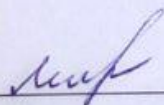


Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.03.01 – Биология
Профиль (специализация): Биология


ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГУАНИДИНОВЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ ПИЛЛАР[5]АРЕНА

Обучающийся 4 курса
группы 01-003




Букаринова Ю.О.

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент



Соколова Е.А.

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

Казань – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Биопленки.....	7
1.1.1 Строение и функционирование биопленок.....	7
1.1.2 Роль биопленок в бактериальных сообществах.....	8
1.1.3 Проблемы в медицине, связанные с биопленкообразованием.....	10
1.2 Супрамолекулярные системы в борьбе с биопленками.....	13
1.2.1. Макроциклические соединения как агенты контроля образования биопленок.....	14
1.2.1.1 Макроциклические арены.....	14
1.2.1.2 Пиллар[n]арены.....	16
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	20
2.1 Исследуемые соединения.....	20
2.2 Характеристика тестируемых микроорганизмов.....	23
2.3 Идентификация клинических изолятов.....	23
2.3.1 Экстракция ДНК.....	23
2.3.2 Полимеразная цепная реакция.....	24
2.3.3 Секвенирование по Сэнгеру.....	25
2.4 Оценка антимикробной активности исследуемых химических веществ в резазуриновом тесте.....	25
2.5 Определение способности пиллар[5]аренов влиять на биопленкообразование.....	27
2.6 Оценка влияния исследуемых макроциклов на структуру биопленок <i>S. aureus</i> и <i>K. pneumoniae</i>	28
2.7 Статистическая обработка результатов.....	29
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	30
3.1 Результаты секвенирования ДНК клинических изолятов по методу Сэнгера.....	30
3.2 Определение минимальной ингибирующей и минимальной бактерицидной концентраций тест-соединений.....	31

3.3	Характеристика антимикробной активности исследуемых химических веществ методом drop plate	35
3.4	Оценка влияния тестируемых пиллар[5]аренов на био пленкообразование.....	39
3.5	Характеристика влияния тестируемых соединений на структуру био пленок методом CLSM.....	43
	ВЫВОДЫ.....	47
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	49

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что антибиотики эффективны в лечении бактериальных инфекций, их неправильное и бесконтрольное использование привело к развитию множественной лекарственной устойчивости, в связи с чем, является актуальной проблема антибиотикорезистентности [Salam *et al.*, 2023]. Наиболее сложно поддаются терапии инфекции, связанные с образованием биопленок, так как в этом случае бактерии находятся под защитой внеклеточного матрикса, выделяемого биопленкой [Sun *et al.*, 2014].

Для решения данной проблемы большой интерес представляют антимикробные покрытия, которые способствуют профилактике образования пленок микроорганизмов, снижая вероятность будущих инфекций [Cloutier *et al.*, 2015]. Существуют покрытия с использованием наночастиц серебра, металлооксидных наночастиц, четвертичных аммониевых соединений или антибиотиков. Однако каждая из этих технологий имеет свои ограничения. Например, покрытия на основе серебра могут демонстрировать низкую эффективность в реальных условиях, а антибактериальные свойства покрытия из четвертичного аммония сильно зависят от условий окружающей среды [Han *et al.*, 2022].

Перспективными кандидатами для проектирования антибактериальных пленок являются пиллар[5]арены, важным преимуществом которых выступает высокая степень функционализации. В частности, интерес представляет функционализация пиллар[5]аренов гуанидиновыми производными. В литературе существуют данные, свидетельствующие о том, что гуанидиновые группы важны для реализации антибактериальной и противогрибковой активности различных соединений [Song *et al.*, 2019]. Гуанидиновые соединения в качестве антимикробных препаратов эффективны против разных штаммов золотистых и эпидермальных стафилококков, кишечной палочки и других широко распространенных инфекционных агентов [Gomes *et al.*, 2023].

В связи с вышесказанным, целью настоящей работы стала оценка антимикробной и антибиопленочной активности ряда гуанидиновых производных пиллар[5]аренов, часть из которых способна к самосборке в супрамолекулярные пленки.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

- 1) Подтвердить видовую принадлежность клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus epidermidis* молекулярным методом;
- 2) Определить минимальные ингибирующие и минимальные бактерицидные концентрации пиллараренов 10G, 9GC8, 9GC18, 9GC10 по отношению к микроорганизмам *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium* TA 98, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae* в резазуриновом тесте;
- 3) Охарактеризовать концентрационную зависимость влияния пиллар[5]аренов 10G, 9GC8, 9GC18, 9GC10 на микроорганизмы *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium* TA 98, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* методом drop plate;
- 4) Охарактеризовать влияние пиллар[5]аренов 9GC8, 9GC18, 9GC10 на формирование биопленок *K. pneumoniae* и *S. aureus*;
- 5) Охарактеризовать влияние пиллар[5]аренов 10G, 9GC8, 9GC18, 9GC10 на структуру биопленок *K. pneumoniae* и *S. aureus* методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

ВЫВОДЫ

1) Подтверждена видовая принадлежность клинических изолятов *K. pneumoniae* и *S. epidermidis*, с вероятностью 99% микроорганизмы соответствуют заявленным;

2) Определены МИК и МБК соединений 10G, 9GC8, 9GC18, 9GC10 по отношению к микроорганизмам *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* в резазуриновом тесте. Все исследуемые культуры были чувствительны к макроциклу 10G. Макроцикл 9GC8 не обладал ингибирующим действием в отношении всего ряда исследуемых микроорганизмов. Бактерицидным действием обладало только вещество 10G (МБК = 1×10^{-4} М для всего ряда микроорганизмов).

3) Проведена характеристика концентрационной зависимости влияния пиллар[5]аренов 10G, 9GC8, 9GC18, 9GC10 на микроорганизмы *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. С увеличением концентрации веществ увеличивалась их ингибирующая способность. По мере увеличения антибактериальных свойств соединения можно распределить в ряду следующим образом: 9GC10 < 9GC8 = 9GC18 < 10G.

4) Охарактеризована антибиопленочная активность пиллар[5]аренов 9GC8, 9GC18, 9GC10 для *K. pneumoniae* и *S. aureus*. Пиллар[5]арен 9GC8 ингибировал формирование биопленок *S. aureus*. Соединения 9GC18 и 9GC10 снижали ёмкость биопленки *K. pneumoniae*.

5) Охарактеризовано влияние пиллар[5]аренов 10G, 9GC8, 9GC18, 9GC10 на структуру биопленок *K. pneumoniae* и *S. aureus* методом CLSM. Все макроциклы оказывали ингибирующее действие на биопленки *S. aureus* и *K. pneumoniae*. Наиболее значимое влияние показала предобработка макроциклами 9GC8 и 9GC18 – доля мертвых клеток была значимо выше в сравнении с вариантом без обработки.