

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский технологический
университет «МИСИС»

На правах рукописи

Савин Никита Александрович

Воздействие тиазолидиндионов на рельеф поверхности и механические свойства
клеточной стенки дрожжевых грибов рода *Candida*

1.5.2 – «Биофизика»

Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

кандидат физико-математических наук,
Петр Владимирович Горелкин

Москва - 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Строение клеток дрожжей: цитоплазматической мембраны, клеточной стенки	10
1.2. Структурные свойства дрожжей и методы их изучения	13
1.2.1. Применение зондовых методов микроскопии в изучении дрожжей <i>Candida spp.</i>	14
1.2.2. Применение методов электронной микроскопии в изучении дрожжей <i>Candida spp.</i>	29
1.2.3. Применение конфокальной микроскопии в исследовании дрожжей <i>Candida spp.</i>	37
1.2.4. Сравнение методов	41
1.3. Биологическая активность лекарственных препаратов и их физико-химические свойства	44
1.3.1. Биологическая активность лекарственных препаратов и их физико-химические свойства	44
1.3.2. Биологическая активность противогрибковых препаратов групп азола и эхинокандина и их воздействие на дрожжи	46
1.4 Выводы по главе	51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	52
2.1 Объект исследования, оборудование и реактивы	52
2.2 Модификация субстрата и поробоподготовка дрожжевых клеток	55
2.3 Сканирующая ион-проводящая микроскопия, разработка методики	57
2.4 Атомно-силовая микроскопия	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	63
3.1. Изучение топографии наноразмерных структур методом СИПМ	63
3.1.1. Влияние коммерческих противогрибковых препаратов на поверхностную структуру <i>C. Parapsilosis</i> ATCC 22019	63
3.1.2. Влияние разрабатываемых противогрибковых препаратов на поверхностную структуру <i>Candida spp.</i>	66
3.1.3. Сравнение воздействия препаратов на дрожжи <i>Candida spp.</i>	74
3.1.4. Селективность препарата L-173	75
3.2. Изучение механических свойств наноразмерных структур методом СИПМ	78
3.1.1. Апробация СИПМ методики для измерения механических свойств	78

3.2.2. Механические характеристики клеток <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	80
3.2.3. Влияние противомикробных препаратов на клетки млекопитающих	84
3.3. Изучение биологической активности противогрибковых препаратов	85
3.4. Выводы по главе	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	98
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	99
БЛАГОДАРНОСТИ	111
ПРИЛОЖЕНИЕ А	112
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	113
ПРИЛОЖЕНИЕ В	114
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	124
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	131

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Современные методы микроскопии позволяют изучать наноразмерные структуры микроорганизмов и широко используются при проверке эффективности антимикробных препаратов [1 – 4]. Однако, на данный момент нет сообщений об использовании методов, позволяющих одновременно оценивать топографию и механические свойства микроорганизмов в физиологическом растворе неинвазивно. Сканирующая ион-проводящая микроскопия (СИПМ) позволяет изучать поверхностные структуры биологических образцов и воздействие на них лекарственных препаратов без фиксации и в нативной среде, а также визуализировать бактерии и дрожжи [5, 6]. Другими преимуществами метода СИПМ среди методов зондовой микроскопии, к примеру, атомно-силовой микроскопии (АСМ) являются: отсутствие боковых сил воздействия зонда на образец; уменьшение «высотного артефакта» (занижение высоты мягкого объекта на 10 % у метода СИПМ против 70 % у метода АСМ); уменьшение угла наклона пипетки, что позволяет исследовать морфологию и рельеф поверхности объекты с почти вертикальными наклонами поверхности; увеличенная скорость визуализации [7 – 8]. Данные, полученные методом СИПМ, расширяют понимание механизмов, протекающих на поверхности клеточной стенки дрожжей при разрушении клеточной стенки, цитоплазматической мембраны и других структур клетки.

Наблюдается рост количества новых патогенных штаммов дрожжей и их резистентности к клиническим противогрибковым препаратам [9 – 12]. В связи с чем остро стоит потребность в новых методах определения противогрибковой эффективности новых препаратов. Метод СИПМ на данный момент применялся только в изучении клеток млекопитающих, а применяемая в нем методика сканирования не позволяет изучать клетки, которым присуща клеточная стенка. Поэтому разработка нового метода изучения структуры патогенных клеток в физиологических условиях так актуальна.

В настоящее время при скрининге противогрибковых препаратов исследуют такие структуры как цитоплазматическую мембрану и клеточную стенку дрожжей так как они представляют собой мишень воздействия антимикробных агентов [13]. Чтобы продемонстрировать возможности использования СИПМ для изучения этих образцов, в данной работе было исследовано воздействие препаратов азольной и эхинокандиновой групп, а также их гибридов, находящихся на данный момент в разработке. Эргостерин является биорегулятором текучести липидов, асимметрии мембран и отвечает за целостность мембран грибковых клеток [14]. Ключевым условием целостности мембран

является отсутствие метильных групп у встроенных стероидов. Основной мишенью азолов является гем-белок, который сокатализирует цитохром Р-450-зависимое 14 α -деметилование ланостерола [15]. Ингибирование 14 α -деметиلاзы приводит к истощению запасов эргостерина, что вызывает образование плазматической мембраны с измененной структурой и функциями. Противогрибковая активность триазолов (флуконазола, итраконазола и вориконазола) частично зависит от ингибирования цитохрома Р-450-зависимой 14 α -стеролдеметилазы [16, 17]. Эхинокандины проявляют ингибирующую активность в отношении β -1,3-d-глюкансинтазы, которая является основным структурным полисахаридом клеточной стенки и состоит из двух субъединиц: Fks1p и Rho1p. Fks1p отвечает за ремоделирование клеточной стенки, а Rho1p выполняет регуляторную функцию, включающую синтез β -1,3-d-глюкана [18].

Противогрибковые препараты (например, итраконазол, эконазол и кетоконазол) также способны проявлять противораковую активность [19, 20]. Такое сочетание свойств может способствовать разработке новых методов лечения онкологических больных, а также больных грибковыми заболеваниями. Тиазолидиноны являются одной из перспективных групп соединений с противовоспалительной, антибактериальной и противоопухолевой активностью [21].

В 2022 г. ВОЗ представила обновленный список приоритетных грибковых патогенов, против которых рекомендуется разработка новых противогрибковых препаратов [22]. В данной работе в качестве образцов были изучены следующие возбудители из предложенного списка: *Candida albicans* (критическая приоритетная группа), *Candida parapsilosis* (высокоприоритетная группа) и *Candida krusei* (средняя приоритетная группа).

Таким образом, полученные методом СИПМ топография и модуль Юнга поврежденных структур клеточной стенки и полисахаридов на ее поверхности позволят в дальнейшем определять эффект воздействия препаратов как качественно, так и количественно. Внешние изменения структуры поверхности клетки косвенно выражают процессы, проходящие внутри клетки, такие как нарушение механизмов синтеза ее элементов или разрушение самих компонентов в структуре клеточной стенки.

Настоящая диссертационная работа направлена на изучение рельефа поверхности клеточной стенки дрожжей *Candida spp.* и воздействия на нее коммерческих и экспериментальных противогрибковых препаратов при помощи новой разработанной методикой сканирующего ион-проводящего микроскопа. Разработана методика сканирования СИПМ позволяющая, в отличие от ранее используемой, изучать не только топографию дрожжей, но и их упругие свойства без использования механической или

химической фиксации образца с низкой адгезией к подложке, таких как микроорганизмы с клеточной стенкой. Получены топография, профили поверхности, величина глубины деформации и значение модуля Юнга клеточной стенки микроорганизмов *Candida spp.* контрольных групп и обработанных противогрибковыми препаратами, а также дескрипторы биологической активности этих лекарств. По результатам исследования определены эффекты воздействия на поверхностную структуру находящихся в разработке противогрибковых препаратов.

Цель и задачи работы.

Цель работы состоит в исследовании влияния тиазолидиндионов и азолов, приводящих к разрушению оболочки дрожжей, на механические свойства клетки и структуру клеточной стенки методом сканирующей ион-проводящей микроскопии.

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие задачи:

1. Разработать математическую модель (на основе положения о расклинивающем давлении) для измерения механических свойств клеточной стенки методом СИПМ. Рассчитать силу прилагаемую нанокapилляром (радиусом 50 и 30 нм) к поверхности капли декана, основанную на данной модели.

2. Разработать методику получения топографии и измерения механических свойств поверхности дрожжей *Candida spp.* методом СИПМ, которая позволит упростить пробоподготовку образца без использования токсичных реагентов, проводить сканирование в физиологическом растворе и снизить механическое воздействие зонда на образец.

3. Получить топографию, построить профили поверхности живых клеток дрожжей рода *Candida spp.* контрольной группы и группы после воздействия на них тиазолидиндионов и азолов. Определить эффект воздействия на структуру поверхности клеточной стенки гибридов тиазолидиндионов и выявить закономерности влияния заместителей (этиловой, пропиловой, тетрабутановой, хлорфениловой, фениловой, хлорфениловой, дифторфениловой группами) в арилиденовой части тиазолидин-2,4-диона и триазола на рельеф клеточной стенки и фунгицидную активность.

4. Рассчитать величину модуля Юнга поверхности клеточной стенки дрожжей *C. parapsilosis* ATCC 22019, подвергшейся воздействию препаратов групп азолов, эхинокандинов и гибридов тиазолидиндионов.

5. Рассчитать в программе «MarvinSketch» при помощи полуэмпирического метода, основанном на модели «Chemaxon», дескрипторы биологической активности гибридов тиазолидиндионов и определить их интервалы оптимальной биодоступности.

Научная новизна.

1. При помощи новой разработанной методики сканирующей ион-проводящей микроскопии были получены изображения рельефа поверхности с разрешающей способностью в 30 нм и определен модуль Юнга различных разновидностей дрожжей рода *Candida spp.* в физиологическом растворе (0,9% раствор NaCl) без фиксации клеток с малым механическим воздействием на образец в совокупности, что ранее не было получено при помощи электронных или зондовых методов микроскопии.

2. Установлено воздействие тиазолидиндионов (L-272, L-273, L-274, L-98R, 17b, L-170, L-173) на поверхностную структуру клеточной стенки *Candida spp.* Выявлены закономерности влияния заместителей в арилиденовой части гибридной молекулы тиазолидин-2,4-диона и триазола на рельеф поверхности, фунгицидную активность и степень их безопасности.

3. Впервые определен модуль Юнга поврежденных участков клеточной стенки, подвергшейся лизису, и новообразований, вызванных разрушением мембраны клетки.

Практическая значимость.

1. С использованием разработанной методики СИПМ получены данные о топографии и механических свойствах поверхностной структуры дрожжей в жидкости без химической фиксации клеток, что применяется в исследованиях образцов, имеющих клеточную стенку.

2. Полученные в работе результаты о влиянии заместителей в арилиденовой части на фунгицидный эффект и цитостатический эффект относительно опухолевых клеточных линий противогрибковых препаратов группы тиазолидиндионов применяются при реализации проектов (Федеральная программа «Приоритет 2030». Стратегический проект «Биомедицинские материалы и биоинженерия», РНФ номер: 22-23-00160), направленных на поиск новых противогрибковых препаратов широкого спектра действия.

Практическую значимость подтверждают акты внедрения и применения компаний:

– ООО «Дермавитал Групп»; Акт внедрения методики «Измерение топографии и механических свойств поверхностной структуры дрожжей, подверженных действию инновационных препаратов, обладающих противогрибковой активностью, методом сканирующей ион-проводящей микроскопии» представлен в приложении А.

– ООО «Дермавитал Групп»; Акт о применении результатов диссертационной работы Н.А. Савина «Исследование физических процессов, протекающих на поверхности клеток дрожжей, при взаимодействии с синтетическими органическими веществами, обладающими противогрибковой активностью» представлен в приложении Б.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Разработанный на основе модели двойного электрического слоя метод СИПМ позволяет локально измерять величину модуля Юнга поврежденных участков клеточной стенки *Candida spp.* без повреждения структур.
2. Эффективные дозы противогрибковых препаратов, находящихся на стадии разработки, определенные на основе топографии поверхности *Candida spp.*.
3. Эффект воздействия тиазолидиндионов на *Candida spp.*; закономерность влияния заместителей в арилиденовой части тиазолидин-2,4-диона на фунгицидную активность.
4. Интервалы оптимальной биодоступности тиазолидиндионов, установленные на основе метода количественного отношения «структура-активность» в совокупности с данными СИПМ метода.

Степень достоверности.

Достоверность полученных результатов обеспечивается: широким спектром биологического материала; использованием современных исследовательских методов зондовой микроскопии; общепринятой техникой эксперимента; большим количеством экспериментально полученных значений, повторно воспроизведенных на различных посевах каждой клеточной линии. Статистическая обработка проводилась в программе «OriginPro 2016».

Апробация результатов

Апробация результатов проводилась на различных международных конференциях: BioSPM-2022, 27 ноября 2022 г.; BioSPM-2021, 25 ноября 2021 г.; M&M 2021 Microscopy & MicroAnalysis, 28 июля 2021 г.; Biophysical Society 2020 Annual Meeting, 15.11.2020.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 работ, из них 5 статьи напечатанных в рецензируемых журналах, которые входят в список WoS или Scopus, и 2 тезиса опубликованных в сборниках докладов материалов конференций.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в анализе литературных данных, разработке методики сканирования СИПМ, пробоподготовке образцов, получении топографии и карт глубины деформации методом СИПМ, обработке и анализе данных, описании результатов и выводов. Материалы для исследований предоставлены: используемые противогрибковые препараты – проф. Левшин И.Б., клеточные линии дрожжей – доцент Грамматикова Н.Э. от "Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе"; изображения рельефа клеток дрожжей, полученных

методом АСМ – Ефремов Ю.М. от Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, библиографии, приложений. Общий объем диссертации составляет 175 страниц. Библиография содержит 153 наименования, в число которых включены три работы автора по теме диссертации.

ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Строение клеток дрожжей: цитоплазматической мембраны, клеточной стенки

У дрожжевой клетки присутствуют основные структурные элементы эукариотической клетки, тем не менее, у нее имеются элементы свойственные бактериям или грибам. В числе таких структур имеется жесткая клеточная стенка как у растений, а также уникальная для микроорганизмов капсула. В отличие от растений, в дрожжах отсутствуют хлоропласты и накапливается гликоген, что свойственно животной клетке. Как и животную клетку, дрожжи окружены цитоплазматической мембраной, в состав которой входят фосфолипиды, поверхностные и интегральные белки, стероиды. Основными функциями мембраны дрожжевой клетки является барьерная и транспортная, отвечающие за проницаемость и перенос веществ, соответственно. Основными фосфолипидами мембран, образующих бифосфолипидный слой, являются фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, на общую долю которых приходится до 90 % фосфолипидов. Белковые молекулы, которые погружены в мембрану состоят из ферментов, функцией которых заключена в трансмембранном переносе различных веществ, синтезе клеточной стенки, расщеплении и построении капсульных полисахаридов. Средняя толщина мембраны составляет от 8 до 10 нм. Химический состав тех или иных молекул, образующих оболочку дрожжевой клетки, как правило незначительно отличается среди видов клеток [23].

Наибольший интерес в данной работе представляет собой клеточная стенка основной функцией которой является защита внутреннего содержания от осмотического разрыва. Основной состав клеточной стенки это – глюканы и хитин. Клеточная стенка грибов, в том числе дрожжей, имеет сродство с бактериальными или растительными клеточными стенками, при этом ее внеклеточный материал матрикса схож с клетками млекопитающих, так как состоит из β -связанных гликанов, образующих волокна. Эти гликаны образуют лентообразные или спиральные структуры. Основными отличиями от гликанов бактерий или растений являются разные сшивающие молекулы. Так у бактерий гликаны сшиты пептидами, а у растений гликаны содержат сшивающие фенольные соединения и полисахариды, способствующие перекрестным ассоциациям за счет водородных связей [24].

