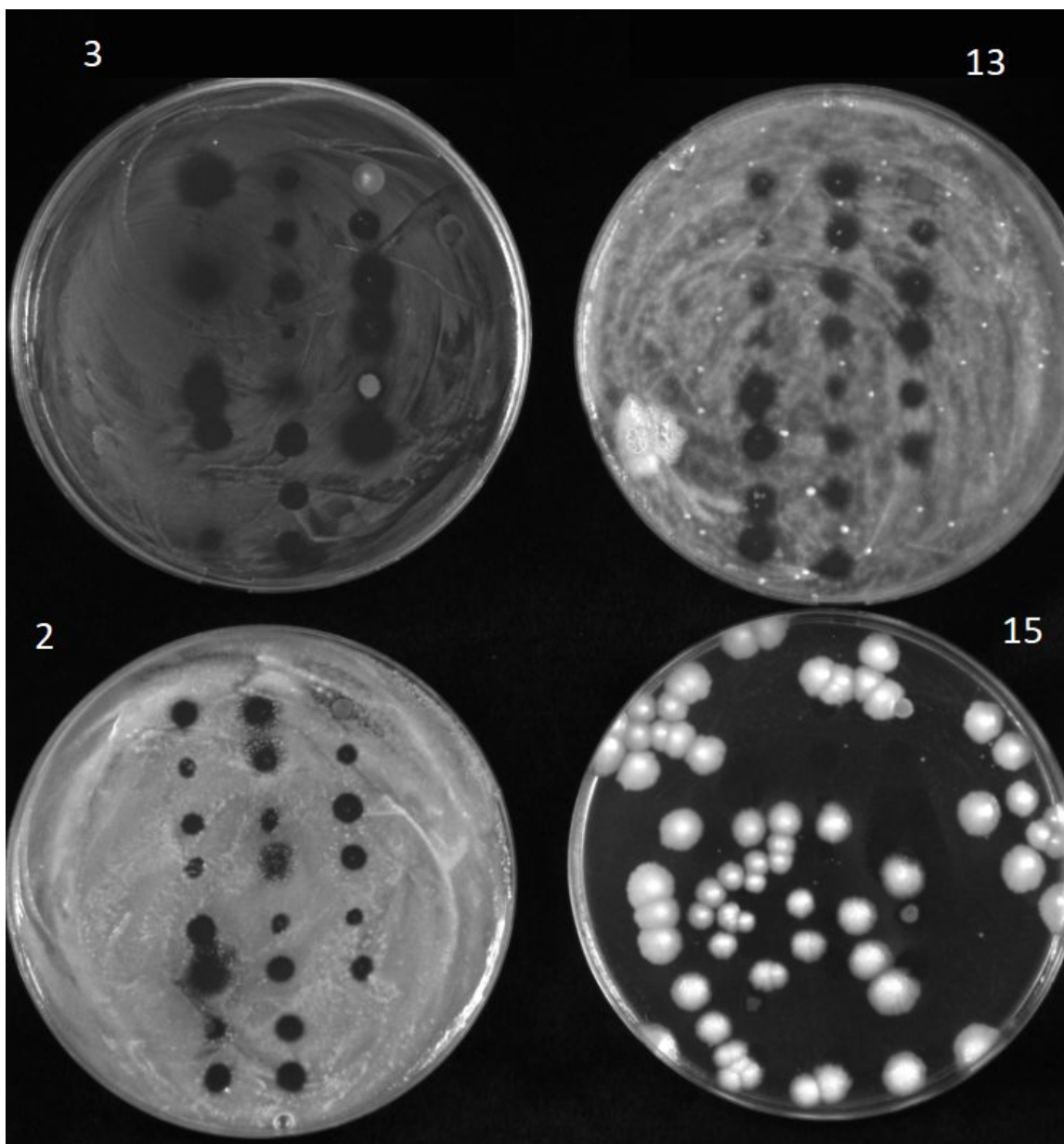


Рисунок 9 – Чашки Петри с инокулированными штаммами 1 группы пробиотических бактерий на среде Мюллера-Хинтона с дисками, пропитанными антибиотиком 8019-9854.

