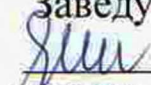


Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологий  
Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

  
подпись

Шишацкая Е.И.

« 23 » июня 2017г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

Раневые покрытия на основе биополимерных материалов с  
антисептическим эффектом

Руководитель




подпись, дата

Профессор, д.б.н.

Шишацкая Е.И.

Выпускник

 29.06.17

подпись, дата

Кузнецова А.А.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Раны и инфицированные раны.....	5
1.2 Полигидроксиалканоаты (ПГА).....	6
1.3 Антисептики.....	7
1.3.1 Отличие антисептиков от антибиотиков .....	9
1.4 Бриллиантовый зеленый .....	10
1.5 Оценка антибактериальной активности .....	12
1.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
1.5.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
1.5.3 <i>Escherichia coli</i> .....	16
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	17
2.1 Объект исследования .....	17
2.2 Материалы и оборудование для приготовления дисков из полимерных пленок.....	17
2.3 Оценка антибактериальной активности.....	18
2.3.1 Приготовление колб с питательным бульоном .....	18
2.3.2 Приготовление суспензии и инокулюма.....	18
2.3.3 Внесение инокулюма в колбы и инкубация .....	19
2.3.4 Учет результатов на ФЭК .....	19
2.3.5 Подсчет клеток, адсорбированных на пленках .....	19
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	22

3.1 Оценка антибактериальной активности .....**Ошибка! Закладка не определена.**

3.2 Выход бриллиантового зеленого из полимерных пленок .....**Ошибка! Закладка не определена.**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ..... **Ошибка! Закладка не определена.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... 23

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ..... 24

## **ВВЕДЕНИЕ**

Инфекционные болезни на протяжении многих времен были и остаются наиболее опасными заболеваниями человеческого организма. История лечения

инфекционных ран уходит своими корнями в далекое прошлое. Еще пещерные люди лечили свои повреждения и раны, которые были получены во время войн или на охоте. В результате научно-технического прогресса за последние годы было получено множество лекарственных средств (антибиотики, химиопрепараты и др.), улучшилась техника по обработке ран, появились стерильные операционные и перевязочные палаты.

В связи с тем, что раны и инфекционные заболевания кожи часто встречаются в практике врача любой специальности, проблема лечения инфекционных заболеваний кожи является одной из актуальных и значимых в медицине[1].

При ранениях, повреждениях и инфекционных заболеваниях кожи, помимо механического нарушения целостности верхних слоев кожи происходит инфицирование раны, что делает необходимым местное применение противовоспалительных и антисептических препаратов.

Традиционно используют антисептические вещества в виде спиртовых и водных растворов, при этом возможно включение антисептиков в полимерные пленочные покрытия для ран, что позволит уменьшить частоты обработок ран, количество перевязок, и предотвратить развитие бактериальной инфекции.

Возбудителями гнойных инфекций являются условно-патогенные бактерии, принадлежащие к *S. aureus et epidermidis*, *S. pyogenes et faecalis*, *E. coli*, *Proteus sp*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter sp*, *P. aeruginosa*, *Bacteroides sp* и другие[2].

**Цель исследования** – провести оценку антибактериальной активности разработанных ПГА-пленок с включением бриллиантовой зелени в различных концентрациях *in vitro*.

На основании поставленной цели были определены следующие **задачи**:

1. Приготовить пленки из ПГА с включением антисептика (бриллиантовой зелени), получаемых отливанием растворов;

2. Провести оценку влияния бриллиантовой зелени в составе пленок из ПГА на рост микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.)

3. Провести оценку выхода бриллиантового зеленого из полимерных дисков в системе *in vitro*.

## **1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

## 1.1 Раны и инфицированные раны

Рана – это нарушение целостности кожи или слизистых оболочек механическим способом, с повреждением глубинных тканей [3].

Признаки ран:

- Боль – наиболее выражена в местах с большим количеством нервных окончаний;
- Кровотечения;
- Зияние – это расхождение краев раны, зависит от глубины и ширины повреждения.

Виды повреждений кожных покровов:

- Микротравмы — мельчайшие повреждения кожи, которые не видимы при обычном осмотре.
- Мелкие травмы кожи (ссадины, царапины, порезы, уколы, заусенцы, занозы и др.)
  - Крупные травмы кожи (большие порезы, рваные раны, колотые раны и т.д.) [4,5,6].

Большую опасность при ранениях представляет кровотечение и инфекция, которая при попадании в рану, может проникнуть в организм. Это опасно развитием сепсиса, абсцесса, столбняка, газовой инфекции и другими осложнениями [7,8].

При ранении (при недостаточной обработке) может произойти инфицирование раны. Это связано с тем, что в рану вместе с ранящим предметом, кусками одежды, вторичными осколками, попадают микробы, которые впоследствии могут размножиться. Случается и так, что инфекция проникает не при поражении определенного участка тела, а при последующем неправильном уходе за ним [9].

