

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Направление: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

ВОДОРАСТВОИМЫХ ПИЛЛАР[5]АРЕНОВ

Работа завершена:

" 31 " 05 . 2018 г.  (Е.В. Груздева)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н., доцент

" " 2018 г.  (П. В. Зеленихин)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

" " 2018 г.  (О.Н. Ильинская)

Казань–2018

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Пиллар[n]арены	7
1.1.1 Свойства пиллар[n]аренов.	7
1.1.2 Строение и синтез пиллар[n]аренов	9
1.1.3 Взаимодействие пиллар[5]аренов с ионами металлов	10
1.1.4 Пиллар[n]арены для таргетной доставки лекарственных соединений	11
1.1.5 Пилларарены в борьбе с биопленками	15
1.2 Методы оценки изменений показателей жизнеспособности клеток	16
1.2.1 МТТ-тест	16
1.2.2 Проточная цитофлуориметрия – современный метод анализа в биологии и медицине	17
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	20
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	20
2.1 Исследуемые соединения	20
2.2 Характеристика тестерных штаммов микроорганизмов	20
2.3 Определение минимальной ингибирующей концентрации пиллар[5]аренов	22
2.4 Тест на токсичность по отношению к микроорганизмам	22
2.5 Тест Эймса	23
2.6 Ингибирование образования биопленок <i>Candida albicans</i>	25
2.7 Линия клеток А-549	26
2.8 Характеристика цитотоксичности пиллар[5]аренов	27
2.9 Цитометрическая оценка влияния пиллар[5]аренов на целостность цитоплазматической мембраны.	28
2.10 Статистическая обработка результатов	29

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	30
3.1 Оценка токсического действия пиллар[5]аренов на прокариоты	30
3.2 Генотоксическая активность пиллар[5]аренов	31
3.3 Ингибирование пиллар[5]аренами образования биопленок <i>Candida albicans</i>	32
3.4 Влияние пиллар[5]аренов и их комплексов с серебром на жизнеспособность клеток A549	34
ВЫВОДЫ	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	43

ВВЕДЕНИЕ

К числу важных направлений супрамолекулярной химии, изучающей сложные химические системы, относится создание соединений с заданными молекулярной структурой и свойствами. При этом основными функциями, которые придают супрамолекулам, являются: молекулярное распознавание, специфическая каталитическая активность и способность осуществлять транспорт. Такие функциональные супрамолекулы наряду с организованными надмолекулярными ансамблями могут быть использованы для создания молекулярных и супрамолекулярных устройств [Зоркий с соавт., 1999].

Несмотря на стремительное развитие синтетической органической и супрамолекулярной химии, появление новых классов функциональных макроциклов отмечается крайне редко. В 2008 году настоящим открытием стала информация о новом классе макроциклических синтетических рецепторов на основе алкилированных гидрохинонов - пиллар[*n*]аренов (pillar[*n*]arenes) [Зырянов с соавт., 2012]. Эти макроциклические соединения состоят из нескольких единиц гидрохинона (от 5 до 10), связанных в пара-положении ароматического кольца [Евтюгин с соавт., 2016]. Пилларарены становятся все более и более привлекательными ввиду их уникальных особенностей и высокого потенциала для изготовления функциональных материалов на их основе [Tan *et al.*, 2015]. Одним из наиболее привлекательных свойств является сродство к нейтральным лигандам в органических средах, что является несвойственным классическим краун-эфирам и каликсаренам. [Wang *et al.*, 2016] Таким образом, пиллар[*n*]арены могут играть важную роль в системах «хозяин- гость».