Цифрами на рис. 9 указаны штаммы пробиотических бактерий, которые были инокулированы в чашке Петри: 2 – Штамм 2; 3 – Штамм 3; 13 – Штамм 13; 15 – Штамм 15.

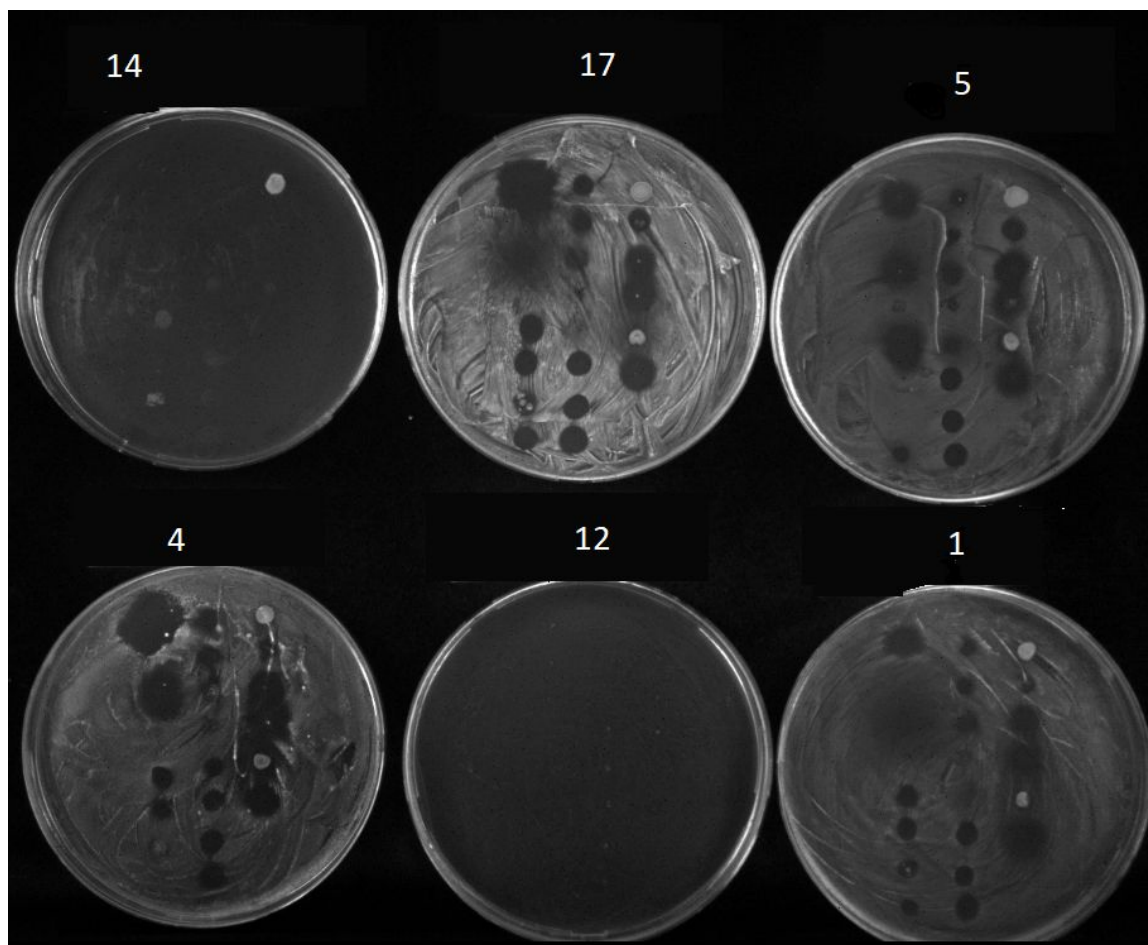


Рисунок 10 – Чашки Петри с инокулированными штаммами 2 группы пробиотических бактерий на среде Мюллера-Хинтона с дисками, пропитанными антибиотиком 8019-9854

Цифрами на рис. 10 указаны штаммы пробиотических бактерий, которые были инокулированы в чашке Петри: 1 – Штамм 1; 4 – Штамм 4; 5 – Штамм 5; 12 – Штамм 12; 14 – Штамм 14; 17 – Штамм 17.