Обычно возбудителями, которые способствуют развитию сильнейшей инфекции, являются различного рода бактерии или вирусы [10].

Основные возбудители - грамположительные кокки: в 80-90% - стафилококки (*St. aureus, epidermidis*); в 10-15% - стрептококки (*S. pyogenes*). В последние годы можно обнаружить 2 возбудителя одновременно. Также инфицирование раны могут вызывать пневмококки, синегнойная и кишечная палочки, вульгарный протей и др. [11,12,13].

## 1.2 Полигидроксиалканоаты (ПГА)

Один из перспективных классов полимеров - полигидроксиалканоаты (ПГА) (в англоязычной литературе — PHA) - новый класс биополимеров, которые синтезируют прокариотические микроорганизмы в специализированных режимах культивирования. ПГА представляют собой биосовместимые и биodeградируемые алифатические полиэфиры. [14].

Исследования ПГА активно ведутся как за рубежом, так и в России. Первым всесторонне изученным полигидроксиалканоатом был поли-3-гидроксибутират. К числу наиболее значимых представителей этого семейства относятся полигидроксибутират (PHB) и полигидроксиивалерат (PHV). Коммерческие продукты из PHA часто производятся из сополимеров PHB и PHV. [15,16].

ПГА создаются методом бактериальной прямой ферментации сахаров растительного происхождения, например, глюкоза. Так же для синтеза PHA используют сахара, спирты, смеси CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>, органические кислоты, промышленные отходы производства сахара, пальмового масла, водородсодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина [17,18].

ПГА способны накапливать различные прокариотические микроорганизмы. Способность синтезировать полимеры есть у таких видов бактерий, например, как *Azotobacter chroococcum*, *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*. Полимеры накапливаются в бактериальных клетках, откуда их необходимо извлекать [19,20,21].



Главными свойствами полигидроксиалканоатов являются биосовместимость и биоразлагаемость. Характеристика: PHAs - полимеры оксипроизводных жирных кислот природного происхождения ( $\beta$ -оксимасляной и  $\beta$ -оксивалериановой) [22]. Температура плавления 180°C, разложения – свыше 200°C, кристалличность 50-80%, молекулярная масса 100-800 кДа. Для этих полимеров зарегистрировано отсутствие цитотоксичности, иммунотоксичности, сенсibiliзирующего и гемолизирующего действия, аллергической реакции немедленного типа. Доказана биологическая совместимость PHAs на клеточном, тканевом и организменном уровнях [23]. Несмотря на то, что ПГА являются гидрофобными, частично кристаллизованными полимерами, они могут подвергаться деградации различными микроорганизмами, которые выделяют ПГА деполимеразы, разрушающие полимеры [24].

Из ПГА возможно получение гибких пленок различной толщины, в том числе полупроницаемых мембран, нитей, нетканых материалов, а также гелей и клеев [25]. Совокупность свойств, характерных для ПГА, делает их перспективными для применения в различных сферах, - медицине, фармакологии, пищевой и косметической промышленности, сельском и коммунальном хозяйстве, радиоэлектронике и других сферах [26].

РНА в прошлом были слишком дороги для широкого внедрения. Но прилагаются усилия для снижения стоимости полимеров за счет их производства из поддающихся ферментации сахаров, получаемых из сравнительно недорогих источников [27].

### **1.3 Антисептики**

Антисептики (от греч.*avtí* — против + *σηπτικός* — гноистый) — используют для лечения инфицированных ран, при поражении микроорганизмами поверхности тела человека (кожа, слизистые оболочки,

раневые поверхности), для предупреждения процессов заражения кожи и слизистых [28].

Антисептики относятся к противомикробным средствам, лишенным избирательности противомикробного действия (активны в отношении большинства микроорганизмов, простейших и грибов и не вызывают развития резистентности).

Антисептики бывают гермицидными (способными уничтожать микроорганизмов), другие - бактериостатические и могут предотвратить или подавить их рост. Антисептик - это препарат, эффективность которого уже доказана [28,29].

Механизм действия различных препаратов неодинаков и может быть связан с денатурацией белка, нарушением проницаемости плазматической мембраны, торможением важных для жизнедеятельности микроорганизмов ферментов (чаще встречается при низких концентрациях антисептиков).

Основные требования к антисептикам:

- большой спектр действия по отношению к микроорганизмам;
  - короткий латентный период действия;
  - высокая активность;
  - химическая стойкость;
  - доступность (производство и стоимость);
  - отсутствие местного раздражающего действия;
  - минимальная всасываемость с места нанесения;
  - отсутствие аллергизирующего влияния;
  - низкая токсичность;
- дезинфицирующие – не должны повреждать обрабатываемые предметы [29].