На основе пиллараренов планируется создание высокоселективных биосенсоров, что позволит *избежать проблем, связанных с интерпретацией результатов. Сенсоры на основе пиллар[*n*]аренов по чувствительности превосходят существующие аналоги не менее чем на два порядка, что делает реальным анализ в сто раз меньшего количества веществ.*

Также пиллар[n]арены рассматриваются в качестве перспективных наноконтейнеров для таргетной доставки лекарств, селективной адсорбции, молекулярного распознавания и вирусных ингибиторов [Wang *et al.*, 2016]. Известными на сегодняшний день остаются, в основном, химические и физические свойства вышеупомянутых макроциклов, в связи с чем, целью настоящей работы стала оценка биологических свойств водорастворимых пиллар[5]аренов в прокариотических и эукариотических тест-системах. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) Охарактеризовать токсические свойства пиллар[5]аренов по отношению к прокариотическим организмам в тесте на токсичность и при помощи определения МИК;
- 2) Определить генотоксическую активность пиллар[5]аренов в тесте Эймса;
- 3) Охарактеризовать способность пиллараренов ингибировать образование биопленок *Candida albicans*;
- 4) Охарактеризовать изменения показателей жизнеспособности клеток А549 под действием пиллар[5]аренов и их комплексов с Ag^+ .

Реферат.

Пиллар[n]арены являются макроциклическими соединениями и становятся все более и более привлекательными ввиду их уникальных особенностей и высокого потенциала для изготовления функциональных материалов на их основе.

Соединения могут играть важную роль в системах «хозяин-гость», так как проявляют сродство к нейтральным лигандам в органических средах и водных растворах, что является наиболее интересной их особенностью. Основываясь на этой характеристике, пиллар[n]арены рассматриваются в качестве наноконтейнеров для таргетной доставки лекарств, селективной адсорбции, молекулярного распознавания и создания биосенсоров. Фактически, взаимодействие «гость-хозяин» в химии пиллар[n]аренов и связанных с ними областей применения стало полем для самых интенсивных исследований в последние несколько лет.

Для того, чтобы адекватно использовать пиллар[n]арены в различных областях, необходимо получить представление и об их биологических свойствах, а также биосовместимости.

Целью настоящей работы стала оценка биологических свойств водорастворимых пиллар[5]аренов в прокариотических и эукариотических тест-системах. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) Охарактеризовать токсические свойства пиллар[5]аренов по отношению к прокариотическим организмам в тесте на токсичность и при помощи определения МИК;
- 2) Определить генотоксическую активность пиллар[5]аренов в тесте Эймса;
- 3) Охарактеризовать способность пиллараренов ингибировать образование биопленок *Candida albicans*;

4) Охарактеризовать изменения показателей жизнеспособности клеток А549 под действием пиллар[5]аренов и их комплексов с Ag^+ .

Эксперименты с микроорганизмами проводились на базе лаборатории иммунологии и разработки аллергенов ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора. Обработка пиллар[5]аренами не вызывала гибели клеток изолятов условно-патогенной микрофлоры (*Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*) во всем диапазоне исследованных концентраций (156.25 мкг/мл – 10 мг/мл). Вследствие этого значение МИК не было установлено.

Было показано, что пиллар[5]арены DNS-165, DNS-158, DNS-113 не обладают токсическими свойствами по отношению к *S. typhimurium* TA100 в диапазоне концентраций 100-1000 мкг/чашку. Пиллар[5]арены DNS-165, DNS-158, DNS-113 не проявили генотоксической активности и не индуцировали мутаций по типу замены пар оснований в тесте Эймса.

Было также показано, что соединения DNS-trat-I, DNS-256, LT-45 не проявили значительной способности к ингибированию роста биопленок *Candida albicans* при окрашивании кристаллическим фиолетовым. Пилларарены DNS-256 и LT-45 в концентрации 10 мг/мл, ингибировали образование биопленок дрожжей на 22 % и 24 %, соответственно.