Главным компонентом, образующим волокнистый каркас клеточной стенки, является β 1,3-глюкан. Его максимальная длина волокна может достигать до 600 нм. в продольном направлении, но в разветвленном состоянии полимера существенно сокращается, в зависимости от длины разветвления [25]. В основном β 1,3-глюкан имеет спиральную конформацию, состоящую из одной полисахаридной цепи или из трех цепей с водородными связями, объединение которых образует сеть волокон с диаметром от 10 до 30 нм [26]. β 1,3-глюкан связан с β 1,6-глюканом, сильно разветвленным полисахаридом, связывающим хитиновые волокна.

Прочность клеточной стенки обеспечивается наличием такого компонента как хитин. Наиболее распространенной формой хитина в стенках дрожжей является микродомены кристаллического α -хитина, который гликозидно связан с невосстанавливающими ветвями β 1,3-глюкана и β 1,6-глюкана [27]. Структура аналогична структуре α -целлюлозы с антипараллельными цепями N -ацетилглюкозамина, связанными водородными связями. Водородные связи α -хитина с участием амидных групп придают дополнительную стабильность молекулы и вместе с гидрофобным ядром, образованным ацетамидометильными группами, предотвращают проникновение воды и растворение хитина [27]. Присутствие хитина в клеточной стенке способствует ее нерастворимости в жидкостях, а включение хитина в глюкановый матрикс делает стенку дрожжей щелоченерастворимой фракцией [28]. Синтез хитина векторный, с субстратами и регуляторными участками внутри клеток, сам же продукт внеклеточный. Это основано на работах по микроскопии и исследованию участков работы мембрано-непроницаемых ингибиторов [29].

Последним элементом клеточной стенки являются маннопротеины, представляющие собой высокогликозилированные полипептиды. Такие белки расположены на поверхности клеточной стенки дрожжей, и делятся на три группы, в зависимости от их расположения в стенке. К первой группе относятся растворимые белки клеточной стенки, нековалентно адсорбируются на глюкановом матриксе. Ко второй относят группу белков принадлежащих к Риг-семейству структурно родственных молекул. Они ковалентно связаны с глюканом за счет сложноэфирной связи между глютаминами. Их роль еще не до конца изучена. И к третьей группе относятся белки клеточной стенки, прикрепленные к β 1,3-глюкану с помощью гликозилфосфатидилинозитолового якоря и β -1,6-глюкана. Функция этих белков состоит в поддержании нормальной клеточной морфологии, а именно: трансмембранная передача сигналов, синтез и защитная функция клеточной стенки, клеточная адгезия, гидрофобность поверхности, устойчивость к

литическим ферментам [30]. Кроме того, маннопротеины клеточной стенки играют важную роль в устойчивости дрожжей к дегидратации-регидратации [31].

Маннаны входят в состав капсулы дрожжевой стенки, представляющей собой полисахаридный слой вокруг клетки. Данный слой может быть тонким (микрокапсула) или же двукратно превышать по толщине диаметр всей клетки. Объем капсулы зависит от как от вида дрожжей, так и то внешней среды. Состав внеклеточных капсульных полисахаридов включает в себя различные соединения, и в целом делится на следующие группы: фосфоманнаны, α -Глюканы, β -Маннаны, гетерополисахариды. Из основных функций капсулы выделяют следующие: адгезия клеток к поверхности твердого субстрата, водное снабжение, питание клетки, аккумуляция бактерий, накопление питательных веществ [32]. Исходя из общих представлений о структуре дрожжей, на рисунке 4 представлена схематическое изображение оболочки дрожжевой клетки для более наглядной репрезентации.

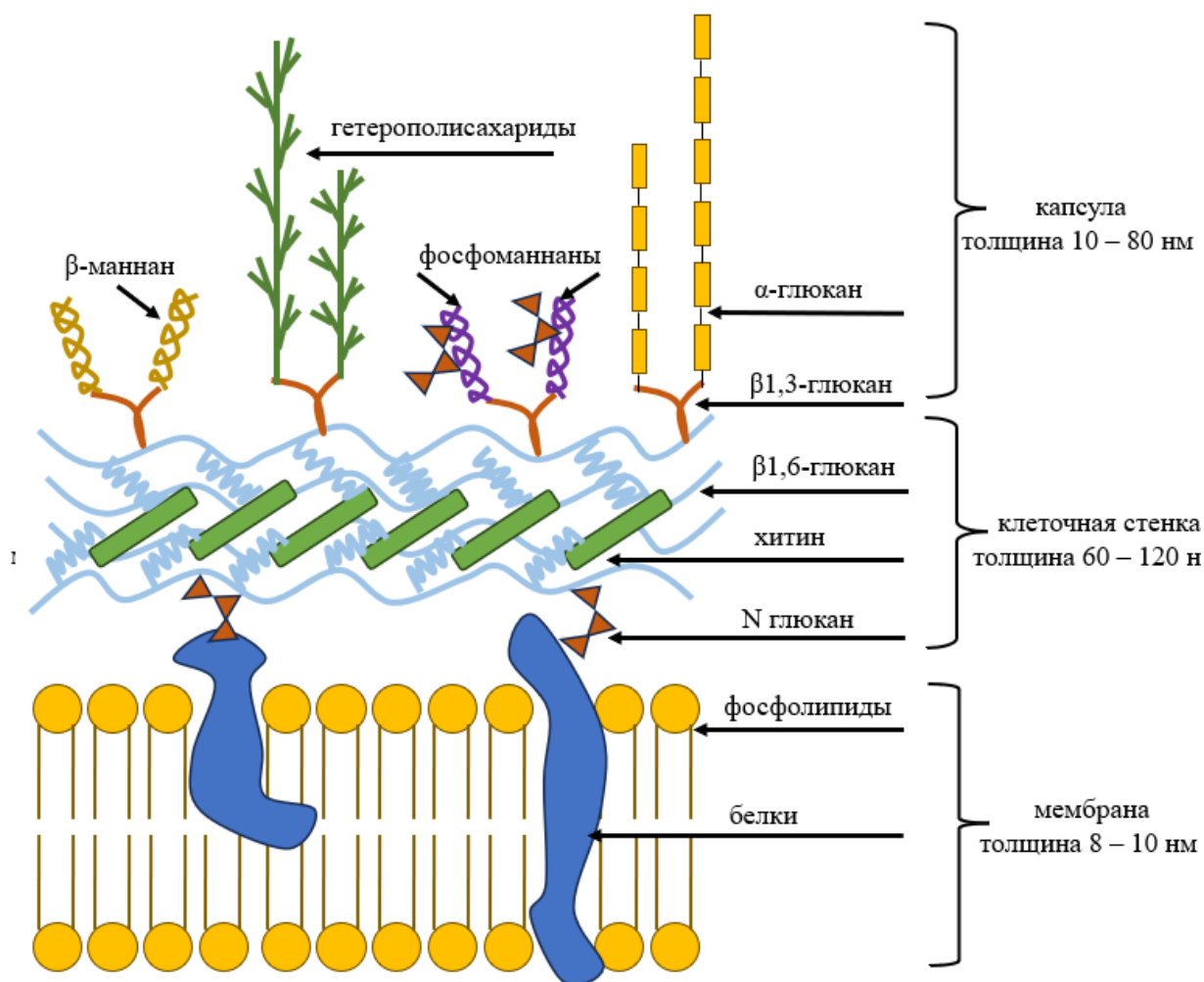


Рисунок 1 – Схематическое представление дрожжевой оболочки и ее элементов

1.2. Структурные свойства дрожжей и методы их изучения

Современные методы высокоразрешающей микроскопии активно используются для исследования морфологических и функциональных свойств единичных дрожжевых клеток и действия на них лекарственных препаратов. Широко применяются методы зондовой микроскопии для визуализации оболочки и измерения жесткости клеточной стенки дрожжей. Методы АСМ обширно используются в клеточной биологии [33, 34] для визуализации и изучения функциональных свойств живых клеток. Пространственное разрешение изображений зависит от радиуса острия зонда. Более того, наноразмерные зонды способны измерять силы в широком диапазоне (приблизительно от 0,1 до 100 нН), которые действуют на отдельные молекулы, что позволяет определять силы небольших межмолекулярных, межклеточных и сильных ковалентных взаимодействий [35 – 36]. Возможность наблюдать структуру поверхности или локализацию адгезии единичных молекул и механических свойств клетки позволяет проводить оценку воздействия противомикробных препаратов на штаммы бактерий и грибов или выявлять резистентность [37, 38].

В свою очередь методы растровой и просвечивающей электронной микроскопии (РЭМ и ПЭМ) позволяют получать снимки клеточной стенки и биопленки дрожжей с более высоким пространственным разрешением порядка 5 – 100 нм для РЭМ и 1 – 30 нм для ПЭМ. Метод дает информацию не только о структуре поверхности (РЭМ), внутриклеточной структуре срезов (ПЭМ). Следует отметить, что большинство экспериментов проводится *in vitro*, однако, имеются сообщения и об опытах по изучению *Candida spp.* на моделях *in vivo* [39 – 42].

Отличительным преимуществом методов зондовой (СЗМ), электронной (ЭМ) и конфокальной микроскопии (КМ) от классических оптических методов является возможность исследования наноструктуры биологических объектов. К примеру, изменения, возникающие в ходе лизиса клеточной стенки дрожжей, толщина которой составляет порядка 100 – 250 нм, невозможно зафиксировать с помощью оптического микроскопа, то же справедливо и для образования биопленок на клетках. Изучение таких процессов, их динамики и причины возникновения вносит существенный вклад в понимание принципа действия, качественного и количественного анализа эффективности противогрибковых препаратов, что способствует разработке более эффективных препаратов. В данном обзоре рассмотрены последние достижения в области исследования дрожжей *Candida spp.* полученные благодаря микроскопии высокого разрешения, чтобы

продемонстрировать как технология расширила понимание о процессах, протекающих на клеточной поверхности, механики и структуры клеток.

1.2.1 Применение зондовых методов микроскопии в изучении дрожжей *Candida spp.*

Атомно-силовая микроскопия [43] является передовым методом визуализации сверхвысокого разрешения, который дает возможность решать фундаментальные и практические задачи в области клеточной биологии. Метод АСМ способен визуализировать клетки в физиологическом растворе в режиме реального времени для последующего анализа топографии и механических свойств. В связи с тем, что, при визуализации поверхности методом АСМ на образец оказывается механическое воздействие, необходима фиксация образца на поверхности подложки химическими методами [44].

Основной принцип работы АСМ заключается в регистрации силового взаимодействия между зондом и поверхностью образца [45]. При сканировании образец фиксируют на пьезоэлектрическом сканере, способном претенциозно перемещаться в трех измерениях. Такой режим известен как сканирование образцом, возможно также сканировать перемещая в пространстве острие, сканирование острием, однако такая конструкция дорогостоящая. Острие установлено на гибкий кантилевер, на который светят лазерным лучом, и при механическом отклонении острия от образца, фотодиодом фиксируется отклонение лазерного пучка. Величина такого отклонения зависит от сил взаимодействия между острием и образцом.

Существует два режима сканирования АСМ для визуализации биологических объектов – контактный и динамический. При контактном режиме зонд находится в непосредственном контакте с поверхностью образца. Преимуществами такого режима являются высокая скорость сканирования, возможность измерение распределения латеральных сил по поверхности образца и высокое качество изображений поверхности с развитым рельефом. Тем не менее, немаловажным недостатком является проблематичность при сканировании мягких и незакрепленных биологических образцов, по этой причине данный режим почти не используется при изучении дрожжей *Candida spp.* В динамическом режиме, включающем в себя полуконтактный и бесконтактный режимы, кантилевер колеблется таким образом, что зонд находится вблизи или немного выше поверхности образца [46, 47]. В таком режиме воздействие на образец минимально, следовательно повреждение мягких образцов менее вероятно, а разрешающая способность

для мягких образцов выше, хоть и скорость такого сканирования меньше, чем у контактного режима.

Несмотря на различные режимы сканирования, зонд АСМ прилагает силу на образец, что приводит к дрейфу незафиксированных клеток. Сканирование высушенных образцов позволяет добиться физической фиксации клеток на субстрат и избежать их дрейфа при сканировании методом АСМ. Однако, данное преимущество нивелируется невозможностью исследования живых клеток, что не позволяет изучать динамику изменения структуры поверхности и кинетику воздействия противогрибковых препаратов. Так как информация, полученная с дегидратированных клеток ограничена, самым распространенным применением АСМ в изучении дрожжей является анализ терапевтических свойств противогрибковых препаратов, основанный на данных о топографии грибка.

В работе Janeczko M. et al. [48] различными методами, включая АСМ, изучали терапевтические свойства 1,4-нафтохинона по отношению к *Candida albicans*. Замечено, что некоторые группы нафтохинонов, обладающие высокой фармакологической активностью, связанной с окислительно-восстановительными и кислотно-основными свойствами [49], проявляют противогрибковый эффект [50, 51].

В данной работе исследовались уже высушенные клетки. Анализ клеток *C. albicans* (рис. 1) демонстрирует, что дрожжи из контрольной группы (рис. 2 (А1)) обладают гладкой поверхностью и имеют правильную форму, в то время как обработанные нафтохиноном клетки имеют шероховатую поверхность (рис. 2 (Б1)). По фазово-контрастной визуализации видно, что клетки, обработанные нафтохиноном (рис. 2 (Б2)), мягче, чем клетки контрольной группы (рис. 2 (А2)). Выявлено, что у обработанных нафтохиноном клеток *C. albicans* сила адгезии меньше, чем у контрольной группы (рис. 2 (А3 и Б3)). Данное исследование демонстрирует возможность не только проводить профилирование с наноразмерным разрешением и сил адгезии, но и оценивать противогрибковую активность 1,4-нафтохинонов в отношении штаммов *C. Albicans* методом АСМ.

Метод АСМ позволяет выявлять эффекты незначительных изменений в составе клеточной поверхности и ее отклик при добавлении биоматериалов, при этом АСМ дает информацию о поверхности относительно экзополисахаридов, которыми покрыты биопленки клетки *Candida spp.* Известно [52, 53], что мед обладает антимикробными свойствами, которые опосредованы содержащимися в нем перекиси водорода и ингибина. Также мед эффективен при лечении различных бактериальных заболеваний [54 – 56]. В

связи с этим Ansari M. et al. [57] изучили влияние меда на образование биопленок *C. Albicans* и его разрушающее воздействие на биопленки *C. Albicans*.