Факторы от которых зависит эффективность действия антисептика:

- Концентрации. С увеличением концентрации действие антисептиков усиливается, бактериостатическое действие переходит в бактерицидное;

- Вид ткани, на которую наносится антисептик (слизистые или кожа);
- Степень фиксации антисептика тканями, так, например, красители хорошо фиксируются тканями, это предотвращает смывание их слюной или стирание с кожи и обуславливает более длительное действие на месте нанесения.
- На действие антисептиков может влиять реакция среды;
- Температура, с ее повышением несколько возрастает антимикробная активность антисептиков;
- Растворимость их в воде и способность к диссоциации;
- Действие антисептиков зависит и от формы бактерий. Большинство антисептиков влияют на вегетативные формы бактерий, но не действуют на споры [28,29, 30].

### **1.3.1 Отличие антисептиков от антибиотиков**

#### Происхождение

К истинным антибиотикам относят средства, получаемые на основе биологического материала. Медикамент в этом случае продуцируется актиномицетами, плесневыми грибами, определенными бактериями. Однако в настоящее время антибиотиками называют и полусинтетические соединения и синтетические соединения. [29, 30].

Антисептиками (в узком смысле) понимаются вещества химического происхождения, например, зеленка.

#### Способ применения

Антибиотики предназначены для ликвидации как внешних, так и внутренних патологических явлений. В последнем случае после приема лекарства активные вещества поступают в очаг инфекции с кровотоком. Тот или иной антибиотик назначается с учетом его совместимости с другими

медикаментами, прописанными пациенту. При подобном лечении не стоит забывать о риске возникновения побочных эффектов [30].

Антисептики – это средства, используемые для наружной обработки, при которой осуществляется прямое воздействие на зону поражения. С применением таких препаратов промывают раны и полости. Антисептики также могут наноситься на болезненные области в виде мазей и присыпок. Составы этого типа характеризуются плохой всасываемостью, побочные реакции они вызывают довольно редко [30,31].

#### Спектр действия

Полезная активность антибиотиков является избирательной. Это значит, что конкретный антибиотик может воздействовать требуемым образом только на определенные виды патогенных агентов.

Между тем большинство антисептиков сильны в отношении всевозможных возбудителей инфекции. При этом устойчивость микроорганизмов к подобным лекарственным средствам является очень низкой [31].

### 1.4 Бриллиантовый зеленый

Бриллиантовый зелёный — синтетическое антисептическое средство, анилиновый краситель, производное трифенилметана. Впервые синтезировали в Германии в 1879 году [32].

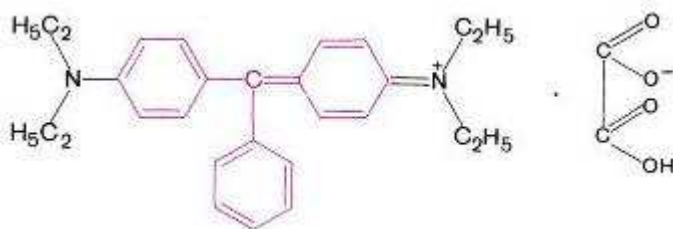


Рисунок 1 – Структурная формула бриллиантового зеленого

### Характеристика вещества

Золотисто-зеленый порошок, трудно растворимый в воде и спирте. Растворы имеют интенсивно зеленый цвет. Растворим в хлороформе. Применяют в виде водных (0,1-2%) или спиртовых растворах (1% или 2%).

### Действие Бриллиантового зеленого

Бриллиантовый зеленый осуществляет противомикробное действие, при этом не повреждает ткани и не всасывается в больших количествах. Препарат доступен, прост в применении и достаточно эффективен. Наличие этилового спирта в растворе усиливает обеззараживающее действие средства [33].

В 1917 году было доказано, что он является быстродействующим и высокоактивным антисептиком в отношении грамположительных бактерий и большинства патогенных грибов. Менее эффективен в отношении грамотрицательных бактерий. Раствор Бриллиантового зеленого осуществляет губительное действие на золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) и дифтерийную палочку (*Corynebacterium diphtheriae*) [32,33].

### Показания к применению:

- При мелких порезах, ранах и царапинах;
- Обработка свежих послеоперационных и посттравматических рубцов;
- При гнойничковых болезнях кожных покровов;
- При глазных блефаритах/мейбомитах;
- И других повреждениях кожи [34].

Также, разрешено использование у новорожденных детей и детей старшего возраста (обработка пуповины новорожденных, смазывание укусов насекомых и пузырьков при ветрянке (при этом кроме антисептического препарат осуществляет легкий подсушивающий эффект, снимает зуд)).

### Противопоказания к применению:

- Гиперчувствительность;

– Нельзя применять при кровоточащих ранах (в условиях повышенной концентрации крови и слизи противомикробное действие препарата снижается);

– Запрещается нанесение препарата на слизистые оболочки и мокнущие участки кожи [34].