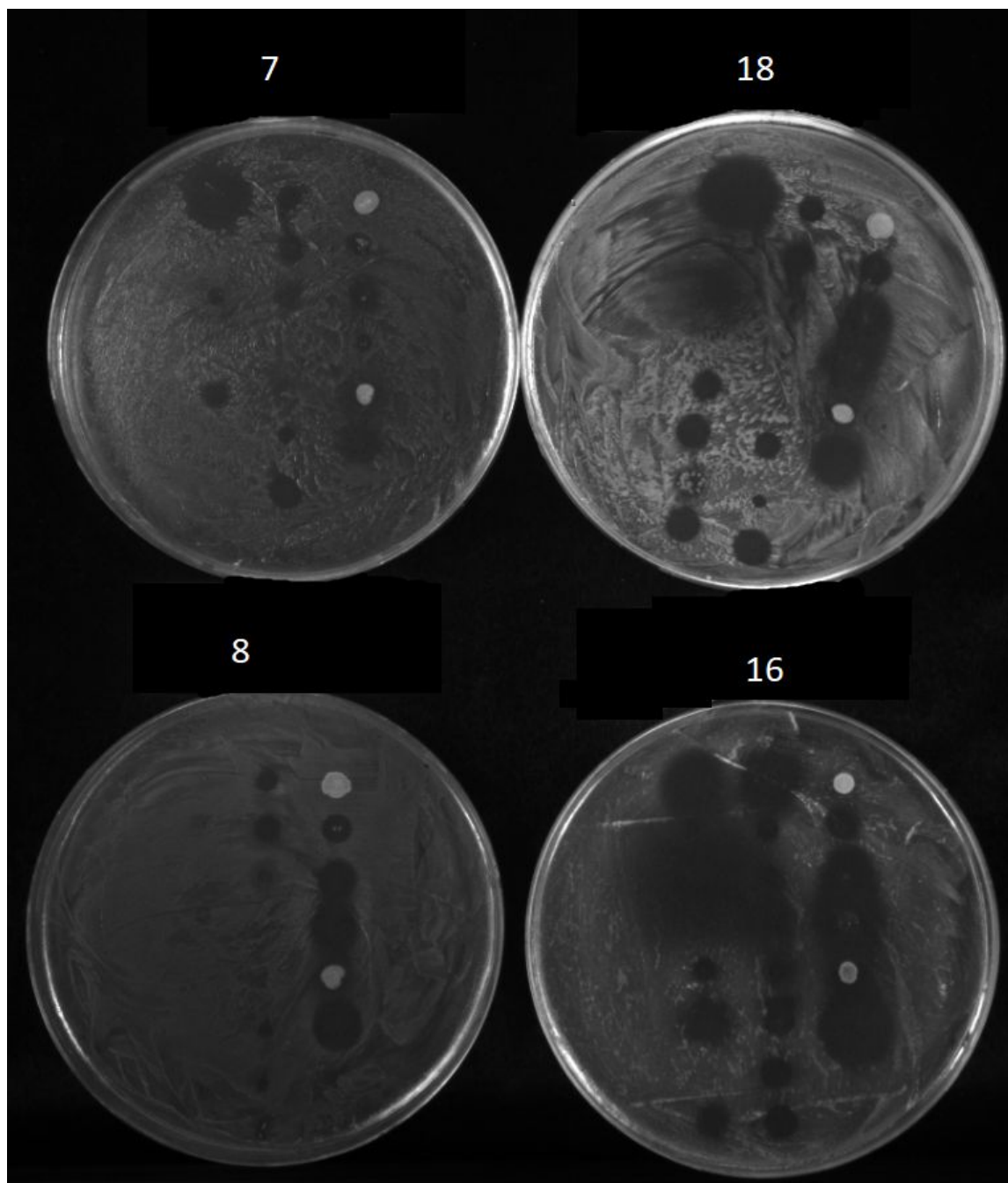


Рисунок 11 – Чашки Петри с инокулированными штаммами 3 группы пробиотических бактерий на среде Мюллера-Хинтона с дисками, пропитанными антибиотиком 8019-9854

Цифрами на рис. 11 указаны штаммы пробиотических бактерий, которые были инокулированы в чашке Петри: 7 – Штамм 7; 8 – Штамм 8; 16 – Штамм 16; 18 – Штамм 18