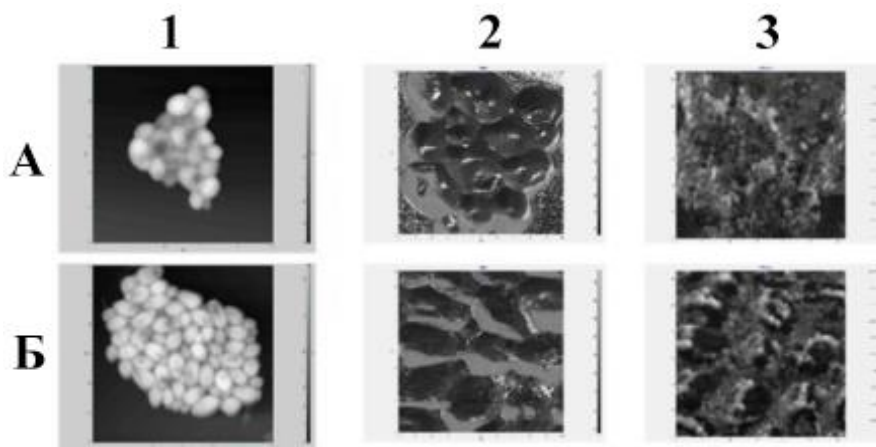


Рисунок 2 – Снимки клеток *Candida albicans* методом АСМ. (А) контрольные клетки *C. albicans*; (Б) клетки, обработанные нафтохиноном 8: (1) сигнал ошибки, (2) фазовый контраст, (3) адгезия, (4) жесткость, (5) высота; (Г) высота клеток в колонии [35]

В рассматриваемой работе биопленки иммобилизовали на субстрат глутаровым альдегидом. Такая модификация жестче фиксирует биологический микрообъект, нежели поли-L-лизин [57], что позволяет добиться лучшей адгезии между клеткой и субстратом. Однако исследования проводились на высушенной в газовой фазе биопленке, что негативно сказывается на ее структуре. Изображения получали в динамическом полуконтактном режиме с использованием острия радиусом в (10.0 ± 0.8) нм и углом схождения 22° . Такой режим позволяет проводить визуализацию с высоким разрешением и минимальным воздействием на образец, что весьма важно при сканировании такого хрупкого объекта с развитым рельефом.

АСМ изображения биопленок *C. albicans* демонстрируют, что в контрольной группе (рис. 3 (А)) грибок встроен в слой экзополисахаридов, которые равномерно распределены по поверхности. Данный слой отсутствует у групп клеток, обработанных медом (рис. 3 (Б и В)), и их значение высоты выше, чем у контрольной группы.

Таким образом выявлено, что после обработки медом толщина биопленки *C. albicans* уменьшается более чем вдвое. При этом значительно увеличивается шероховатость биопленки *C. albicans*, что связано с удалением экзополисахаридного слоя, который покрывает биопленку *C. albicans*. Данный слой препятствует проникновению противогрибковых препаратов в биопленку и поддерживает ее гладкую текстуру. Это согласуется с данными Lal et al. [58] демонстрирующими, что биопленки *C. albicans*

выделяют толстый слой экзополисахаридов, в котором клетки прикрепляются друг к другу, что защищает их от их внешней среды.

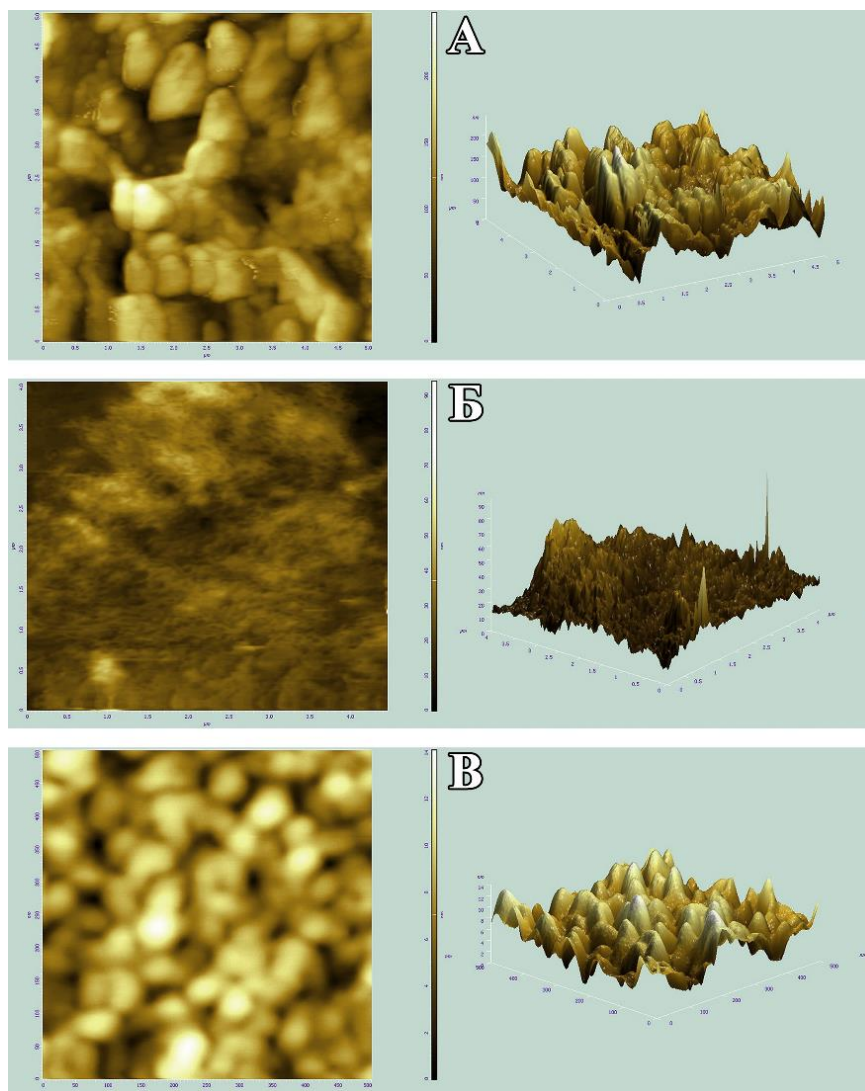


Рисунок 3 – АСМ микрофотографии *C. albicans* (А) биопленка контрольных клеток спустя 48 часов инкубации (высота 200 нм); (Б) и (В) биопленка инкубированных с медом (40 % по массе) в течение 48 часов (высоты 90 нм и 14 нм, соответственно) [57]

Оценка противогрибковых препаратов классическими методами клеточной биологии может быть весьма затруднительна. К примеру, масло цимбопогона (LGO) способно проявлять противогрибковую активность, которую возможно наблюдать на наноструктурном уровне [59]. И для корректной оценки таких свойств требуются методы микроскопии сверхвысокого разрешения. В связи с этим, Tyagi, A. et al. [60] оценили методом АСМ воздействие на морфологию *C. albicans* масел LGO в жидкой и газообразной фазах. Изображения высушенных клеток получали на АСМ, работающем в динамическом полуконтактном режиме.

АСМ изображения демонстрируют признаки противогрибковой активности, обработанной раствором или парами LGO, биопленки *C. albicans*. Методом АСМ выявлено уменьшение размера и высоты клеток (контрольная группа на рис. 4 (А)) обработанных LGO (рис. 4 (Б)) и парами LGO (рис. 4 (В)), что еще раз подтверждает возможность использования АСМ в изучении воздействия противогрибковых препаратов на грибе *Candida*.

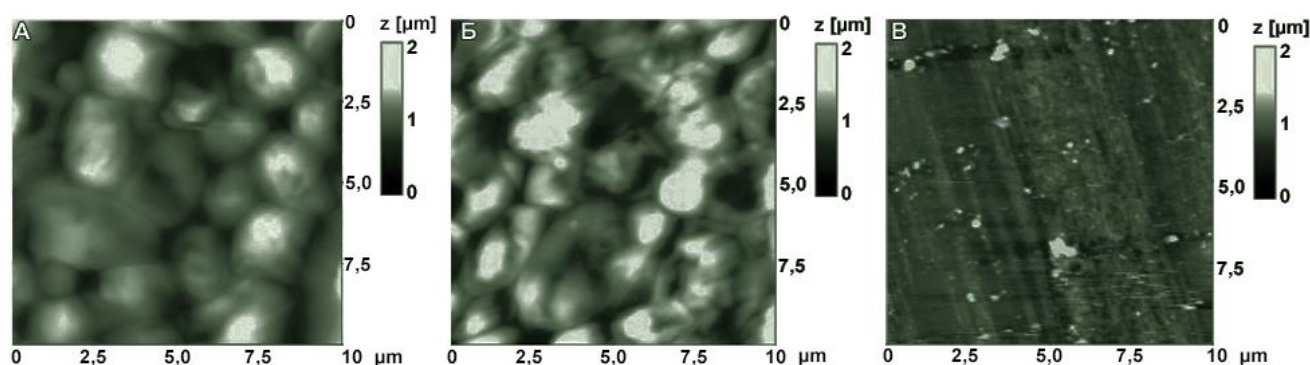


Рисунок 4 – Микрофотографии АСМ, демонстрирующие изменение высоты необработанных и обработанных (24 ч) клеток *C. albicans* от поверхности стекла: (А) необработанные (h 2000 нм), (Б) обработанные LGO (h 700 нм), (В) обработанные пары LGO (h) 100 нм) [60]

Отличительной особенностью АСМ в отличие от прочих методов микроскопии сверхвысокого разрешения является возможность сканирования поверхности живых клеток. Такой подход позволяет изучать быстропротекающие процессы в дрожжах *in vitro*. Handorf O. et. al. [61] изучали чувствительность биопленок *Candida albicans* к обработке холодной плазмой в течении минуты с короткими интервалами по времени. С помощью АСМ было углублено понимание морфологических изменений клеток после обработки биопленки плазмой. Благодаря АСМ методу визуализации определено, что для клеток, обработанных плазмой, характерна более сферическая форма, нарушение целостности структуры клетки, а также меньшее количество клеток по сравнению с контрольными клетками. Определение жизнеспособности клеток, после плазменной терапии, рассмотренным методом возможно применять в пищевой промышленности, где удаление биопленок представляет большой интерес.

В работе Martin-Yken et. al. [62] исследовали белки SMI1, которые участвуют в регуляции синтеза клеточной стенки *Candida albicans*. Исследование проводилось на дрожжах, находящихся в физиологическом растворе, с максимально прилагаемой к образцу силой в 1 нН, что безусловно благоприятно влияет на чистоту полученных

результатов. Методами АСМ выявлена структурообразующая роль белка SMI1 у *Candida albicans* и нарушение целостности клеточной стенки у мутантных штаммов без SMI1. Более того при помощи записи механических сил дрожжей также определено воздействие белка SMI1 на Модуль Юнга клеток и адгезию клеток друг к другу. Полученные данные возможно использовать при разработке противогрибковых препаратов направленных на SMI1. Несомненно, возможность визуализировать поверхностную структуру клетки на не обезвоженных образцах является перспективной в разработке медикаментов и изучении механизмов, протекающих на поверхности. Однако большинство работ по изучению живых дрожжей направлено на изучение механических свойств клеток.

Изучение адгезивных свойств клеток расширяет понимание процессов, проходящих на их поверхности, дает представление о поверхностном составе и белках адгезии. Метод АСМ позволяет исследовать механические свойства биологических объектов, что находит применения в различных сферах и актуально на данный момент времени. Aguayo S. et al. [63] используя атомно-силовой микроскоп оценили адгезию клеток *Candida albicans* к поверхностям из полиметилметакрилата (ПММА), поскольку данный компонент служит основным материалом [64] для изготовления зубных протезов. Чтобы получить контакт между дрожжами и зондом без механического отталкивания друг от друга, образец иммобилизовали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизинном либо дофамин гидрохлоридом (более предпочтительное покрытие для гифальных форм грибка) (рисунок 5).

Было установлено, что силы адгезии между *C. albicans* C1 и ПММА возрастают с увеличением времени контакта, аналогичная ситуация и с силами адгезии между ПММА и гифальными трубками (рисунок 6). Однако силы адгезии между ПММА и гифами в 20 раз выше, чем между ПММА и клеткой при максимальном времени контакта 30 с. Такой результат указывает на пластичность экспрессии адгезина клеток *C. albicans*. Схожая морфологически зависимая адгезия обнаружена и между ПММА и *C. albicans* штамма ATCC 10231; тем не менее сила адгезии между ПММА и гифами лишь в 4 раза выше, чем между ПММА и клетками (рисунок 6). Разница в силах адгезии между ПММА и клетками или гифом свидетельствует о наличии большого количества поверхностных адгезинов, позволяющих взаимодействовать с биоматериалом. Таким образом методом АСМ можно проводить измерения не только на стандартных субстратах для культивирования дрожжей, но и на поверхностях, где повышенная концентрация патогенного штамма *Candida* может приводить к инфекционным заболеваниям.

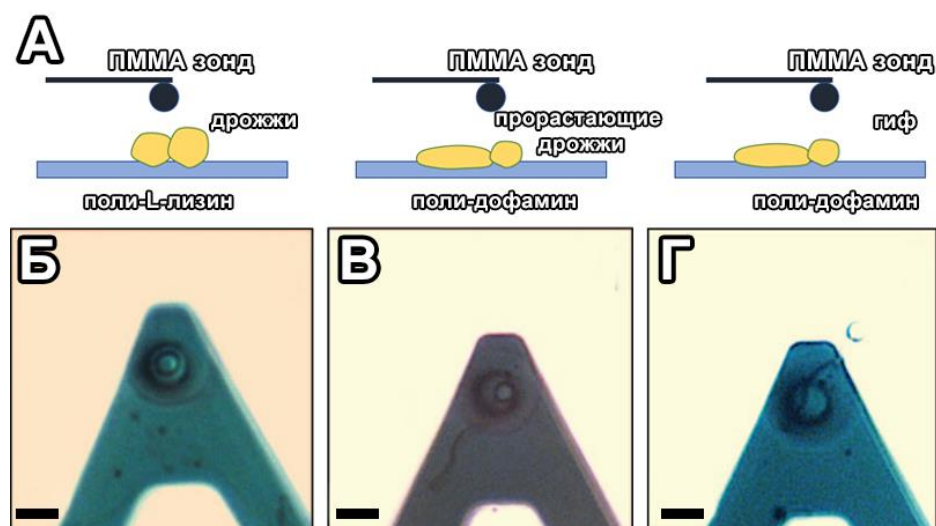


Рисунок 5 – (А) Схема установки для изучения адгезии между ПММА и *C. albicans*, единичных клеток и гифов; (Б – Г) оптические изображения зонда над клетками *C. albicans*, прорастающими дрожжевыми тубами и гифом соответственно (масштаб 10 мкм) [63]

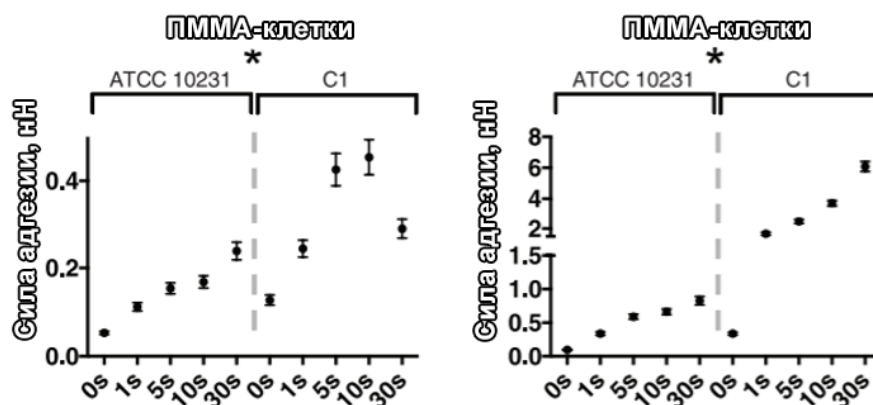


Рисунок 6 – Сравнение сил адгезии между *C. albicans* штамма 10231, *C. albicans* штамма C1 и ПММА при разном времени контакта (0–30 с) [63]

Еще одним применением АСМ при определении сил адгезии является изучение маннанов. Биопленка *C. albicans* содержит обширное количество внеклеточных α -глюканов, продуцируемых экзоферментом (GtfB), который секретирует *S. mutans*. В работе Geelsu Hwang et al. [65] исследовали находящиеся на клеточной стенке *C. albicans* маннаны, обеспечивающие связывание экзофермента GtfB, тем самым усиливая продуцирование глюкан-матрикса, а также модуляцию в биопленках бактериально-грибковых объединений.