Наблюдается несовместимость раствора с дезинфицирующими местными средствами, включающими хлор, активный йод и щелочи (включая раствор аммиака). Также, в присутствии белков эффективность бриллиантового зеленого снижается.

Побочные действия вещества

Раздражение кожи, при попадании на слизистую оболочку глаза — жжение, слезотечение [35].

## **1.5 Оценка антибактериальной активности**

Фотокolorиметрические методы находят широкое применение для количественных определений различных веществ и определение клеток микроорганизмов и их биомассы [36].

Микроорганизмы в большинстве случаев не окрашены и почти прозрачны, поэтому суспензия клеток поглощает свет видимой области спектра незначительно. Уменьшение интенсивности света после прохождения через суспензию клеток связано главным образом с его рассеянием. В определенных пределах количество света, рассеиваемого суспензией микроорганизмов, пропорционально содержанию клеток [37].

При данной длине волны падающего света рассеяние тем больше, чем крупнее клетки микроорганизмов. Определять количество клеток по интенсивности светорассеяния можно лишь для тех культур, развитие которых вызывает равномерное помутнение среды. Рост микроорганизмов выражают в показаниях ФЭК.

### 1.5.1 *Staphylococcus aureus*

Золотистый стафилококк (лат. *Staphylococcus aureus*) — шаровидная, анаэробная и неподвижная бактерия. Свое название «золотистый» стафилококк получил от золотистого свечения, которое издает при посеве на питательную среду.

В норме обитает на коже и слизистых практически у всех людей. Но если иммунная система организма работает стабильно, то нормальная микрофлора подавляет активность этих бактерий. Но при ослаблении защитных сил организма микроб активизируется и вызывает различные патологические заболевания [38].

Высокая патогенность золотистого стафилококка связана с тремя факторами:

- Микроорганизм обладает высокой устойчивостью к антисептикам и факторам внешней среды (выдерживает кипячение в течение 10 минут, высушивание, замораживание, этиловый спирт, перекись водорода, за исключением «зеленки»);

- Золотистый стафилококк вырабатывает ферменты пенициллиназу и лидазу, что делает его защищенным почти от всех антибиотиков пенициллинового ряда и помогает расплавлять кожные покровы, в том числе и потовые железы, и проникать вглубь организма.

- Микроб вырабатывает эндотоксин, который приводит как к пищевому отравлению, так и синдрому общей интоксикации организма, вплоть до развития инфекционно-токсического шока.

Иммунитет к золотистому стафилококку отсутствует, и человек, переболевший стафилококковой инфекцией, может заразиться ею вновь [39,3].

Золотистый стафилококк способен поражать большинство тканей организма человека. Для стафилококковой инфекции характерно наличие множества различных механизмов, путей и факторов передачи.

Золотистый стафилококк крайне легко может проникать через мелкие повреждения кожи и слизистых в организм. Стафилококковая инфекция может приводить к разным заболеваниям – начиная от акне (угревая сыпь) и заканчивая перитонитом (воспалительный процесс брюшины), эндокардитом (воспалительный процесс внутренней оболочки сердца) и сепсисом, при котором характерна летальность в районе 80%. В большинстве случаев стафилококковая инфекция развивается на фоне снижения местного или общего иммунитета, например, после ОРВИ.

Внебольничные пневмонии, которые вызывает золотистый стафилококк, регистрируются нечасто, но в стационарных отделениях именно данный вид патогенных стафилококков занимает второе место по значимости среди всех возбудителей (на первом месте находится синегнойная палочка). Внутрибольничные инфекции могут возникать вследствие проникновения золотистого стафилококка через различные катетеры или из раневых повреждений кожи внутрь организма [38,39].

Золотистый стафилококк является основным возбудителем инфекции опорно-двигательного аппарата. Данная патогенная бактерия в 75% случаев вызывает септические (инфекционные) артриты у детей и подростков.

Причиной стафилококковой инфекции является золотистый стафилококк. Как только иммунная система взрослого или ребёнка ослабевает, запускается патологический процесс. Этому могут способствовать такие факторы: дисбактериоз кишечника; длительное употребление гормонов; нерациональное и неполноценное питание; стрессы; позднее прикладывание грудничка к груди; гиповитаминоз; вскармливание грудничка искусственными смесями; наличие в теле человека недугов инфекционной природы [2].



### 1.5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) — условно-патогенный, подвижный микроорганизм. Это грамм-отрицательная бактерия в форме палочки с закругленными концами, размером от 0,5 до 1 мкм. Название бактерия получила потому, что она окрашивает питательную среду, в которой растёт, в зелено-синий оттенок [40, 4].

Это условно патогенный для человека микроорганизм, обитающий в организме и способный при определенных условиях вызывать инфекционное заболевание. Синегнойная палочка обнаруживается в составе нормальной микрофлоры некоторых участков кожи (паховой и подмышечной области, околоушной области и др.).