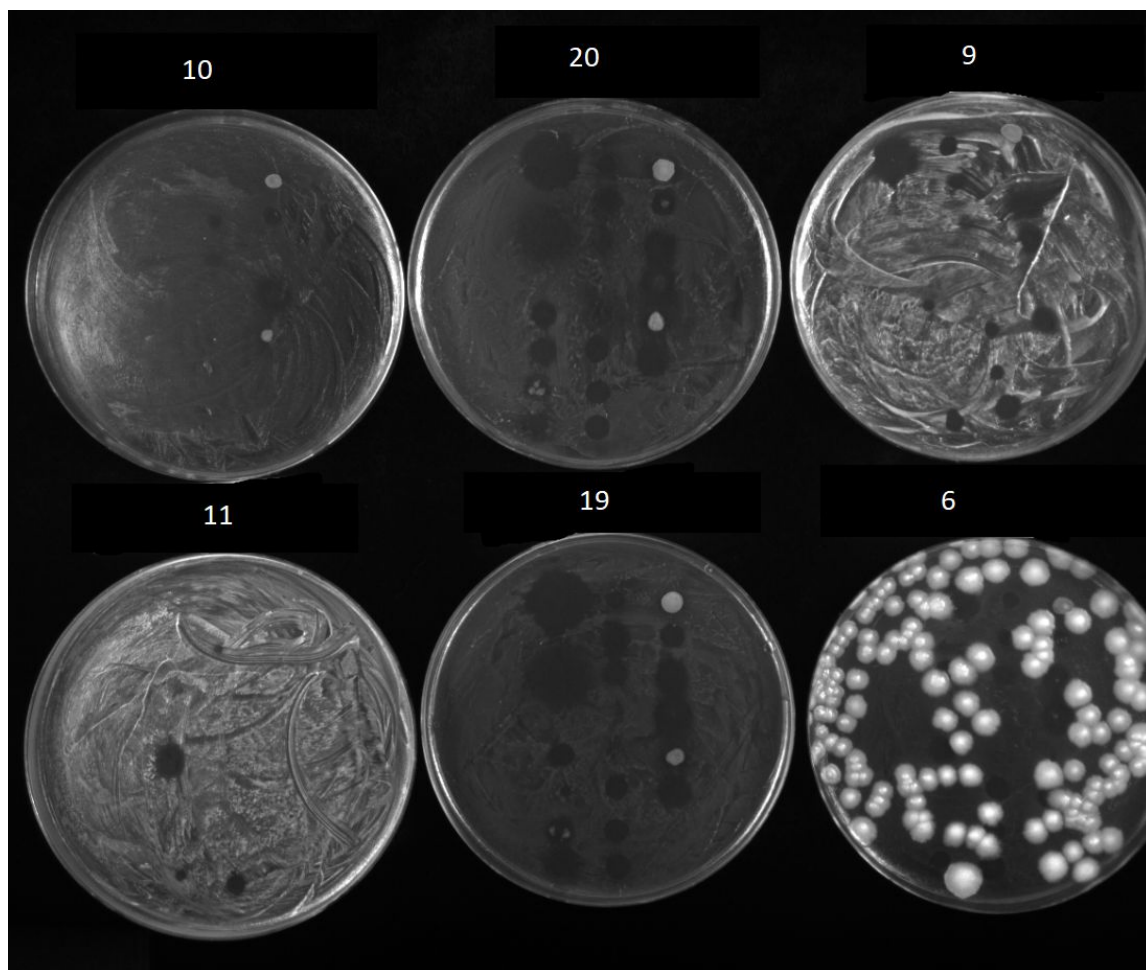


Рисунок 12 – Чашки Петри с инокулированными штаммами 4 группы пробиотических бактерий на среде Мюллера – Хинтона с дисками, пропитанными антибиотиком 8019-9854

Цифрами на рис. 12 указаны штаммы пробиотических бактерий, которые были инокулированы в чашке Петри: 6 – Штамм 6; 9 – Штамм 9; 10 – Штамм 10; 11 – Штамм 11; 19 – Штамм 19; 20 – Штамм 20.

По результатам диско-диффузионного анализа была составлена антибиотикограмма, представленная в таблице 4. Проанализировав результаты, можно заметить, что большинство штаммов пробиотиков умеренно резистентные к исследуемой молекуле, а часть из них и вовсе являются устойчивыми.