В данном примере микробные клетки были иммобилизованы на предметном стекле, покрытом поли-L-лизин [65]. Такое покрытие позволяет сканировать клетки

различного размера, но при этом сила иммобилизации клеток ниже, чем у механического захвата в мембраны. Для исследования зонд АСМ был функционализирован экзоферментом GtfB [60]. Измерения живых клеток также проводились в физиологическом растворе по протоколу Hwang G et al. [65], при котором минимизируется воздействие зонда на образец.

Обнаруженные высокоадгезивные контакты между экзоферментом GtfB и клетками *C. albicans* (рис. 7 (А)) и низкоадгезивные взаимодействия между О-маннозилированными мутантами *C. albicans* могут использоваться для практического определения в колониях диких штаммов и мутантных штаммов. Сшивание острия АСМ с GtfB для исследования сил адгезии между GtfB-Candida позволяет выявить отличия между контактом адгезии GtfB и *C. albicans* дикого типа и мутировавших штаммов *C. albicans* (рис. 7 (Б)). В дополнение проведенный иммуноферментный анализ отмытых, после инкубации с GtfB, клеток *C. albicans* подтвердил результаты о слабой силе адгезии между GtfB и мутировавшими штаммами грибка (рис. 7 (В)). Представленная работа дополняет общее представление о возможностях метода АСМ по изучению сил адгезии.

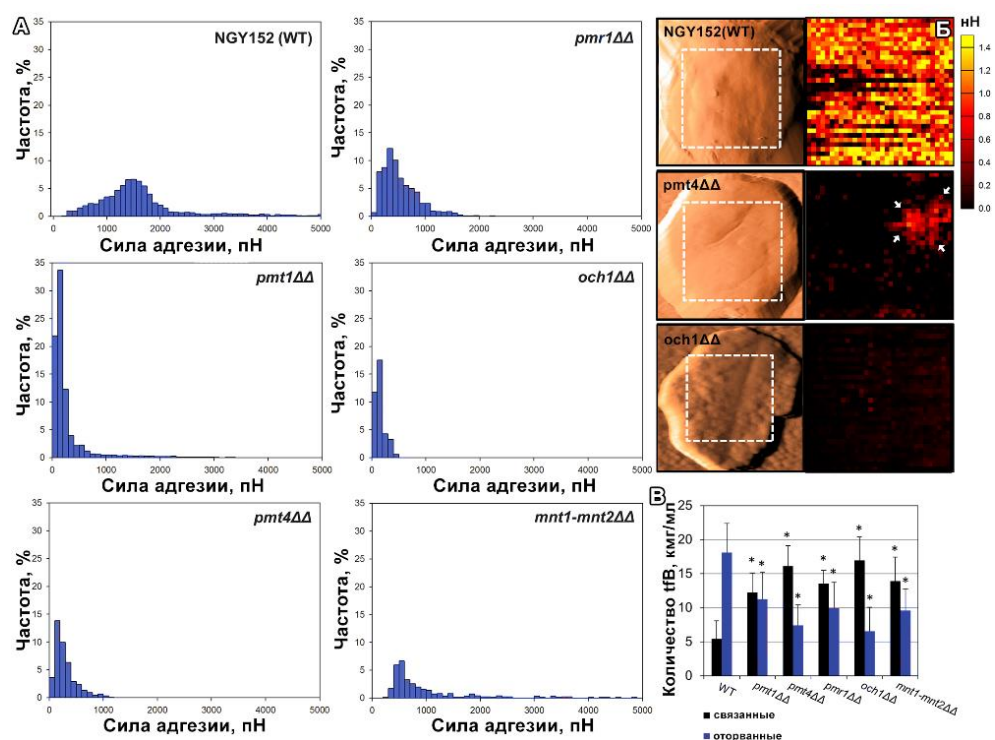


Рисунок 7 – (А) Гистограмма силы адгезии; (Б) АСМ снимки и топография сил адгезии для штаммов дикого типа WT и штаммов мутантных штаммов *pmt4ΔΔ* и *och1ΔΔ*; (С) количество GtfB, связанного на (и оторванного от) поверхности *C. albicans* [65]

Уникальной особенностью метода АСМ в изучении сил адгезии является возможность определять не только силы большого количества адгезинов или маннанов, но и проводить анализ механических сил единичных белков. David Alsteens et al. [66] проанализировали отдельные белки Als5p на клетках дрожжей. Для этого N-концы полноразмерных белков Als5p модифицировали эпитопной меткой V5 (рис. 8 (А)), обеспечивающей специфическое обнаружение с антителом анти-V5, прикрепленного к острию АСМ (рис. 8 (Б)) по протоколу Ebner et al. [67]. Измерения АСМ проводились в физиологических условиях, а клетки *Candida albicans* иммобилизовались путем фиксации в пористые поликарбонатные мембраны (Millipore), размер пор которых сопоставим с размером клеток. Данный метод иммобилизации клеток *Candida* весьма распространен [68, 69], так как позволяет жестко закреплять образец, однако выборка по размеру клеток ограничена.

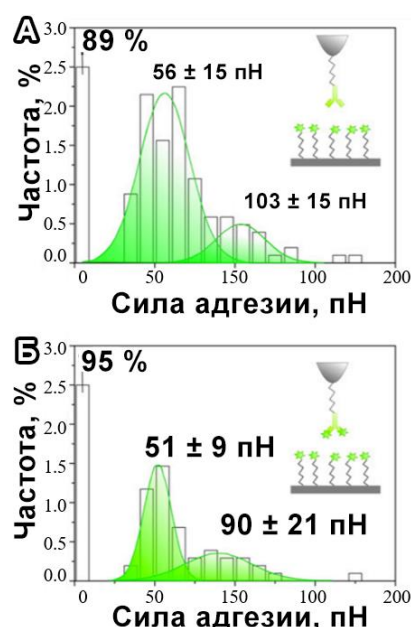


Рисунок 8 – (А) Гистограмма силы адгезии, полученная путем записи кривых силы между острием анти-V5 и поверхностью, модифицированной эпитопами V5; (Б) тот же эксперимент, но в присутствии свободных эпитопов V5 концентрацией 0.2 мг/мл [66]

Первоначально измеряли аналогичные силы между острием функционализированным анти-V5 и смоделированной поверхностью, функционализированной эпитопами V5 (рис. 8 (А)). Специфичность измеренного взаимодействия подтвердилась снижением частоты адгезии при введении свободных эпитопов как на поверхности модели (рис. 8 (Б)), так и на живых клетках (рис. 9). Затем сопоставили пространственные расположения белков Als5p, которые показали, что у

клеток дикого типа (рис. 10 (А)), на которые не воздействовали механически, белки распределены равномерно без каких-либо явных проявлений кластеризации (рис. 9 (Б)). У клеток, на которые воздействовали механически (рис. 10 (В)) замечено увеличение общей плотности белков на поверхности (рис. 10 (Г)), более того, белки не распределены равномерно и образуют кластеры (рис. 10 (Б и В)). Как показано на рис. 10 (Г) доля кластерных молекул увеличена.

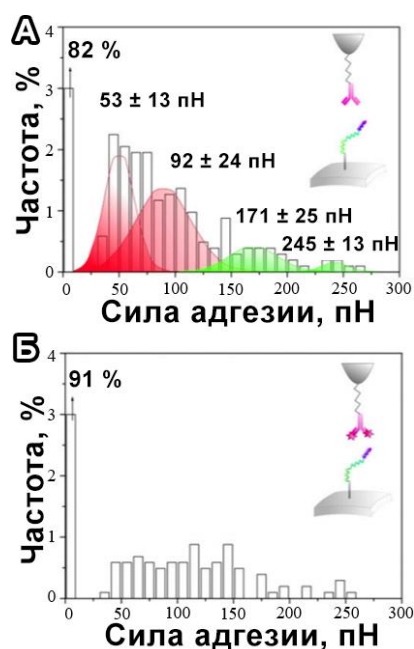


Рисунок 9 – (А) Гистограмма силы адгезии, полученная путем записи кривых силы между острием анти-V5 и клетками, экспрессирующими меченные V5 белки Als5p. (Б) Тот же эксперимент в присутствии 0.2 мг/мл свободных эпитопов V5 [66]

Локальное воздействие сил, величиной в пН, на живые дрожжевые клетки вызывает образование и распространение адгезивных контактов. Принудительная активация клеточной адгезии является распространенным биологическим явлением [70, 71]. Наблюдения [66] показывают, что силозависимая кластеризация адгезина служит общим механизмом активации клеточной адгезии. На начальной стадии растяжение и разворачивание Als5p с помощью острия АСМ увеличило количество конформаций, в которых предпочтительны гомологичные гидрофобные взаимодействия. Гидрофобные взаимодействия между повторяющимися фрагментами ДНК способствуют самоассоциации Als5p и привлечению других соседних белков [72]. Возможность определять силы адгезии единичных белков позволяет проводить количественную оценку адгезинов при контакте клетка-клетка, что является одним из важных факторов при изучении процессов проходящих на поверхности дрожжей.

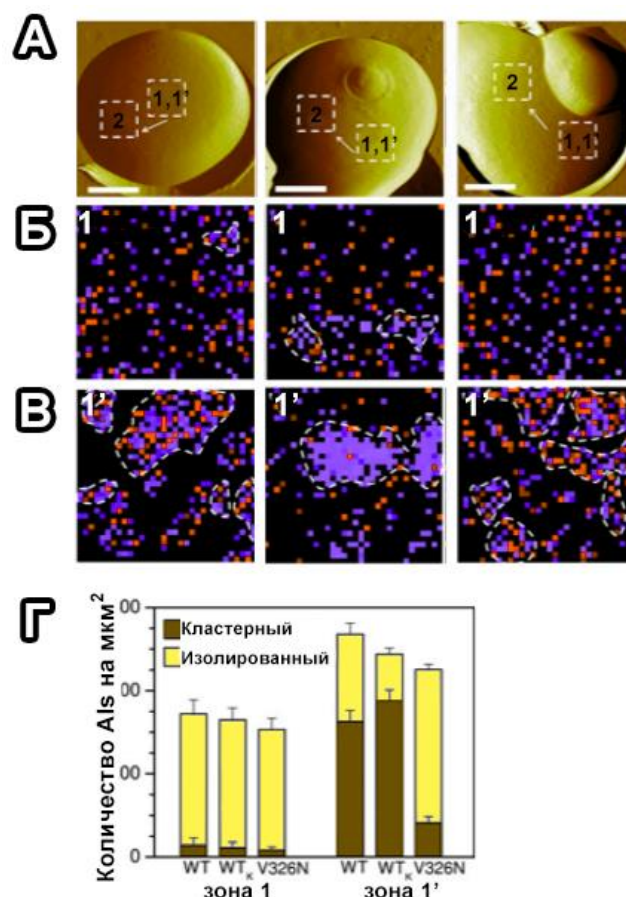


Рисунок 10 – (А) АСМ топография (масштабная линия: 1,5 мкм) *S. cerevisiae* дикого типа, экспрессирующих меченные V5 белки Als5p. (Б) Картирование силы адгезии (1×1 мкм) клеток, не подверженных механическому воздействию. Синий и красный пиксели соответствуют силам, меньшим и большим, чем 150 пН соответственно. (В) Картирование силы адгезии (1×1 мкм). (Г) Гистограммы количества белков Als на мкм², измеренное для клеток дикого типа (WT), убитых нагревом клеток дикого типа (WTk), мутантных клеток V326N [72]

Помимо визуализации морфологии и определения сил адгезии, АСМ может использоваться для определения силы взаимодействия между острием и образцом для картирования распределения сила-расстояние в режиме силовой спектроскопии. С помощью этой уникальной способности возможно исследовать механические свойства биологических образцов.

Использование метода АСМ сверхразрешения совместно с определением механических свойств дрожжей позволяет решать задачи, связанные с улучшением противогрибковой терапии. В исследовании Fabienne Quilès et al. [69] рассмотрено воздействие противогрибкового препарата каспофунгина который ингибируя β -1,3-

глюкансинтазу, действует как блокирующий агент синтеза клеточной стенки. Используя метод АСМ, авторы изучили влияние каспофунгина на состав, морфологию и механические свойства клеточной стенки двух штаммов *Candida*, один из которых WT (дикий тип) восприимчив к данному препарату, другой же CaspR обладает резистентностью.

В данном эксперименте клетки фиксировались в пористых мембранах и находились в физиологическом растворе и нормальных условиях по протоколу Kasas et al. [73]. Картирование механических свойств проводилось на поверхности отдельных клеток с приложением минимальных сил (3 нН) острием без модификаций, при таких условиях на клетку практически не оказывается никакого воздействия.

Определено, что в отличие от грибка контрольной группы, имея однородную клеточную форму (рис. 11 (А и Г)), а в группах инкубированных с каспофунгином, среди грибка WT наблюдаются клетки с искривленной неправильной формой (рис. 11 (Б)). На снимках при более высоком разрешении у одиночных клеток наблюдается шероховатая поверхность (рис. 11 (Б)). У всей группы из штамма WT выявлены повреждения мембраны при увеличенной концентрации каспофунгина (рис. 11 (В)). Схожие изменения обнаружены и на грибке мутантных штаммов *C. albicans*, в аналогичном исследовании, в котором также проявляется разрушение клеточной стенки [74]. Предполагается, что при низкой концентрации каспофунгина у клеток CaspR возникают мутации, приводящие к возникновению резистентности к антигрибковому препарату, полностью предохраняющие клетку от эффектов лекарственного средства (рис. 11 (Д)). Однако при высокой концентрации для резистентного штамма CaspR некоторые клетки приобретали более рыхлую форму (рис. 11 (Е)). Эти данные свидетельствуют о том, что терапия каспофунгином также влияет на штаммы, которые ранее считались устойчивыми к препарату и что ответ на противогрибковый препарат является гетерогенным.

По кривым сил возможно изучать механические изменения в клетках, вызванные активностью препарата в отношении синтеза β -1,3-D-глюкана. По картированию силы деформации поверхности клеток дрожжей (рис. 12 (А)), можно напрямую судить о ее механической прочности. Полученный результат модулей упругости в контрольной группе клеток WT и CaspR (рис. 12 (В и Е), рис. 9) согласуется со значениями, полученными при измерении других штаммов дрожжей [75]. При добавлении небольших доз каспофунгина значительного изменения модуля упругости не происходит, однако, некоторые клетки становятся более мягкими (рис. 12 (Г и Ж)). Такая стабильность модуля упругости объясняется переориентировкой синтеза клеточной стенки для сохранения прочности, что также согласуется с другими исследованиями реакций грибка на

воздействие каспофунгина [76, 77]. Однако при обработке высокими дозами каспофунгина у клеток WT модуль упругости снижается в 6 раз (рис. 12 (Д) и 12 (З)), что указывает на неспособность грибка адаптироваться к повышенным дозам препарата.