Факторы, которые приводят к синегнойной инфекции:

- Большое количество бактерии, попавших в организм;
- Ослабленный иммунитет;
- Длительное нахождение в больнице;
- Продолжительное употребление антибиотиков с широким спектром действия и/или гормональных препаратов;
- Заболевания органов дыхания;
- Синдром приобретённого иммунодефицита;
- Новорожденный возраст и пожилые люди (старше 65).

Пути передачи:

- Воздушно-капельный (при кашле, чихании, разговоре);
- Контактный (через бытовые предметы, инструментарий, двери, полотенца, краны);

– Пищевой (через недостаточно обработанные молоко, мясо или воду).

Синегнойная инфекция мягких тканей и кожи возникает в местах открытых раневых, ожоговых поверхностей, ран после хирургических вмешательств, трофических язв на конечностях. Также при ранениях возможно развитие синегнойного остеомиелита (поражение костной ткани) [41].

### **1.5.3 Escherichia coli**

Кишечная палочка (лат. *Escherichia coli*) – грамотрицательная бактерия, имеющая форму палочки, являющаяся факультативным анаэробом. Палочки имеют закругленные концы, размер от 0,4 до 3 мкм. Некоторые штаммы обладают подвижностью за счет наличия жгутиков, остальные – неподвижны. [42].

В нормальных условиях кишечная палочка заселяет кишечник человека, среднее количество варьирует от  $10^6$  до  $10^8$  КОЕ/г содержимого дистального отдела кишечника. Они появляются в кишечнике человека в первые дни после появления на свет в процессе его заселения нормальной микрофлорой, и сохраняются в течение всей жизни [43].

Вызывает развитие патологии при попадании в другие органы или полости человеческого тела. Отклонения в содержании непатогенных штаммов кишечной палочки в кишечнике называются дисбактериозом. Если бактерия попадает через отверстие в ЖКТ в брюшную полость, может возникнуть перитонит. Попав и размножившись во влагалище женщины, бактерия может вызвать или осложнить кольпит. Попадание бактерии в предстательную железу мужчины может быть патогенезом острого или хронического бактериального простатита [42].

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Объект исследования

Объектом исследования явились экспериментальные пленки из ПГА с добавлением бриллиантовой зелени.

### 2.2 Материалы и оборудование для приготовления дисков из полимерных пленок

1. Образец сополимера (3-гидроксibuтират-92.1, 3-гидроксивалерат-7.0).
2. Хлороформ( $\text{CHCl}_3$ ).
3. Спиртовой раствор бриллиантовой зелени 0,05%.

#### Ход работы по приготовлению биополимерных пленок:

1. Предварительно, раствор бриллиантовой зелени (1мл, 2мл, 3мл, 7,5мл) высушили на чашке Петри, после испарения воды и спирта, добавили 23 мл хлороформа. После чего, добавили 500мг, в одном случае, и

300 мг сополимера (% содержание полимера в хлороформе равняется, в 1 случае, 2,9%, во втором, 1,7%).

2. Приготовленные растворы поместили на водяную баню(60°), периодически встряхивали, добиваясь однородности раствора.

3. После водяной бани, раствор профильтровали с помощью воронки и фильтрующего материала.

4. Полученные растворы отлили на чашке Петри под вытяжкой.

Таким же способом, получили плёнки без содержания бриллиантовой зелени.

После того, как были получены пленки, из них вырезали диски ( $D=15\text{мм}$ ), при помощи металлического резака. Далее, диски простерилизовали в автоклаве при 1,1 атм (температуре  $121^{\circ}\text{C}$ ) в течении 15 мин.

Получили диски 4 разных концентраций (содержание зелёнки в пленках) – 17% (10 мг), 30% (20 мг), 40% (30 мг), 60% (75 мг), и толщиной 500мг, 300мг.

Из 1 пленки получается 32 диска.

## **2.3 Оценка антибактериальной активности**

### **2.3.1 Приготовление колб с питательным бульоном**

Для оценки антибактериальной активности использовали питательный бульон (nutrient broth).

19.5 г Nutrient Broth (HiMedia, Индия) размешали в 1500 мл дистиллированной воды. Прокипятили до полного растворения среды. Стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм (температуре  $121^{\circ}\text{C}$ ) в течении 15 мин. Среду охлаждали и разливали в стерильные колбы по 100 мл.

### **2.3.2 Приготовление суспензии и инокулюма**

Тестируемые микроорганизмы:

- грам(+): *Staphylococcus aureus*;
- грам(-): *Pseudomonas aeruginosa*;
- грам(-): *Escherichia coli*.