Таблица 4 - Антибиотикограмма для пробиотических бактерий

Препарат	Штаммы пробиотических бактерий																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	16	17	18	19	20	
8019-9854	+	±	±	±	±	±	±	±	-	-	-	±	±	±	-	±	-	±	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антибиотики всегда считались чудесным открытием 20-го века. Но в связи с массовым использованием, бактерии приобрели механизмы, которые привели к устойчивости бактерий к противомикробным препаратам. Механизмы биохимической резистентности, применяемые бактериями, включают в себя: инактивация антибиотиков, модификация мишени, изменённая проницаемость и «обход» метаболического пути. Поэтому одним из способов решения проблемы – это поиск новых эффективных модифицированных антибиотиков, определяя механизмы действия новых соединений. Очень важно, чтобы ничего не препятствовало поиску новых антибактериальных препаратов.

В данной работе был произведён мониторинг чувствительности к антимикробным препаратам перспективной молекулы N-[(пиридин-4-карбониламино) карбамотиоил] фуран-2-карбоксамид, которая обладает узким спектром антибактериальной активности по отношению к грамотрицательным бактериям, а в отношении грамположительных пробиотических штаммов антимикробную активность проявляли слабо.

ВЫВОДЫ

1. В данной работе был произведён скрининг молекулы N-[(пиридин-4-карбониламино) карбамотиоил] фуран-2-карбоксамида на музейных штаммах микроорганизмов, который показал, что молекула является перспективной для дальнейших исследований на антимикробной активности препарата в отношении клинических тест-штаммов микроорганизмов.

2. Выбранное по результатам скрининга вещество не проявляло антимикробной активности в отношении клинических штаммов *M. morganii* и *P. mendocina*, в то время как зона ингибирования наблюдалась у штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa*.

3. Было произведено определение антимикробной активности в отношении 20 различных штаммов пробиотических бактерий, которые показали, что большинство пробиотиков имеют умеренную резистентность к исследуемому препарату, и это говорит о том, что данный препарат может быть рекомендован для углублённого лабораторного и доклинического изучения в качестве нового средства антимикробного действия.

4. Были проведены сравнения антимикробных характеристик молекулы N-[(пиридин-4-карбониламино) карбамотиоил] фуран-2-карбоксамида относительно антибиотиков тетрациклиновой группы, в ходе которых выяснили, что данная молекула, проявляет меньшую антимикробную активность, чем антибиотики тетрациклиновой группы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильев Д.А. Методы общей бактериологии / Д.А. Васильев, А.А. Щербаков Л.В. Карпунина С.Н. Золотухин, И.Г. Швиденко. — Ульянов.: Из-во Ульяновской ГСХА. — 1998. — 222 с.
2. Воробьёв А.А., Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. 2-е изд. / А. А. Воробьёв. — М.: Медицинское информационное агентство. — 2012. — 704 с.
3. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. — М.: Academia. 2003. — 462 с.
4. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. 4-е изд. /А. И. Коротяев, С.А. Бабичев.— М.: СпецЛит, —2008. —760 с.
5. Лабинская А.С. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций / А. С. Лабинская, Н.Н.Костюкова, С.М.Иванова. — М.: Из-во БИНОМ, — 2012. 1152 с.
6. Спирин А. С. Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка: Учеб. для студентов биол. спец. вузов. —М.: Высш. шк., 1986. -303 с; ил.
7. Авдеев, В.Г. Пробиотики и пребиотики в лечении заболеваний желудочнокишечного тракта / В.Г. Авдеев // Клин. фармак. и терап. журнал. — 2006. — Т. 42. — № 15. — С. 36-40.
8. Ефременкова О.В., Габриэлян Н. И., Маланичева И.А., Ефименко Т.А., Сумарукова И.Г., Глухова А.А., Бойкова Ю.В., Рогожин Е.А., Королев А.М.,
9. Козлов Р.С., Дехнич А.В. Цефдиторен пивоксил: клиникофармакологическая и микробиологическая характеристика // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т. 16, № 2. – С. 111–129.