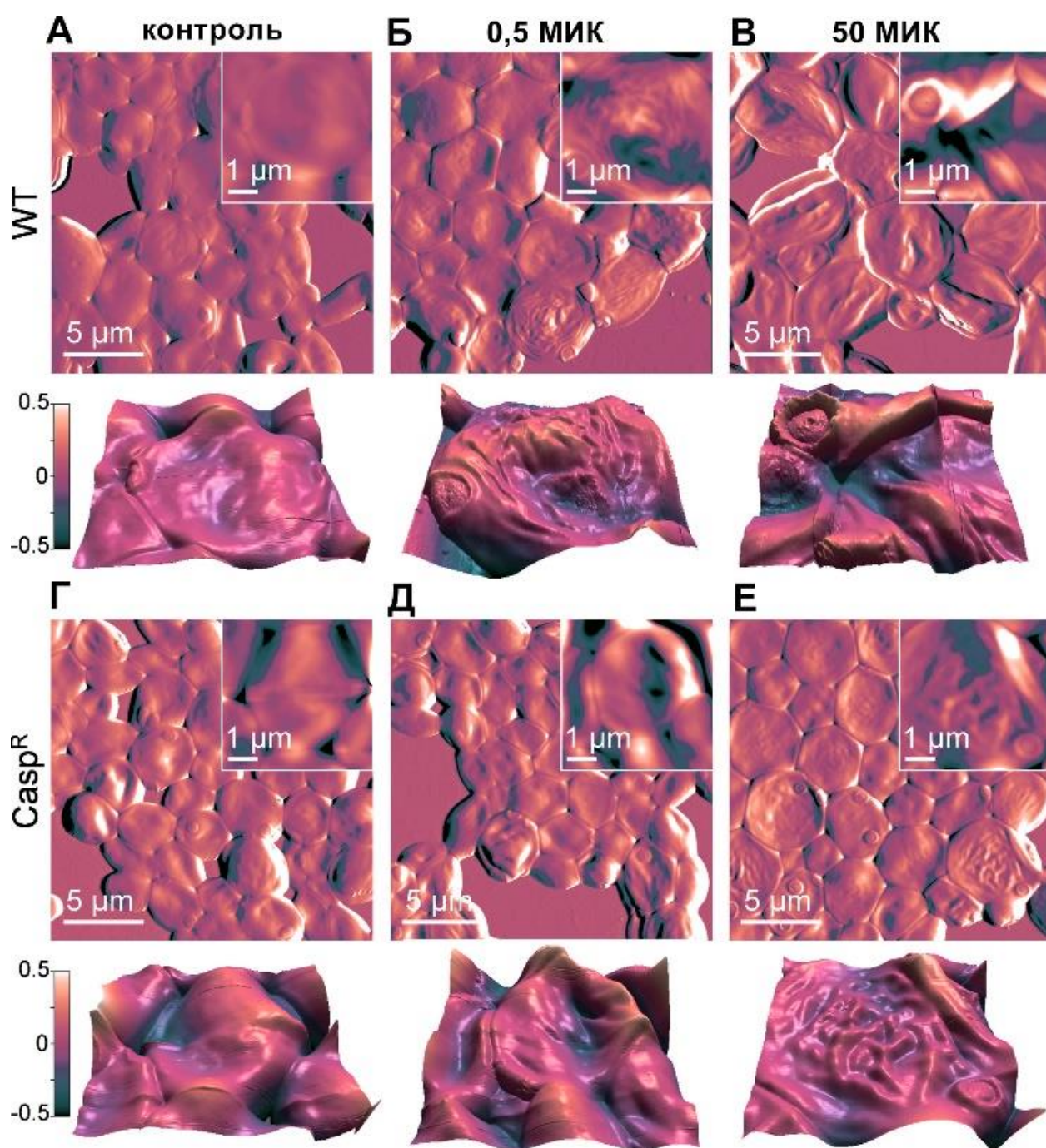


Рисунок 11 – Снимки АСМ восприимчивых WT (А, Б, В) и резистентных Casp^R (Г, Д, Е) к каспофунгину клеток. Образцы контрольной группы (А, Г), обработанные каспофунгином с концентрацией в 0.5 МИК и 50 МИК (Б, Д) и (В, Е) соответственно [69]

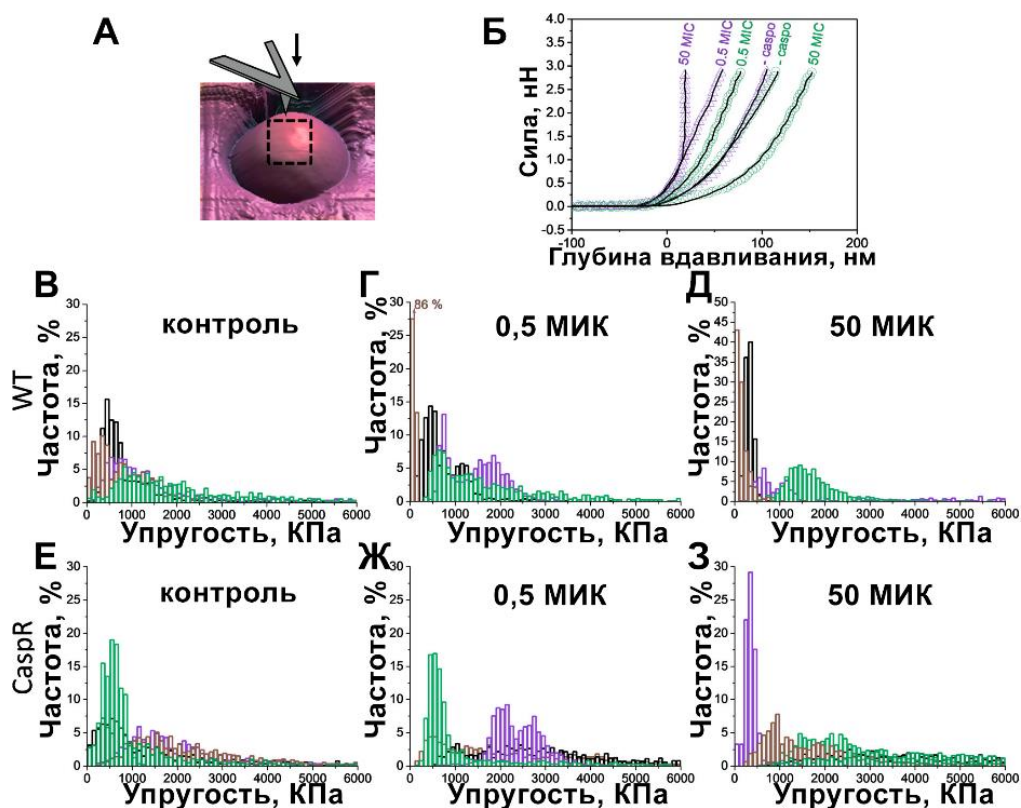


Рисунок 12 – (А) Измерение механических свойств клеток восприимчивых и резистентных к каспофунгину при помощи АСМ; (Б) Кривые зависимости силы от глубины вдавливания индентора полученные на клетках WT или Casp_R с препаратом и без него (синие кружки WT, красные треугольники Casp_R, черные линии – теоретические модели); Гистограммы эластичности клеток WT (В – Д) и Casp_R (Е – З); контрольные группы (В, Е); после обработки каспофунгином при 0.5 МИК (Г, Ж), 50 МИК (Д, З) [69]

При низкой концентрации каспофунгина клетки Casp_R имеют более жесткую клеточную стенку, чем у клеток контрольной группы (рис. 11 (Е и Ж, соответственно) и рис. 13). Такое повышение модуля упругости свидетельствует о том, что в присутствии малых доз препарата возникают изменения в составе клеточной стенки. При высокой концентрации каспофунгина модуль упругости клеток Casp_R повышается двукратно (рис. 12 (З) и 13), однако, у некоторых грибов эффект воздействия препарата не выявлен, что согласуется с топографией (рис. 11 (Е)). Каспофунгин не только ответственен за изменение β -1,3-D-глюканов, но также и опосредует перестройку клеточной стенки, за счет чего компенсируется негативный эффект лекарственного препарата. Из данной работы можно судить о мультизадачности метода АСМ способного одновременно предоставлять информацию о структуре и механических свойствах дрожжей. На такой основе возможно проводить анализ противогрибковых препаратов в доклинических исследованиях.

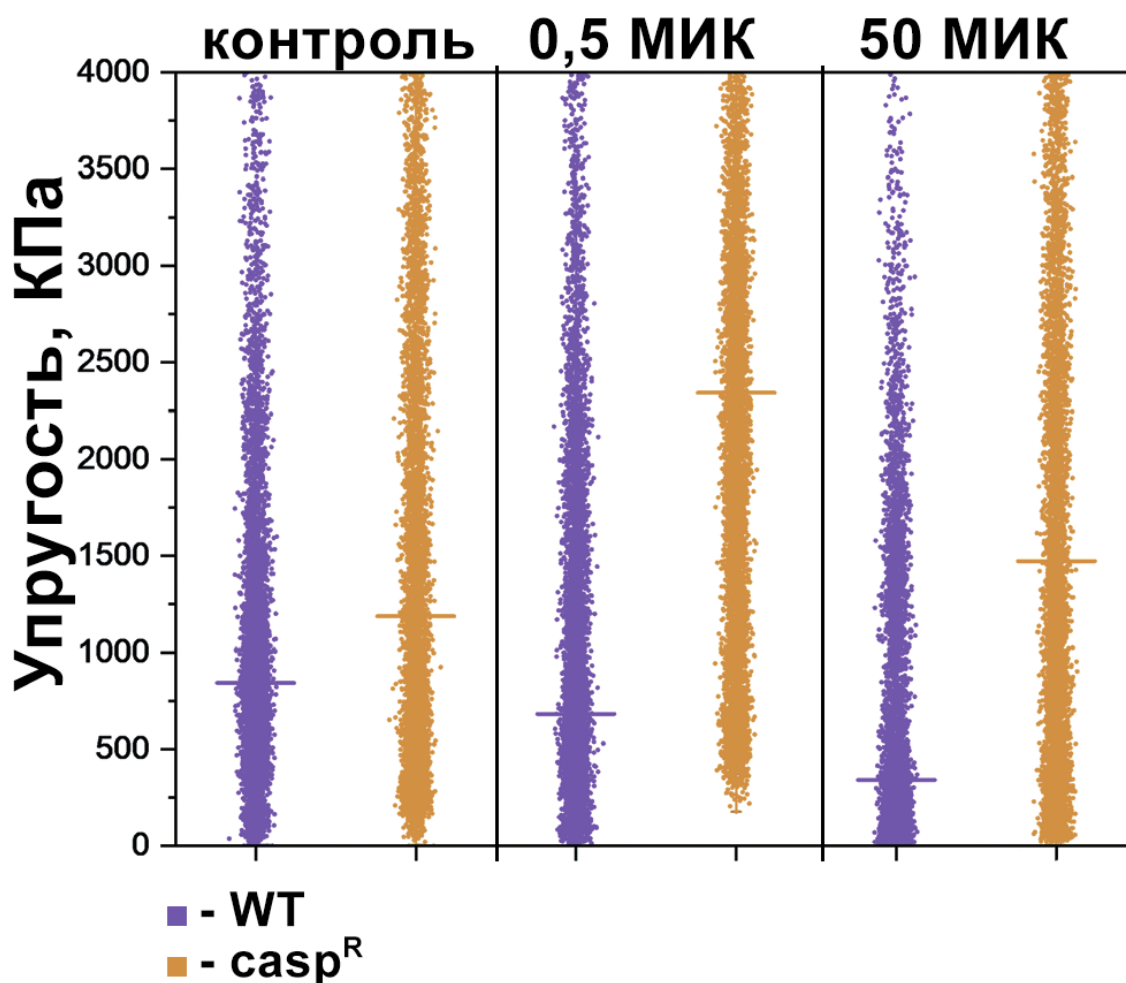


Рисунок 13 – График распределения модулей упругости у клеток штаммов WT и Casp^R контрольных групп и с добавлением каспофунгина в 0.5 МИК и 50 МИК [69]

В работе [78] исследовали живые дрожжи, используя неинвазивный метод сканирующей ион-проводящей микроскопии [79]. Одновременно получены топография поверхности и нормированных ток, демонстрирующий резкий контраст между подложкой и образцом. На поверхности дрожжей замечен высокий рост тока, что говорит о наличии отрицательного заряда. Таким образом продемонстрирована возможность метода СИПМ получать multifunctional информацию всего за одно сканирование с использованием одноканального зонда.

Рассмотренные работы демонстрируют, что АСМ позволяет визуализировать наноразмерную структуру клеточных поверхностей, а также локализовать их отдельные составляющие. Несмотря на то, что данный метод позволяет решать основные вопросы области биофизики, к примеру процесс лизиса клеточной стенки, развитие биопленки или адгезия клеток, у него имеются некоторые ограничения. Во-первых, работа с живыми клетками весьма трудозатратна, а протоколы пробоподготовки требуют значительного

опыта работы как с биообразцом так и с установкой. Качество полученного образца и острия, контроль их целостности и правильная интерпретация данных являются показательными факторами проведения экспериментов. Поэтому так важна разработка более простых протоколов сканирования живых образцов или методов прикрепления биомолекул к кантилеверам.

Во-вторых, зонд с малым радиусом острия (10 ± 0.8 нм) способен механически повредить мембрану клетки. В связи с этим, используются, как правило, острие с радиусом 50 ± 4 нм, что негативно сказывается на пространственном разрешении изображения. К тому же, даже малые механические воздействия зонда на биологический образец (< 50 пН), вызывают у последнего отклик, что также может влиять на результаты эксперимента. Стоит отметить, что при контактном или полуконтактном режиме острие загрязняется слабо связанными макромолекулами на поверхности клетки.

Метод визуализации клеток АСМ ограничен их внешней поверхностью, в связи с чем получение информации о внутренних структурах живого образца не предоставляется возможным.

1.2.2 Применение методов электронной микроскопии в изучении дрожжей *Candida spp.*

Методы электронной микроскопии стали применять для изучения поверхностных структур дрожжей уже с восьмидесятых годов предыдущего столетия [80, 81]. В работе Othmar Kappeli et al. [82] представлена поверхностная структура дрожжей *Candida tropicalis*, которая исследована при помощи методов сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии (РЭМ и ПЭМ соответственно). Пробоподготовка образцов основана на быстрой криофиксации [83] без добавления криопротекторов. Типичной подготовкой клеток для ПЭМ является изготовление тонких срезов из сублимированных образцов и осаждение углерода и PtC.

С помощью методов РЭМ и ПЭМ проводилось сравнение грибков, выращенных на углеводородах и глюкозе. Метод позволил отчетливо различить полосу нитеподобных структур, которая покрывает тонкую клеточную стенку (рис. 13 (А)). При этом такие же структуры наблюдались и при пробоподготовке клеток посредством замораживания (рис. 14 (Б)). Исходя из анализа РЭМ изображений определено, что капсульный покров у протеолитически переваренных клеток, выращенных на углеводородах, в разы хуже по сравнению с клетками, выращенными на глюкозе (рис. 14 (В)).