Для приготовления инокулюма использовали суточную агаровую чистую культуру исследуемого микроорганизма, выращенную в пробирках на скошенном агаре (nutrient agar, HiMedia). Делали смыв культуры с поверхности агара в пробирку со стерильной водопроводной водой (10 мл). Инокулюм следует использовать в течение 15 минут после приготовления [44].

### **2.3.3 Внесение инокулюма в колбы и инкубация**

Не позднее, чем через 15 мин. в колбы стерильно вносили инокулюм, одинаковый объем – по 0,5 мл. После инокуляции в колбы с питательным бульоном вносили диски с бриллиантовым зеленым (по 3 диска на колбу). Внесение дисков проводили с помощью стерильного пинцета. Все манипуляции выполняли асептически в ламинарном шкафу II класса (Labconco Corp., США).

Далее колбы помещали в шейкер-инкубатор (Lab Companion, SI-600-120V-60 Incubator Shaker Table Top Model), культивировали при температуре 30°C, режиме 120 об/мин., в течение 7 суток [44].

### **2.3.4 Учет результатов на ФЭК**

После окончания инкубации измеряли оптическую плотность бульона на фотоколориметре (КФК-2) длина волны 590 нм, ширина кюветы 1 см.

### **2.3.5 Подсчет клеток, адсорбированных на пленках**

После культивирования делали смыв адсорбированных клеток тест-микроорганизмов с поверхности дисков. Пинцетом доставали диски из колбы и помещали в стерильные чашки Петри с 1 мл стерильной дистиллированной

воды. Затем делали соскоб с обеих сторон пленок стерильной микробиологической петлей. Подсчет клеток бактерий в получившейся суспензии проводили методом Брида на фиксированных окрашенных мазках на микроскопе Primo Star (Carl Zeiss) [45].

Метод Брида. На чистые и обезжиренные покровные стекла наносили 10 мкл исследуемой жидкости из чашки Петри, и распределяли на площади в 1 см<sup>2</sup>. Мазки просушили, зафиксировали в пламени спиртовки, и покрасили фуксином. После этого, с иммерсионным объективом ×100, считали количество микроорганизмов в отдельных полях зрения микроскопа. Поля зрения выбирали произвольно (30 полей зрения) и определяли среднее число клеток в 1 поле зрения.

Затем с помощью объект-микрометра определили площадь поля зрения микроскопа при увеличении объектива ×100 и высчитывали, сколько раз она укладывается в 1 см<sup>2</sup>, чтобы найти коэффициент пересчета (N):

$$N = \frac{10000}{\pi r^2}, \text{ где}$$

Диаметр поля зрения = 0,16 мм; площадь поля зрения = 0,02 мм<sup>2</sup>. Эта площадь укладывается в 1 см<sup>2</sup> 5000 раз. Таким образом, N = 5000.

Количество микроорганизмов на площади мазка (в 10 мкл суспензии) определяли, умножая среднее количество клеток в поле зрения на коэффициент N. Далее затем делали пересчет на 1 мл суспензии, умножая полученное значение на 100 [45].

## **2.4 Выход бриллиантового зеленого из полимерных пленок**

1. Предварительно, приготовили диски из полимерных пленок (смотреть методику 2.2).

2. Приготовили PBS буфер, 3 таблетки фосфатно-солевого буфера (Novus Biologicals, США) растворили в 300 мл дистиллированной воды.

3. Буфер, носики, пенициллинки (24шт) и диски стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм (температуре 121°C) в течении 15 мин.

4. После стерилизации, буфер разливали в стерильные пенициллинки по 10 мл. После в пенициллинки с буфером вносили диски с бриллиантовым зеленым (по 1 диску на пеницилинку). Внесение дисков проводили с помощью стерильного пинцета. Все манипуляции выполняли асептически в ламинарном шкафу II класса (Labconco Corp., США). Далее пенициллинки помещали в термостат (BINDER BD 53, Германия) при 37°C на 8 суток.

5. Снимали точки в ламинарном шкафу II класса, отбирали по 1мл раствора в пробирки Эппендорф, через 3 часа, на 1 сутки, 2 сутки, 4 сутки, 6 сутки, 8 сутки. После того, как отобрали 1мл раствора, вносили 1 мл буфера.

#### **2.4.1 Учет результатов**

После того, как сняли все точки измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре (Cary 60 UV-Vis, Agilent) длина волны 800-200 нм, кюветы (uv-cuvette micro 70 мкл).

Далее строили калибровочный график, и считали концентрацию бриллиантового зеленого в растворе.

### **3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ**

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Бр.зел. – Бриллиантовый зеленый

ЖКТ – Желудочно-кишечный тракт

КОЕ – колониеобразующая единица

ОРВИ - Острая респираторная вирусная инфекция.