10. Козлов С.Н., Страчунский Л. С. Современная антимикробная химиотерапия. М.: Медицинское информационное агентство, 2009. – 448 с.
11. Коршун В.А., Драбкина И.В. Антимикробные свойства амикумацина А // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – Т. 62, № 1-2. – С. 16–19
12. Остерман И. А. Поиск и изучение новых антибиотиков ингибиторов синтеза белка: дис. док. хим. наук: 02.00.10, 03.01.03 / Остерман Илья Андреевич — М., 2018. — 291 с.
13. Петрова М.А., Горленко Ж.М., Соина В.С., Миндлин С.З. Изучение ассоциации генов *strA-strB* с плазмидами и транспозонами у современных и древних штаммов бактерий // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 9. – С. 1281–1286.
14. Швец К. Ю. Изучение антимикробной активности новых антибактериальных соединений в отношении условно-патогенных микроорганизмов / К.Ю. Швец, Ал.Х. Баймиев, А.Р. Мавзютов, А.Х. Баймиев // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2019. – №3. – С. 7.
15. Amunts A., Brown A., Toots J., Scheres S.H.W., Ramakrishnan V. Ribosome. The structure of the human mitochondrial ribosome // Science. 2015. Т. 348. № 6230. — С. 95-98.
16. Arenz S., Juette M.F., Graf M., Nguyen F., Huter P., Polikanov Y.S., Blanchard S.C., Wilson D.N. Structures of the orthosomycin antibiotics avilamycin and evernimicin in complex with the bacterial 70S ribosome // Proc Natl Acad Sci U S A. 2016. Т. 113. № 27. — С. 7527-32.
17. Arenz S., Ramu H., Gupta P., Berninghausen O., Beckmann R., Vazquez-Laslop N., Mankin A.S., Wilson D.N. Molecular basis for erythromycin-dependent ribosome stalling during translation of the ErmBL leader peptide // Nat Commun. 2014. Т. 5. — С. 3501. 20
18. Arenz S., Wilson D.N. Bacterial Protein Synthesis as a Target for Antibiotic Inhibition // Cold Spring Harb Perspect Med. 2016. Т. 6. № 9.

19. Ben-Shem A., Garreau de Loubresse N., Melnikov S., Jenner L., Yusupova G., Yusupov M. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution // *Science*. 2011. T. 334. № 6062. — C. 1524-9.
20. Borovinskaya M.A., Pai R.D., Zhang W., Schuwirth B.S., Holton J.M., Hirokawa G., Kaji H., Kaji A., Cate J.H. Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling // *Nat Struct Mol Biol*. 2007. T. 14. № 8. — C. 727-32.
21. Bradford P.A., Jones C.H. Tetracyclines // *Antibiotic Discovery and Development*, Vols 1 and 2. 2012. — C. 147-179. 2.
22. Brandi L., Fabbretti A., Pon C.L., Dahlberg A.E., Gualerzi C.O. Initiation of protein synthesis: a target for antimicrobials // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2008. T. 12. № 5. — C. 519-534. 3
23. Bulkley D., Innis C.A., Blaha G., Steitz T.A. Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. T. 107. № 40. — C. 17158-63.
24. Demain A.L., Sanchez S. The Need for New Antibiotics // *Antibiotics: Current Innovations and Future Trends*. 2015. — C. 65-8
25. Kaberdina A.C., Szaflarski W., Nierhaus K.H., Moll I. An unexpected type of ribosomes induced by kasugamycin: a look into ancestral times of protein synthesis? // *Mol Cell*. 2009. T. 33. № 2. — C. 227-36.
26. Kalia V., Miglani R., Purnapatre K.P., Mathur T., Singhal S., Khan S., Voleti S.R., Upadhyay D.J., Saini K.S., Rattan A., Raj V.S. Mode of action of Ranbezolid against staphylococci and structural modeling studies of its interaction with ribosomes // *Antimicrob Agents Chemother*. 2009. T. 53. № 4. — C. 1427-33.
27. Kannan K., Kanabar P., Schryer D., Florin T., Oh E., Bahroos N., Tenson T., Weissman J.S., Mankin A.S. The general mode of translation inhibition by

macrolide antibiotics // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014. T. 111. № 45. — C. 15958-63.