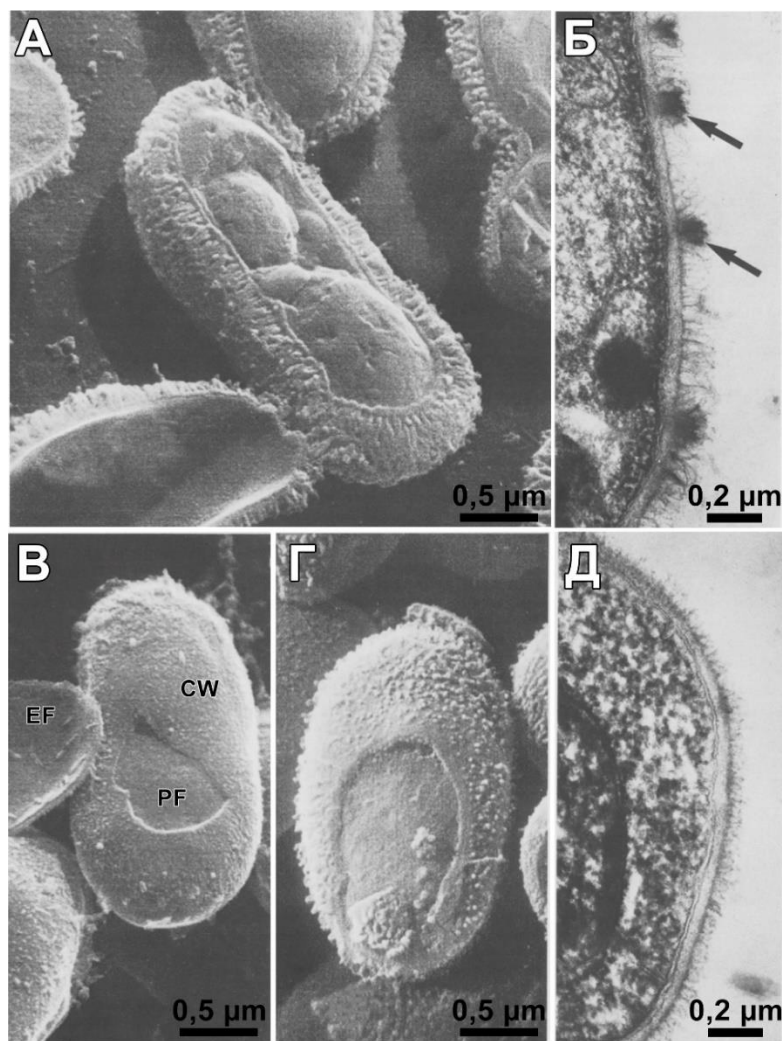


Рисунок 14 – РЭМ снимок *Candida tropicalis*, выращенной в культуре с углеводородами и глюкозой. (А) сравнительно тонкий слой клеточной стенки, покрытый «волосистой» капсулой; (Б) ПЭМ снимок среза *C. tropicalis*, выращенной с н-алканами в качестве субстрата; (В) РЭМ снимок *C. tropicalis*, подвергнувшегося протеолитическому расщеплению перед заморозкой.; (Г) РЭМ снимок *C. tropicalis*; (Д) ПЭМ снимок замороженного среза *C. tropicalis*, выращенного на глюкозе [82]

В отличие от РЭМ, на ПЭМ снимках поверхностный слой капсулы менее выражен, при этом утолщена клеточная стенка (рис. 14 (Г)). На ПЭМ снимке (тонкий срез, позитивное контрастирование) наблюдаются укороченные «волосатые наросты» (рис. 14 (Д)), толщина компактного слоя клеточной стенки существенно не отличается от толщины. Наилучшая адсорбция гексадекана на клетках, при сравнении поверхностных структур, заметна при выращивании дрожжей на углеводородах. Для процесса адсорбции подходит более развитая поверхность, которую возможно получить, выращивая клетки только на глюкозе. Исследования адсорбции, проведенные Kappeli and Fiechter [84] подтверждают эти выводы.

Исследования, проведенные методами электронной микроскопии, позволили выявить, что для адсорбции углеводов, протеолитически расщепленные клетки проявляют наименьшую активность при контакте (рис. 14 (В)). Однако, клетки при обработке протеазой лишаются капсулы, что визуально делает их более гладкими, следовательно, и адсорбция углеводов на таких клетках затруднена. Iimura et al. [85] продемонстрировали, что содержание жирных кислот оказывает наибольшее влияние на гидрофобность клеточной стенки, что также подтверждено в работе Othmar Kappeli, посредством РЭМ и ПЭМ методов визуализации.

Использование методов электронной микроскопии в данное время уже обширно распространено в изучении противогрибкового эффекта терапевтических препаратов в отношении грибов. В связи с тем, что медицинские изделия, такие как катетеры, искусственные суставы, шунты и имплантаты, представляют собой хороший субстрат для формирования биопленок *Candida*, обладающих резистентностью к большинству антигрибковых препаратов [86, 87], Priya Madhavan et al. [88] оценили влияние флуконазола и вориконазола на морфологию клеток и образование биопленки у штамма *C. glabrata*, обладающего резистентностью к флуконазолу, у штаммов *C. rugosa* и *C. parapsilosis* восприимчивых к флуконазолу.

В рассматриваемой работе клетки иммобилизовали с помощью глutarового альдегида и фиксировали в тетраоксиде осмия, затем подвергали сушке. Такая пробоподготовка может приводить к структурному изменению поверхности дрожжей. Исследование аналогично прошлой работе проводилось на срезах клеток. При такой обработке изучаются уже дегидратированные дрожжи.

Priya Madhavan et al. выделили три класса морфологии клеток для анализа воздействия на них препаратов [88]. Интактные клетки без морфологических изменений относятся к классу 1 (рис. 15 (А, Б)). К такому классу отнесли контрольные клетки овальной формы, неповрежденные, с гладкой поверхностью (рис. 15 (А)). В некоторых случаях замечено почкование клеток (рис. 15 (Б)). К классу 2 отнесли клетки с незначительными изменениями (рис. 15 (В, Г)). У клеток, обработанных флуконазолом (19 МИК) на поверхности присутствуют небольшие «морщины» (рис. 15 (В)), а их клеточная стенка деградировала (рис. 15 (Г)). К классу 3 относятся клетки с явными изменениями (рис. 15 (Д, Е)). Обработка флуконазолом (109 МИК) приводит к усадке клеток и образованию ямокоподобных структур на клеточной стенке (рис. 15 (Д)). У *C. glabrata*, обработанной флуконазолом (109 МИК), обнаружено повреждение клеточной стенки и мембраны, так как их рельеф неровный (рис. 15 (Ж)). На рис. 15 (З) представлены клетки с поврежденной мембраной (обработка вориконазолом (МИК 19)).

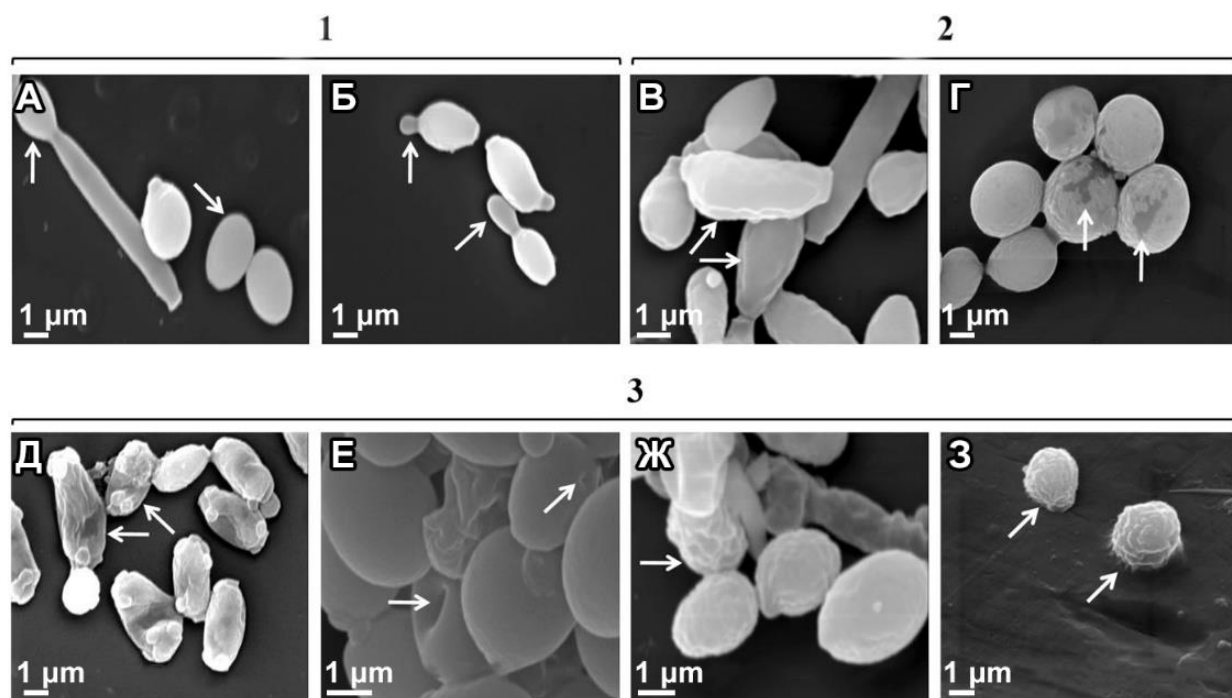


Рисунок 15 – Микрофотографии РЭМ клеток *C. glabrata*: (А, Б) морфология 1-го класса, представляет собой нормальные овальные клетки; (Д, Е) морфология 2-го класса, представляет собой морщинистые клетки с деградирующей клеточной стенкой; (Ж, З) морфология 3-го класса, представляет собой морщинистые клетки с разорванной мембраной [88]

ПЭМ анализ показал, что клетки контрольной группы не повреждены, их клеточная стенка одинаковой толщины (рис. 16 (А–В)). Обнаружено утолщение клеточной стенки и увеличение лакуны. При высоких концентрациях препаратов мембраны разрушены, что привело к ее инвагинации (рис. 16 (Г, Д)). В клетках *C. rugosa* отмечено образование вакуолей (рис. 16 (Е)) и прерывание почкования (рис. 16 (И)). Также при обработке флуконазолом (МИК 109) отмечено разрушение клеточных компонентов, а у *C. parapsilosis* образование фибриллярно-подобных структур (рис. 16 (Ж)). Мембрана *C. glabrata*, обработанных флуконазолом, также инвагинирована (рис. 16 (З)), а при обработке клеток вориконазолом (МИК 19) замечена цитоплазматическая усадка (рис. 16 (К)). Более того, обработка вориконазолом приводит к образованию вакуолей (рис. 16 (Л)) и искажению *C. rugosa* (рис. 16 (М)). Представленные данные демонстрируют, что обработка биопленок вориконазолом и флуконазолом приводит к существенному нарушению целостности клеток и снижению их жизнеспособности.

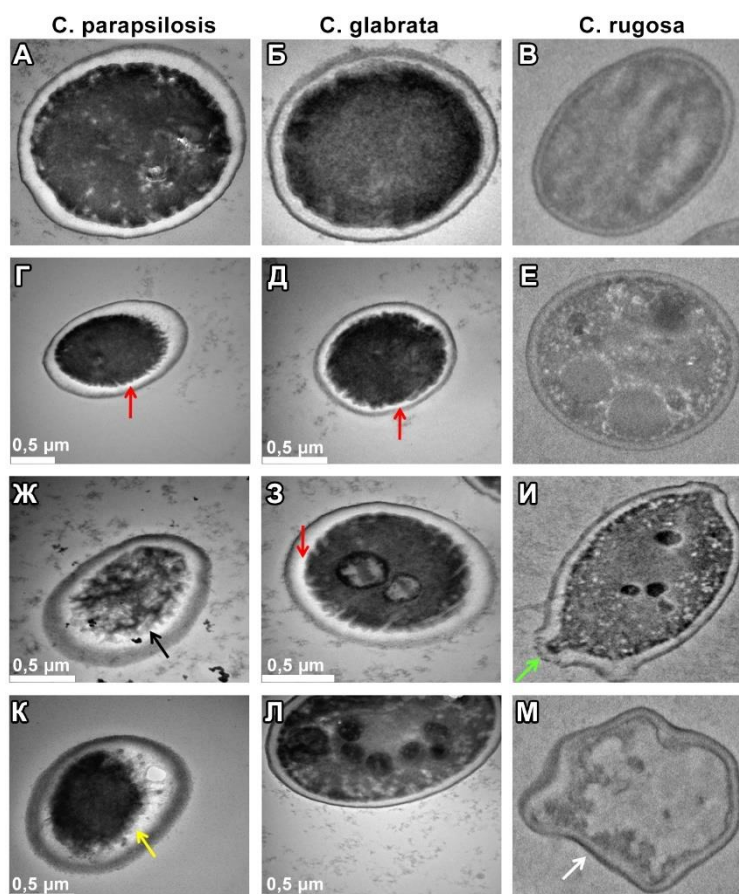


Рисунок 16 – Микрофотографии ПЭМ: (А–В) контрольные клетки *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. rugosa* соответственно; (Г–Е) обработанные флуконазолом (МИК 19) клетки *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. rugosa* соответственно; (Ж–И) обработанные флуконазолом (МИК 109) клетки *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. rugosa* соответственно; (К–М) обработанные вориконазолом (МИК 19) клетки *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. rugosa* соответственно [88]

Иным противогрибковым агентом является эхинокандин, приводящий к лизису клеточной стенки. Более подробно о действии различных групп препаратов на дрожжи описано в следующей главе. Полисахаридный компонент β -1,3-D-глюкан клеточной стенки играет важнейшую роль в поддержании формы клетки, механической жесткости и устойчивости к осмотическому давлению дрожжей. При ингибировании его синтеза нарушается нормальное формирование клеточной стенки, что впоследствии вызывает лизис у клеток. В своей работе [89], Walker et al. продемонстрировали методом ПЭМ, что длина внешнего фибриллярного слоя варьируется у разных видов *Candida spp.* (рисунок 17), и что зачастую уменьшение длины фибрилл коррелирует с повышенным воздействием β -1,3-глюкана на поверхность клетки. Исходя из этих данных, средняя

толщина здоровой клеточной стенки варьируется от 100 до 160 нм у различных видов *Candida spp.*.

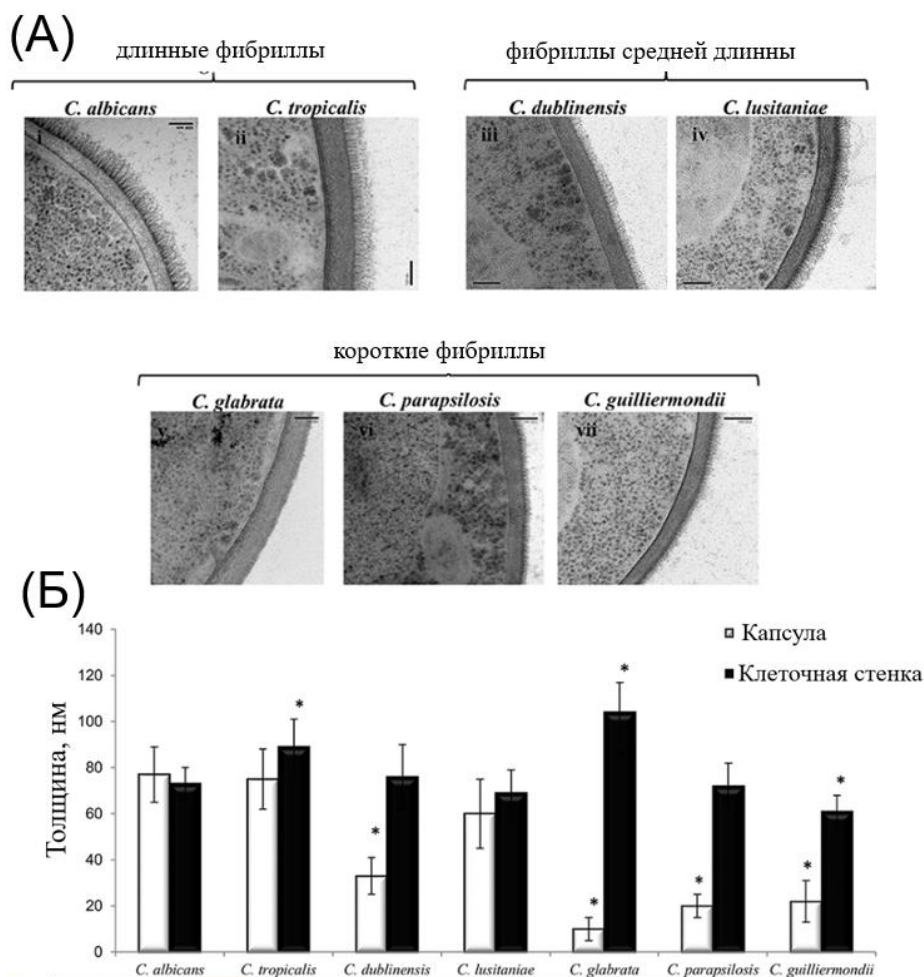


Рисунок 17 – (А) ПЭМ снимки дрожжей *Candida spp.*; (Б) График толщины слоев клеточной стенки и капсулы различных видов *Candida spp.*.