ПГА – Полигидроксиалканоаты

П (ЗГБ,ЗГВ) – Поли (3-гидроксипропионат, 3- гидроксивалерат)

ФЭК - Фотоэлектроколориметр

D – Диаметр

PHA – Polyhydroxyalkanoates

PHB - Polyhydroxybutyrate

PHV - Polyhydroxyvalerate

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Гнойно-воспалительных заболеваний кожи – biofile.ru - [Электронный ресурс]. – режим доступа: <http://biofile.ru/bio/20449.html>(дата обращения 15 марта 2016 года).
2. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология: Учебное пособие для студентов мед. вузов. / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, В.П. Ширококов. - М.: Academia. - 2003. - 462с.
3. Смирнова, А.М. Микробиология и профилактика стафилококковых инфекций. / А.А. Трояшкин, Е.М. Падерина. – «Медицина». - 1977. – 30с.
4. Сидоренко, С.В. Госпитальные инфекции, вызванные *Pseudomonas aeruginosa*. Распространение и клиническое значение антибиотикорезистентности/ С. В. Сидоренко, С. П. Резван, Г. А. Стерхова, С. А. Грудинина // Антибиотики и химиотерапия. — 1999. — № 3. — С. 25–34.
5. Современные тенденции в создании биологически активных материалов для лечения гнойных ран /Н. А. Ефименко [и др.] // Воен.-мед. журн. – 2002. – Т. 323, № 1. – С. 48–52.
6. Травматические повреждения кожи - Medkurs.ru – [Электронный ресурс]. – режим доступа: [http://www.medkurs.ru/sickness\\_catalog/skin/section2132/10777.html](http://www.medkurs.ru/sickness_catalog/skin/section2132/10777.html) (дата обращения 29 мая 2017 года).
7. /10777.html (дата обращения 29 мая 2017 года).
8. Дерматовенерология: учебник для студентов высших учебных заведений / В. В. Чеботарёв, О. Б. Тамразова, Н. В. Чеботарёва, А. В. Одинец. М: Академия. - 2013. - 584 с.
9. Адамян, А.А. Лечение гнойных ран. / А.А.Адамян, С.В.Добыш, С.П.Гланиев. - Хирургия. 1998. - № 3. - С.28-30.
10. Туманов В. П. Методическое руководство по лечению ран / В. П. Туманов, Г. С. Герман. – М. : ПаульХартманн, 2000. – 123 с.
11. Привольнев В. В. Основные принципы местного лечения ран и раневой инфекции / В. В. Привольнев, Е. В. Каракулина // Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2011. – Т. 13, № 3. – С. 214–22.

12. Кузин, М. И. Общие принципы лечения гнойных ран / М. И. Кузин, Б. М. Костюченко, И. И. Колкер. - Вестн. АМН СССР. – 1983. – № 8. – С. 45–49.
13. Минченко, А. Н. Раны. Лечение и профилактика осложнений / А. Н. Минченко. – СПб. : СпецЛит. - 2003. – 207 с.
14. Полигидроксиалканоаты - биоразрушаемые полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот: синтез, свойства, области применения - Medbe.ru – [Электронный ресурс]. – режим доступа: <http://medbe.ru/materials/problemu-i-metody-biotekhnologii/poligidroksialkanoaty-biorazrushaemye-polimery-gidroksiproizvodstnykh-alkanovykh-kislotsintez-svoys/> (дата обращения 20 мая 2017 года).
15. Сэноо Манабу Полимеры медицинского назначения/ Перевод с японского М. К. Овечкина и Н. Ф. Митрофанова - Москва «Медицина». – 1981. - С.3-25.
16. Волова, Т. Г. Биоразрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение: монография / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. – Красноярск: Красноярский писатель, 2011. – 400 с.
17. Штильман, М. И. Полимеры медико-биологического назначения //– М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – 400 с.
18. Polyhydroxyalkanoates (PHA): Biosynthesis, Industrial Production and Applications in Medicine» (Nova Scienses Publ. Inc. NY. USA). – 2014. - h.1.
19. Volova, T.G. Gitelson Polymer Degradation and Stability./ T.G. Volova, A.N. Boyandin, A.D. Vasiliev, V.A. Karpov, S.V. Prudnikova, O.V. Mishukova, U.A. Boyarskikh, M.L. Filipenko, V.P. Rudnev, Bùi Bá Xuân, Vu Vi ệt Dung, Gitelson I.I. // ELSEVIER. – 2010. – P.2-10.
20. Волова Т.Г. Полигидроксиалканоаты (ПГА) – биоразрушаемые полимеры для медицины // Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая. – Новосибирск: СО РАН. - 2003. – 260 с.