28. Kannan K., Mankin A.S. Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action // *Ann N Y Acad Sci*. 2011. T. 1241. — C. 33-47.

29. Kannan K., Vazquez-Laslop N., Mankin A.S. Selective protein synthesis by ribosomes with a drugobstructed exit tunnel // *Cell*. 2012. T. 151. № 3. — C. 508-20.

30. Kehrenberg C., Schwarz S., Jacobsen L., Hansen L.H., Vester B. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503 // *Mol Microbiol*. 2005. T. 57. № 4. — C. 1064-73.

31. Kirillov S.V., Porse B.T., Garrett R.A. Peptidyl transferase antibiotics perturb the relative positioning of the 3'-terminal adenosine of P/P'-site-bound tRNA and 23S rRNA in the ribosome // *RNA*. 1999. T. 5. № 8. — C. 1003-13

32. Kitagawa M., Ara T., Arifuzzaman M., Ioka-Nakamichi T., Inamoto E., Toyonaga H., Mori H. Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research // *DNA Res*. 2005. T. 12. № 5. — C. 291-9.

33. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // *Cell*. 2007. T. 130. № 5. — C. 797-810.

34. Konevega A.L., Fischer N., Semenov Y.P., Stark H., Wintermeyer W., Rodnina M.V. Spontaneous reverse movement of mRNA-bound tRNA through the ribosome // *Nat Struct Mol Biol*. 2007. T. 14. № 4. — C. 318-24.

35. Kumar A., Ellis P, Arabi Y., Roberts D., Light B., Parrillo J.E., Dodek P., Wood G., Kumar A., Simon D., Peters C., Ahsan M., Chateau D. Cooperative Antimicrobial Therapy of Septic Shock Database Research Group. Initiation of in

appropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septicshock. *Chest*. 2009. 136 (5): 1237-1248.

36. Kuti J.L. Optimizing antimicrobial pharmacodynamics: a guide for your stewardship program. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2016. 27(5): 615-624.

37. Osterman I.A., Prokhorova I.V., Sysoev V.O., Boykova Y.V., Efremenkova O.V., Svetlov M.S., Kolb V.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Attenuation-based dual-fluorescent-protein reporter for screening translation inhibitors // *Antimicrob Agents Chemother*. 2012. T. 56. № 4. — C. 1774-83

38. Osterman I.A., Evfratov S.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. (2013) *Nucleic Acids Res.*, 41, 474-486.

39. Polikanov Y.S., Osterman I.A., Szal T., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Kusochev P., Bulkley D., Malanicheva I.A., Efimenko T.A., Efremenkova O.V. et al. (2014) *Mol. Cell*, 56, 531-540.

40. Wright G.D. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? // *BMC Biol*. 2010. T. 8. — C. 123.



АНТИПЛАГИАТ
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

Башкирский государственный
медицинский университет

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	МАХИАНОВА ГУЗЕЛЬ РАИСОВНА
Подразделение	Медико-профилактический факультет с отделением биологии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ
Тип работы	Выпускная квалификационная работа
Название работы	N-(ПИРИДИН-4-КАРБОНИЛАМИНО) КАРБАМОТИОИЛ ФУРАН-2-КАРБОКСАМИД – НОВАЯ, СВЯЗЫВАЮЩАЯ РИБОСОМУ БАКТЕРИЙ ПЕРСПЕКТИВНАЯ АНТИМИКРОБНАЯ МОЛЕКУЛА
Название файла	ВКР. Махианова Г.Р. Б-401.docx
Процент заимствования	6.91 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	15.47 %
Процент оригинальности	77.62 %
Дата проверки	07:39:48 10 июня 2020г.
Модули поиска	Модуль поиска ИПС "Адилет"; Модуль поиска "БГМУ"; 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); Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция Патенты; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов
Работу проверил	Кобзева Наталья Рудольфовна ФИО проверяющего
Дата подписи	

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
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.

ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

на выпускную квалификационную работу обучающейся 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. – «Биология» медико-профилактического факультета с отделением биологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, Махиановой Гузель Раисовны на тему: «N-[(пиридин-4-карбониламино) карбамотиоил] фуран-2-карбоксамид – новая, связывающая рибосому бактерий перспективная антимикробная молекула»

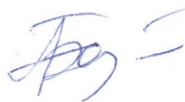
Дипломная работа Махиановой Гузель Раисовны посвящена исследованию антимикробной активности новой перспективной молекулы N-[(пиридин-4-карбониламино) карбамотиоил] фуран-2-карбоксамида в отношении клинических и пробиотических штаммов микроорганизмов.