Активность ингибирования синтеза β -1,3-D-глюкана липопептидными соединениями была продемонстрирована цитологическими исследованиями [90 – 92]. Подобно этим липопептидным соединениям, микафунгин также относится к этой группе и, следовательно, активен при воздействии на β -1,3-D-глюкансинтазу. Группа исследователей Y. Nishiyama et al. изучили влияние микафунгина на общую морфологию клеток *C. albicans* методом ПЭМ [93]. Были обнаружены морфологические изменения клеточной стенки у обработанных микафунгином дрожжей. Также проявляется деформация контура, аномальное формирование перегородки и уменьшение толщины промежуточного слоя клеточной стенки. Кроме того, нарушена структура клеточных мембран, а также мембранных цитоплазматических органелл. Однако, клеточная стенка сохраняет толщину в пределах одного порядка.

При инкубации с 10 мкМ гипокреллина В и облучением светом в 72 Дж/см², поверхность клеток становится «извилистой», а при концентрации гипокреллина В в 100 мкМ на поверхности появляются трещины. ПЭМ анализ показал, что у контрольных клеток *C. albicans* (трех штаммов) клеточная стенка и мембрана не повреждены и имеют правильную форму, видны ядра (рис. 19). У обработанных 100 мкМ гипокреллином В клеток обнаружено повреждение клеточной стенки, мембраны и цитоплазмы, ядра не видны. Таким образом, методом ЭМ доказана высокая эффективность гипокреллина-В, опосредованного ФДТ, как противогрибкового препарата нового поколения.

Несмотря на возможность получения изображений высокого разрешения методами электронной микроскопии, пробоподготовка образцов более трудоемкая и включает в себя больше стадий в сравнении с АСМ. Процедуры подготовки требуют использования опасных химических веществ или же дорогостоящего сопутствующего оборудования. Биологические образцы должны быть обезвожены, а их поверхность следует покрывать металлом или углеродом, что тоже негативно сказывается на структуре образца. РЭМ анализ позволяет получить информацию только о внешнем виде клеток, когда как АСМ дает информацию еще и о механических свойствах образца. К тому же послойное сканирование в ПЭМ требует большого количества времени и расходного материала для сбора статистически значимой информации, что экономически невыгодно.

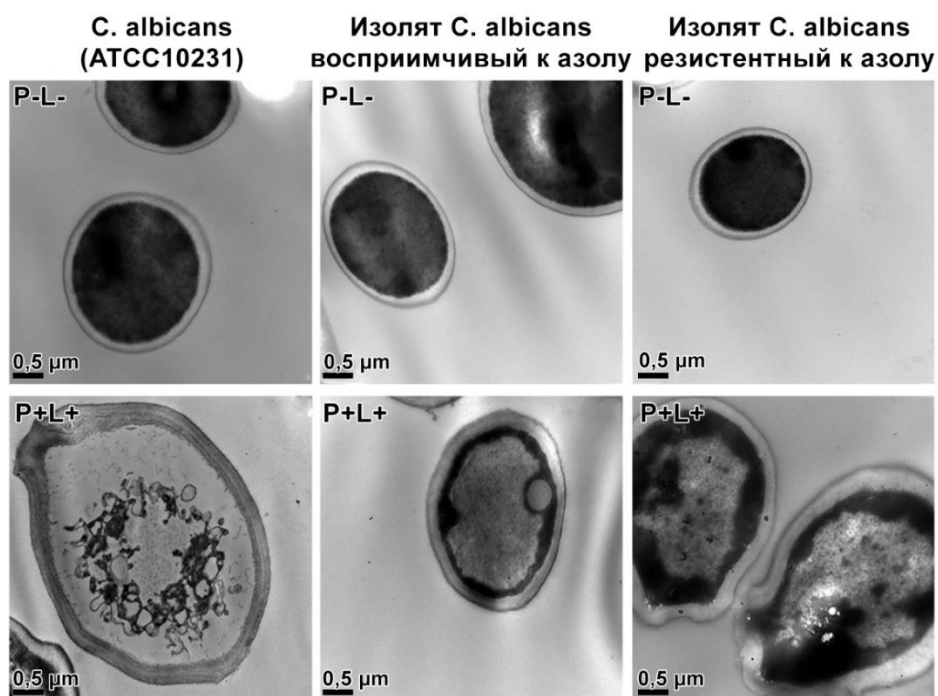


Рисунок 19 – ПЭМ микрофотографии *Candida albicans*. (P-L-): контрольной группы; (P+ L+): клеток, инкубированных с гипокреллином-В в течение 30 минут, облученных светом ($\lambda = 400\text{--}780\text{ нм}$) в течение 15 минут (72 Дж/см²) [94]

1.2.3. Применение конфокальной микроскопии в исследовании дрожжей *Candida spp.*

Конфокальный микроскоп (КМ) – прибор, позволяющий неинвазивным образом визуализировать поверхностную и внутреннюю структуры клеток *in vivo* и *in vivo*. Основными типами конфокальной микроскопии являются: микроскопия на основе тандем-сканирующего микроскопа [95], имеющего простую конструкцию, однако интенсивность его излучения мала, для построения изображения в высоком разрешении; сканирующая щелевая конфокальная микроскопия [96], скорость которой значительно выше, контрастность системы низкая; лазерная сканирующая конфокальная микроскопия [97], позволяет получать изображения высокой контрастности и разрешения по глубине.

Применение КМ способно решить задачи, связанные с изучением различных форм дрожжей в режиме реального времени, что весьма важно при описании процессов, протекающих при росте грибка. *C. albicans* может находиться в нескольких состояниях роста, а именно: дрожжах, псевдогифах и гифах [98]. При каждом из этих состояний, на клеточной стенке *C. albicans* образуются определенные присущие только одной из стадий белки [99], влияющие на гидрофобность клеточной стенки и ее поверхностный заряд [100]. Lyden A. et al. [101], используя лазерную сканирующую конфокальную микроскопию, изучили как взаимодействуют с клетками флуоресцентные наночастицы полистирола при различных стадиях роста *C. albicans*.

Известно, что белки Als и Hwp нужны для адгезии и агрегации *C. albicans* к абиотическим поверхностям или клеточным тканям [102]. Изображения, полученные посредством конфокальной микроскопии, показали, что удаление белков ALS1, ALS2, ALS4 или HWP1 не оказывает влияния на адгезию наночастиц к штаммам дикого типа (SC5314 и CAI12) (рис. 20 (А)). Однако с удалением белка ALS3, наночастицы переставали связываться с гафельными формами дрожжей (рис. 19 (А, Δals3)). Обнаружена локальная агрегация клеток близ материнской клетки, на стыке клетки и гифа, а также на некоторых дрожжевых клетках (рис. 19 (А, Δals3, стрелки)). Измеренную интенсивность наночастиц преобразовали в их число на микрон, путем нормализации с интенсивностью отдельной частицы (рис. 20 (Б)). Между контрольными штаммами (SC5314, Δals1, Δals2, Δals4, Δhwp1, CAI4-URA3 и CAI12) статистически значимой разницы не обнаружено, но между Δals3, CAI12 и SC5314 заметно снижение агрегации. Представленные результаты подтверждают ключевую роль ALS3 в адгезии отрицательно заряженных наночастиц к поверхности *Candida*.

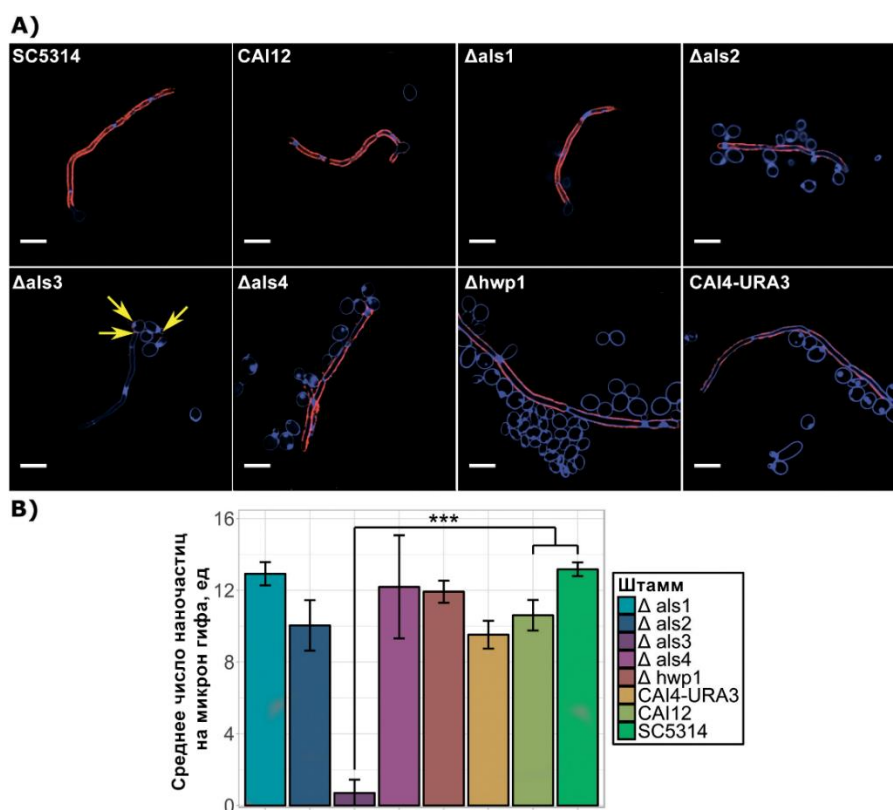


Рисунок 20 – (А) Конфокальные изображения мутантных штаммов дикого типа и Als, окрашенных CFW (синий) с наночастицами карбоксилата (красный). (шкала 10 мкм); (Б). Среднее количество наночастиц (200 нм) на микрон гифов штаммов *C. albicans* [101]

В работе Geelsu Hwang et al. [65] изучали воздействие фермента GtfB на дрожжи *C. albicans* методом конфокальной микроскопии. Трехмерную структуру и пространственное распределение полученных из Gtf EPS-глюканов исследовали, помечая глюканы путем внедрения декстранового конъюгата Alexa Fluor 647. Развитие биопленок оценивалось по разработанным этой же командой протоколам [103].

На конфокальных снимках наблюдается явное разрушение биопленок, образованных *S.m.-C.a.* (*S. mutans* и *C. albicans*) штаммов дикого типа (WT) и мутантных штаммов (*och1ΔΔ* и *pmt4ΔΔ*), скоплений *C. albicans* и матрицы α -глюкана (рис. 21 А1, Б1, В1 и А4, Б4, В4 соответственно). Биопленка *S.m.-C.a* WT представляет собой как многочисленные гифы, так и дрожжевую форму *C. albicans* с обширным количеством бактерий *S. mutans* и плотно упакованными EPS-глюканами. С другой стороны, *S.m.-C.a* штамма *pmt4ΔΔ* и *S.m.-C.a* штамма *och1ΔΔ* представляют лишь малое количество клеток *C. albicans* при существенном уменьшении клеток бактерий и разрушением EPS-глюкан матрикса; результаты согласуется с микробиологическими и биохимическими данными. На формирование биопленки может влиять образование поврежденных гифов или снижение скорости роста штамма *och1ΔΔ*.

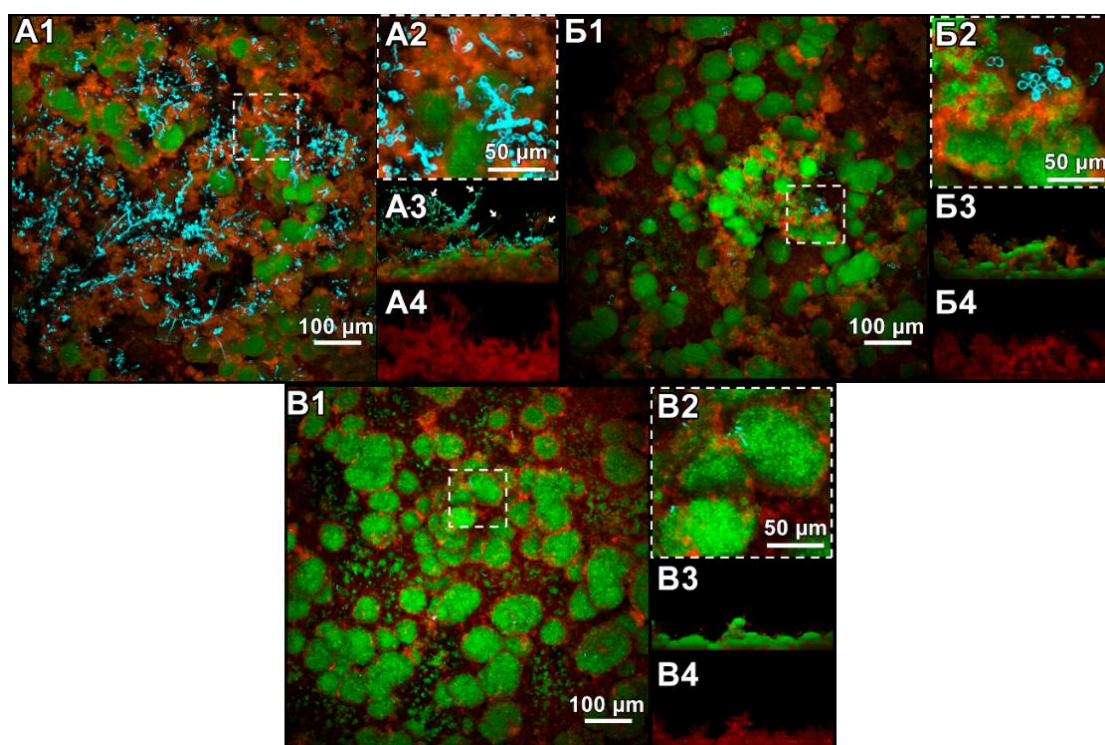


Рисунок 21 – Конфокальные снимки биопленок грибов смешанных видов. (А) *S.m-C.a* штамма WT; (Б) *S.m-C.a* штамма *pmt4ΔΔ*; (В) *S.m-C.a* штамма *och1ΔΔ*. (1) биопленки, вид сверху; (2) увеличенные снимки выделенных на (1) областей; (3) биопленка, ортогональный вид; (4) EPS-глюкан-матрица, ортогональный вид. [65]

Ранее в обзоре уже была рассмотрена антимикробная фотодинамическая терапия. Sanitá P. et al. [104] изучили противогрибковый эффект ФДТ на биопленках *C. dubliniensis* опосредованный куркумином (Cur), способного проявлять противовоспалительные, противоопухолевые, антимикробные свойства [105, 106]. Использовалась конфокальная лазерная сканирующая микроскопия для оценки поглощения Cur клетками дрожжей, и его проникновения сквозь биопленку. Изображения получали на живых клетках методом дифференциальной интерференционной контрастности. Чтобы проиллюстрировать нахождение и поглощение Cur клетками, флуоресцентные и просвечивающие изображения накладывали друг на друга.