Охарактеризовано цитотоксическое действие пиллар[5]аренов и их комплексов с Ag^+ на клетки А549 в МТТ-тесте. Соединения DNS-165 и DNS-158 обладали незначительной токсичностью в концентрации 500 мкг/мл, снижая жизнеспособность клеток до 70% и 73%, соответственно. Пиллар[5]арены DNS-113, DNS-trat-I, DNS-268, LT-50, не проявили токсических свойств во всем диапазоне исследованных концентраций. Но было показано, что в присутствии пиллар[5]аренов DNS-268 и DNS-trat-I наблюдалось некоторое (до 40%) повышение жизнеспособности клеток А549 в концентрациях 10 мкг/мл – 100 мкг/мл в сравнении с вариантом без обработки.

Для проведения данного эксперимента предварительно проводился поиск IC50 (концентрации полумаксимального ингибирования) для ионов серебра. Жизнеспособность клеток А549 в присутствии пиллараренов LT-50

или DNS-trat-I и ионов серебра было достоверно выше значений данного показателя при обработке лишь Ag^+ . Значение данного показателя составило 76% и 73% для концентрации ионов серебра 3 мкг/мл, тогда как в варианте с монообработкой серебром выживаемость клеток A549 составила только 30%.

При использовании серебра в концентрации 4 мкг/мл выживаемость клеток после 24 ч инкубирования составила всего лишь 11%. Добавление в систему пиллараренов LT-50 и DNS-trat-I позволило повысить значение данного показателя до 55% и 50%, соответственно. Пилларарен DNS-268 не изменял цитотоксических свойств Ag^+ . Очевидно, что основную роль в снижении токсичности Ag^+ пиллар[5]аренами играют заместители на их боковых цепях. В структуре пиллараренов LT-50 и DNS-trat-I четвертичный атом аммония связан с ионом I^- , в то время, как DNS-268 подобных групп не несет. Возможно именно это отличие и объясняет связывание пиллараренами LT-50 и DNS-trat-I ионов Ag^+ .

Охарактеризована способность водорастворимых пиллараренов LT-50, LT-45, DNS-268, DNS-trat-I индуцировать апоптоз. В концентрации 500 мкг/мл ни один из исследованных пиллар[5]аренов не вызывал повышения доли апоптотических клеток в сравнении с вариантом без обработки.

ВЫВОДЫ

1) Впервые установлено, что пиллар[5]арены DNS-165, DNS-158, DNS-113 не обладают токсическими свойствами по отношению к *S. typhimurium* TA100 в диапазоне концентраций 100-1000 мкг/чашку. Все исследованные пиллар[5]арены не влияли на жизнеспособность клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*.

2) Пиллар[5]арены DNS-165, DNS-158, DNS-113 не проявили генотоксической активности и не индуцировали мутаций по типу замены пар оснований в тесте Эймса.

3) Впервые показано, что соединения DNS-trat-I, DNS-256, LT-45 не проявили значительной способности к ингибированию роста биопленок *Candida albicans*. Пилларарены DNS-256 и LT-45 в концентрации 10 мг/мл, ингибировали образование биопленок дрожжей на 22 % и 24 %, соответственно.

4) Охарактеризовано цитотоксическое действие пиллар[5]аренов и их комплексов с Ag^+ на клетки A549 в МТТ-тесте. Соединения DNS-165 и DNS-158 обладали незначительной токсичностью в концентрации 500 мкг/мл, снижая жизнеспособность клеток до 70% и 73%, соответственно. В присутствии пиллар[5]аренов DNS-268 и DNS-trat-I в концентрациях 10 мкг/мл – 100 мкг/мл жизнеспособность клеток A549 повышалась на 40%. Пиллар[5]арены DNS-113, DNS-trat-I, DNS-268, LT-50, не проявили токсических свойств во всем диапазоне исследованных концентраций. Пилларарены LT-50 и DNS-trat-I обладали способностью снижать цитотоксичность ионов Ag^+ . Охарактеризована способность водорастворимых пиллараренов LT-50, LT-45, DNS-268, DNS-trat-I индуцировать апоптоз. В концентрации 500 мкг/мл ни один из исследованных пиллар[5]аренов не вызывал повышения доли апоптотических клеток в сравнении с вариантом без обработки.