Махианова Г.Р. проходила дипломную практику на базе кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии Башгосмедуниверситета, а также лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики УФИЦ РАН. При выполнении дипломной работы Махианова Гузель Раисовна проявила инициативу и самостоятельность в проведении исследований. Показала себя как вдумчивый исследователь, который способен решать различные задачи в научной деятельности как теоретического, так и экспериментального характера. При написании литературного обзора проработала большой объем литературных данных и приобрела навыки их анализа. В процессе подготовки экспериментальной части освоила все необходимые практические навыки и методики, необходимые для дальнейшей научно-практической деятельности.

В ходе выполнения Махианова Г.Р. продемонстрировала компетенции, которыми должен обладать обучающийся по окончании учебы по направлению подготовки 06.03.01 – Биология.

«Работа допускается к защите»

Научный руководитель:
д.б.н., профессор кафедры
фундаментальной и прикладной
микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России



Ал.Х. Баймиев

8 июня 2020 г.

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением биологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
Махиановой Гузель Раисовны

Выпускная квалификационная работа на тему **«N-[(пиридин-4-карбониламино) карбамотиоил] фуран-2-карбоксаимид – новая, связывающая рибосому бактерий перспективная антимикробная молекула»** представлена в полном объёме.

В работе представлено описание полученной перспективной молекулы и её биохимические свойства, а также результаты исследования антибактериальных свойств диско-диффузионным методом.

В ходе исследования автору удалось определить антибактериальную активность перспективной молекулы «N-[(пиридин-4-карбониламино) карбамотиоил] фуран-2-карбоксаимида» в отношении различных тестовых клинических и пробиотических штаммов, для научного обоснования её перспективности в качестве антибактериального препарата. Данная работа представляет интерес со стороны микробиологической значимости.

Текстовая и графическая часть дипломной работы выполнена с использованием программ пакета Microsoft, а именно Word и Excel и графического редактора Paint.

Выпускная квалификационная работа носит завершённый характер и соответствует всем требованиям, предъявляемым к данному виду работ. Содержит некоторые неточности в оформлении списка литературы, не сильно влияющие на качество работы в целом. В случае успешной защиты, может быть рекомендована к защите с оценкой «хорошо».

Канд. биол. наук, доцент
кафедры специальной химической технологии
ФГБОУ ВО «УГНТУ»

 З.Р. Бикмузина

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студентки 4 курса обучения медико-профилактического факультета с отделением биологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
Махиановой Гузель Раисовны

Выпускная квалификационная работа на тему «N-[(пиридин-4-карбониламино) карбамотиоил] фуран-2-карбоксамид – новая, связывающая рибосому бактерий перспективная антимикробная молекула» посвящена исследованию действия новой антимикробной молекулы в отношении различных музейных, клинических и пробиотических штаммов микроорганизмов.

Работа построена по традиционной схеме и включает следующие разделы: введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, представление собственных данных и их обсуждения, заключение, выводы, список цитируемой литературы. Во введении сформулированы цель и задачи исследования, ясно показаны актуальность, научная новизна и практическая значимость результатов исследования. Литературный обзор достаточно хорошо освещает состояние изучаемой проблемы. В главах, посвященных результатам исследования, изложены основные итоги проведенной работы. В результате проделанной работы удалось выяснить активность молекулы N-[(пиридин-4-карбониламино) карбамотиоил] фуран-2-карбоксамид по отношению к клинически значимым типовым штаммам микроорганизмов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* и также изучить антимикробную активность тестируемой молекулы в отношении клинических штаммов уропатогенных и пробиотических бактерий.

Выпускная квалификационная работа имеет заверченный характер и самым соответствуя требованиям, которые предъявлены к данному виду работ. Выпускная работа рекомендована к защите с оценкой «хорошо».

Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории биоинженерии
растений и микроорганизмов
Института биохимии и генетики –
обособленного структурного подразделения
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук.

Ю.М. Никоноров