21. Прудникова, С. В. Экологическая роль полигидроксиалканоатов –аналога синтетических пластмасс: закономерности биоразрушения в природной среде и взаимодействия с микроорганизмами: учебное пособие / С. В. Прудникова, Т. Г. Волова. – Красноярск: Красноярский писатель, 2012. – 184 с.
22. Волова Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии: учеб. пособие // Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. - ИПК СФУ. - 2009. – 56 с.
23. Yasin, M. Polymers for medical devices. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: physical and degradative properties of blends with polycaprolacton / M.Yasin, B. J. Tighe // Clin. Materials. – 1992. – Vol. 10. – P. 21–28.
24. Doi, Y. Biodegradation of microbial poly(hydroxyalkanoates) / Y. Doi, Y. Kanetsawa, N. Tanahashi // Makromol. Chem. Rapid. Commun. – 1989. – Vol. 10. – P. 227–230
25. Gross, R. A. Biodegradable polymers for the environment / R. A. Gross, B. Kalra // Green Chem. – 2002. – Vol. 297. – P.803–807.
26. Хацкевич, Д.А. Фармакология. / Д.А. Хацкевич. – Москва: ГЭОТАР-Медиа. - 2006. – Г. 28. - 749 с.
27. Лоуренс, Д. Р. Клиническая фармакология. / Д. Р. Лоуренс, П. Н. Бенитт - М:Медицина. – 1991. С.45-50.
28. Крылов, Ю.Ф. Фармакология. / Ю.Ф. Крылов, В.М. Бобырев - М: ВХНМЦ МЗ РФ. - 1999. - 352 с.
29. Мозгов, И.Е. Фармакология. / И.Е. Мозгов. – М: Агропромиздат. - 1985. – С.306-341.
30. Уша, Б.В. Фармакология. / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова; ред. В.Н. Жуленко. – М: Колос. - 2003. – С.32-34; 207-235.
31. Сизенцев, А.Н. Антибиотики и химиотерапевтические препараты: учебник. / А.Н. Сизенцев, А.И. Мисетов, И.Ф. Каримов. – Оренбургский гос. у-т. – Оренбург: ОГУ. – 2012. – 443с.

32. Чекалин, М.А. Технология органических красителей и промежуточных продуктов. / Б.В. Пасет, Б.А. Иоффе. - Л.:Химия. 1980. - 472 с.
33. Кнунянц, И. Л. Краткая химическая энциклопедия. / И. Л. Кнунянц - Т. 1. - М.: Советская энциклопедия. – 1967. – С.76-80.
34. Степанов Б. И. Введение в химию и технологию органических красителей / Б. И. Степанов. — М.: Химия. - 1984.- с. 173—174.
35. Лурье, Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. / Ю. Ю. Лурье - М.: «Химия». - 1979.- С.26-32.
36. Swenson, J.M. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. Manual of Clinical Microbiology. / J.M. Swenson, J.A. Hindler, L.R. Peterson – Washington. -D.C: ASM Press. - 1999. - P.63-78.
37. August, M.J. Quality control and quality assurance practices in clinical microbiology. Weissfeld A.S., editor. Cumulative Techniques and procedures in Clinical Microbiology. / M.J. August, J.A. Hindler, T.W. Huber. - Washington D.C.: American Society For Microbiology. - 1990. – P.86-94.
38. Воробьев, А.А. Общая и санитарная микробиология. /А.А. Воробьев, А.Л. Гинзбург, В.М. Малеев, Н.А. Семина. – М.: Издательство БИНОМ. – 2008. – С.350-355.
39. Абаев Ю. К. перевязочные материалы и средства в хирургии / Ю. К. Абаев // Вестн. Хирургии им. И. И. Грекова. – 2004. – Т. 163, № 3. – С. 83–87.
40. Хирургическая инфекция-клиника, диагностика, лечение: рук.для военных врачей / под ред.Э. А. Нечаева. – М. : Медицина, 1993. – 296 с.
41. European Committee for Clinical Laboratory Standards. Standard for quality assurance. Part II: Internal quality control in microbiology. - ECCLS Document. – 1985. – P.2-4.
42. Васильев, Б.А. Острые кишечные заболевания: ротавирусная инфекция и ротавирусы. Профилактика кишечных заболеваний. / Б.А. Васильев [и др.] - СПб.: Фолиант. - 2000. – 26с.

43. Нетрусов, А. И. Микробиология: учебник / А. И. Нетрусов, И. Б.Котова. – Москва: Академия. - 2005. – 343 с.
44. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии./ Под ред. Н.П. Елинова.- М.: «Медицина», 1988.- 207с.
45. Громовых, Т.И. Методы выделения, изучения и культивирования микроорганизмов. / Т.И. Громовых, В.А. Тюльпанова, В.М. Гукасян, С.В. Прудникова - Красноярск: СибГТУ, КрасГУ. - 2006. - 106с.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологий  
Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

  
подпись

Шишацкая Е.И.

« 23 » июня 2017г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

Раневые покрытия на основе биополимерных материалов с  
антисептическим эффектом

Руководитель




Профессор, д.б.н.

Шишацкая Е.И.

подпись, дата

Выпускник

 29.06.17

Кузнецова А.А.

подпись, дата