На рисунках 22 и 23 представлены конфокальные снимки клеток *C. dubliniensis* после инкубации с Cur (20 мкМ) и биопленок, инкубированных с Cur (40 мкМ) соответственно. Обнаружено, что клетки культуры *C. dubliniensis* проявляли ярко-зеленую флуоресценцию спустя 5 и 20 минут после инкубации с одинаковым поглощением в обоих случаях. В случае с биопленкой *C. dubliniensis*, после 5 мин инкубации только в небольших фрагментах биопленки отмечалась светло-зеленая флуоресценция Cur, но

спустя 20 минут инкубации Cur сенсibilизировал большее количество клеток в биопленке излучая более интенсивную флуоресценцию. Данные результаты представляют не только высокую проникающую способность куркумина относительно биопленок, но также и динамику восприятия биопленок к проникновению Cur в их матрицу и инактивации клеток.

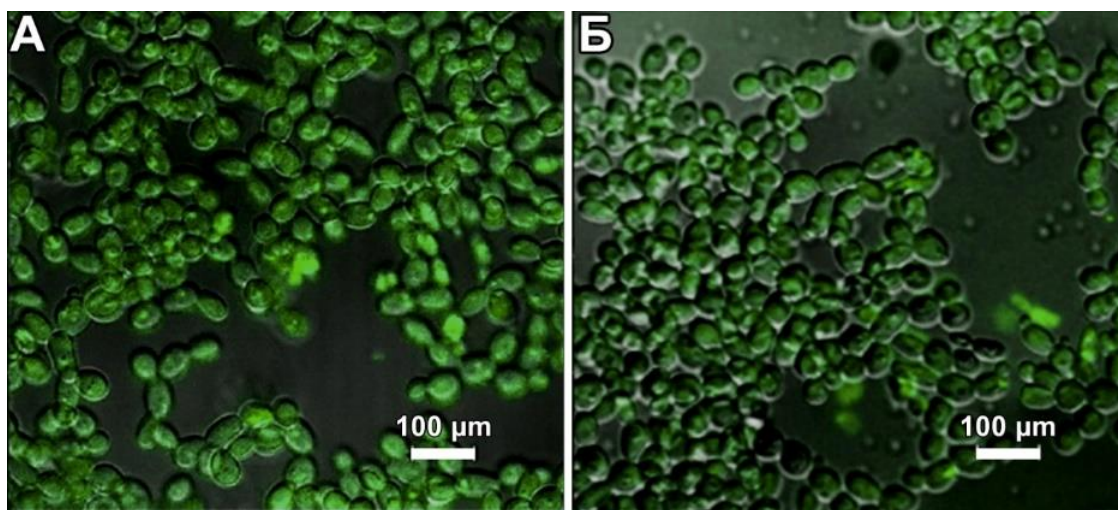


Рисунок 22 – КМ-визуализация отдельных клеток *C. dubliniensis* спустя 5 мин (А) и 20 мин (Б) инкубации с Cur 20 мкМ (шкала 10 мкм) [104]

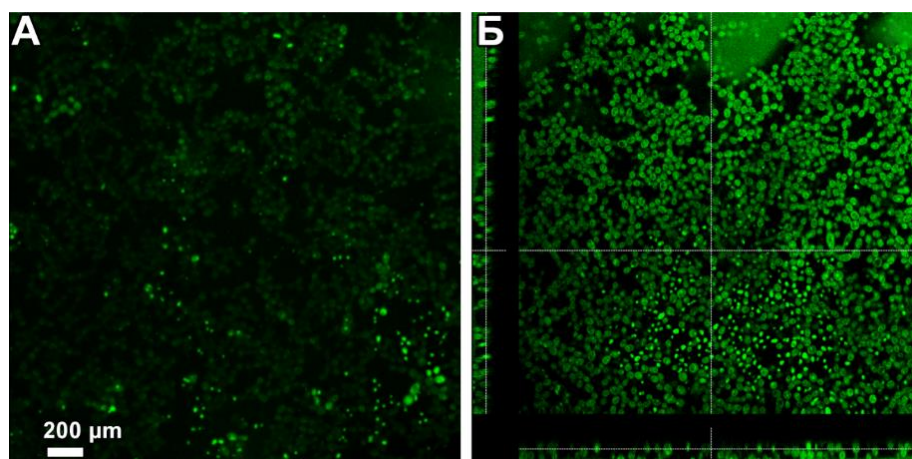


Рисунок 23 – КМ-визуализация биопленок *C. dubliniensis* спустя 5 мин (А) и 20 мин (Б) инкубации с Cur 40 мкМ (шкала 20,0 мкм) [104]

Конфокальный микроскоп является универсальным инструментом для анализа *in vivo* структуры и морфологии биопленок *Candida spp.*. Неинвазивная пробоподготовка образца позволяет получать снимки живых клеток в их физиологическом растворе с возможностью исследования динамических процессов в грирке. К тому же сам процесс подготовки образцов более прост, а использующиеся реактивы менее токсичны в

сравнении с используемыми при подготовке образцов к РЭМ. А при использовании лазерных импульсов, длительностью порядка десятой пикосекунды, используемая мощность составляет порядка милливатт, что позволяет получать субмикронные изображения.

1.2.4. Сравнение методов

Одной из важных характеристик методов, описанных ранее, при изучении структуры поверхности дрожжей является латеральная разрешающая способность. При изучении биологических образцов, достигается следующая разрешающая способность: 1 – 100 нм у АСМ, 200 – 450 нм у КМ [107 – 109], у РЭМ и ПЭМ разрешение составляет 5 – 100 нм и 1 – 30 нм, соответственно [110–112]. Стоит отметить, что эти значения не являются предельными для данных методов. К примеру, АСМ способен получать изображения атомарного разрешения, что достигается за счет уменьшения радиуса острия. Однако при этом повышается сила воздействия на образец, что негативно сказывается на целостности структуры поверхности биологических образцов. Немаловажным фактором в изучении внутренней структуры дрожжей является максимальная толщина образца, при которой возможно проводить сканирование. Так для метода ПЭМ биологические образцы должны быть тоньше 100 нм [113] и для методов КМ составляет до 20 нм [114].

Другим важным фактором при исследовании дрожжей является изучение образцов в физиологических растворах. На данный момент имеются данные о получении методом АСМ топографии и поверхностных свойств дрожжей в физиологическом растворе [47, 60, 61, 63, 69]. А также проведено исследование топографии поверхности и механических свойств дрожжей в жидкой фазе одновременно [115]. Все рассмотренные в данном обзоре работы по изучению дрожжей методами КМ проводились в физиологическом растворе. Во всех приведенных работах, в которых методами РЭМ и ПЭМ исследуются дрожжи, исследование проводится на обезвоженных образцах. Существует экологический сканирующий электронный микроскоп (ЭСЭМ), способный получать снимки живых биологических образцов [116, 117], который потенциально применим и на дрожжах.

В большинстве рассмотренных работ дрожжи изучались преимущественно одним методом. Таким образом данные были ограничены либо анализом поверхностной структуры *Candida* (АСМ, СИПМ и РЭМ методы), либо анализом внутренней структуры *Candida* (ПЭМ и КМ). Однако имеются работы [47,89], в которых проведен комплексный анализ поверхностной и внутренней структуры *Candida* множеством указанных методов, что, несомненно, дает более обширное понимание структуры клеток и процессов,

протекающих в дрожжах. Несомненным преимуществом КМ в изучении структуры дрожжей является специфическое окрашивание различных участков клетки. В отличие от ПЭМ методы КМ более избирательно позволяют сканировать структуру дрожжей [102], а именно при помощи красителей отдельно визуализировать: клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, ядро, вакуоли, митохондрии, процесс эндоцитоза и ионов Ca^{2+} .

Кроме широкого спектра применений, КМ является наименее инвазивным методом микроскопии наноразмерного разрешения. Так АСМ оказывает механическое воздействие на образец даже в полуконтактном режиме, при этом сила, прилагаемая зондом на клетки равна 0.1 нН [118]. В методе СИПМ зонд вовсе не соприкасается с образцом, что позволяет избежать реакции клетки на сканирование [2]. К тому же данный метод позволяет проводить более длительную по времени съемку чем АСМ, что весьма важно в изучении фармакокинетики противогрибковых препаратов. Как ранее оговаривалось, методами электронной микроскопии (РЭМ и ПЭМ) изучают только дегидратированные образцы, в связи с чем эти методы наиболее инвазивны для *Candida spp.*, и по этой же причине этими методами невозможно изучать динамические процессы, протекающие в клетке и на ее поверхности.

Для изучения динамики процессов также важна скорость сканирования образцов. Наилучшими показателями обладает конфокальная микроскопия. Изображения в высоком разрешении получают в течение 1 – 2 с, возможна и видео съемка образца (30 кадров/мс), но с низким пространственным разрешением [119]. В случае зондовой микроскопии скорость сканирования образцов на порядки ниже. Так для АСМ максимально допустимая скорость, при которой зонд не будет негативно воздействовать на клетку, составляет 20 мкм/с, а для сканирующей ион-проводящей микроскопии максимальная скорость сканирования без потери разрешения достигает 50 мкм/с [8, 118].

Немаловажным фактором сравнения методик является необходимость в пробоподготовке, предусматривающей фиксацию клеток или иммобилизацию их на субстрат. Пробоподготовка биологических образцов для методов электронной микроскопии включает обязательную фиксацию для сохранения и стабилизации структуры клетки [88, 89]. Для сканирования клеток методами зондовой микроскопии требуется иммобилизация образца на модифицированный субстрат или механической захват клеток, чтобы избежать дрейфа микроорганизмов в растворе или отталкивание зондом образца, находящегося в жидкой или газовой фазах [44]. Все вышеописанные факторы сравнения представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнение методов микроскопии

Факторы сравнения	Методы изучения дрожжей					
	АСМ	СИПМ	РЭМ	ESEM	ПЭМ	КМ
1	2	3	4	5	6	7
Латеральное разрешение, нм	1 – 100 [107 – 109]	3 – 100	5 – 100 [110 – 112]		1 – 30 [111, 112]	200 – 450 [107 – 109]
Максимальная толщина образца, нм	–	–	–	–	до 100 [113]	20 [114]
Изучение дрожжей в физ. растворе	данные изучения Candida [47, 60, 61, 63, 69]	имеются данные изучения клеток	–	данные изучения клеток [116, 117]	–	имеются данные изучения Candida
Изучение поверхностной структуры дрожжей	имеются данные изучения Candida	имеются данные изучения Candida	имеются данные изучения Candida	имеются данные изучения клеток	–	имеются данные изучения Candida
Изучение внутренней структуры дрожжей	–	–	–	–	имеются данные изучения Candida	имеются данные изучения дрожжей
Изучение механических свойств	имеются данные изучения Candida [63, 98]	имеются данные изучения клеток [2]	–	–	–	–
Изучение динамических процессов	имеются данные изучения клеток [86]		невозможно			имеются данные изучения дрожжей [114]
Скорость сканирования	20 мкм/с [118]	50 мкм/с [8]	–			1 снимок/с [119]
Инвазивность метода	мех. воздействие зондом на образец [118]	Инвазивен [2]	дегидратирование клеток			возможно использование флюорофоров для прижизненного сканирования клеток
Необходимость фиксации клеток	не требуется		следует фиксировать [88, 93]			–
Необходимость иммобилизации клеток	следует иммобилизовать [44]		отсутствует			

1.3. Биологическая активность противогрибковых препаратов и метод ее оценки

1.3.1 Биологическая активность лекарственных препаратов и их физико-химические свойства

В современных подходах исследования биологической активности лекарственных препаратов определяется количественная зависимость между структурой и биологическими свойствами веществ, которая может быть выражена в виде математического уравнения. Такие уравнения отражают зависимость числового набора биологических свойств от числового набора физико-химических свойств, и выражается в виде параметров – дескрипторов. В виде дескриптора может быть представлено любое число, рассчитанное на основе структурной формулы химического соединения. Например, молекулярный вес, молекулярный объем, поляризация молекулы, растворимость и тому подобное. Существует популярный метод количественных соотношений структура-свойство (QSAR), который применяется для выявления количественной корреляции между дескрипторами и известной характеристикой для набора молекул с использованием различных хеометрических методов [120]. Структурные дескрипторы важны при оценке прочности связывания исследуемого соединения с молекулой-биомишенью. описывают Полярность, ионизация соединений описывается дескрипторами электронных эффектов, а растворимость и диффузия сквозь мембраны вещества описывается дескрипторами липофильности.

Липофильность – это сродство молекулы или фрагмента к липофильному окружению, физико-химическое свойство соединения, состоящее из двух основных структурных вкладов: объемного члена, описывающего образование полостей, гидрофобных и дисперсионных сил, и полярного члена, описывающего направленные электростатические взаимодействия и водородные связи [121]. Первый вклад принято называть гидрофобностью, а второй – полярностью. Липофильность описывает баланс между этими двумя вкладками и измеряется поведением распределения соединения в двухфазной системе: неполярной (органическая фаза) и полярной (водная фаза), и выражается константой липофильности P (косвенно отражает проницаемость биологической мембраны) [122]. Липофильность выражается через логарифм коэффициента $\log P$, или через $\log D$, который учитывает распределение ионизирующихся

соединений, и является продолжением гидрофобного эффекта и включает выгодные взаимодействия растворенного вещества с растворителем.

Гидрофобный эффект – движущая сила пассивного транспорта лекарственных средств через мембраны организмов, а также компонент связывания лекарства с рецептором. Связь биологической активности с липофильностью различна, и может выражаться в виде линейной, прямолинейной или параболической зависимостей. Так коэффициенты функции рассматриваются как факторы, отражающие влияние заместителей в структуре соединения [123]. Так на примере простых эфиров и кетонов обнаружена взаимосвязь между липофильным характером ($\log P$) и изоэффективной дозой ($\log 1/C$) описываемое параболическим уравнением $\log(1/C) = a(\log P)^2 + b(\log P) + c$ [124].

Еще одним из возможных дескрипторов является растворимость, определяемая структурой вещества в растворе или структурной формой в твердом состоянии, а также наличием соразтворителей и их концентрацией [125]. Растворимость в воде является одним из основных физико-химических свойств, которые необходимо оптимизировать при разработке лекарств. Липофильность, которая определяется водородными, ионными, ван-дерваальсовыми связями, также влияет на растворимость [126]. Таким образом такие дескрипторы как: ионизация, липофильность, распределение заряда, водная растворимость связаны друг с другом и определяют наиболее важные параметры вещества как растворимость в физиологических средах и проникание в организм [127].

Существуют программы по типу MarvinSketch и MarvinView, которые позволяют проводить теоретический расчет характеристик различных химических соединений, которые в последствии применяются в прогнозировании биологической активности [128]. В программе используются различные инструменты хемоинформатики, позволяющие прогнозировать свойства вещества по его формуле, к примеру осуществляется расчёт константы ионизации pK_a , липофильности $\log P$ или ионной липофильности $\log D$, растворимости $\log S$, поляризации молекулы и прогнозирование ЯМР спектра.

Такого рода математическое прогнозирование применяется уже повсеместно и часто соотносится с экспериментальными данными. Так, например, при помощи моделирования было проведено исследование физико-химических свойств новых производных дигидропиримидинтиона, и сопоставление с их антимикробной активностью [129]. Результаты докинга продемонстрировали, что новые соединения обладают хорошей аффинностью связывания по сравнению со стандартным ципрофлоксацином. Имеются исследования противогрибковых препаратов. Так Trilaksana H. et al. рассчитали структуры и свойства флуконазолов, в ходе чего были проанализированы длина связи, угол связи, заряды Малликена [130]. Экспериментальные

геометрические параметры и теоретические данные сравнивались с параметрами ADME, свойствами биомаркеров, значением pH для количественной оценки молекулярных дескрипторов, а также для исследования атомных элементов. Анализ фармакокинетических свойств помог в разработке препарата для дальнейших исследований. Другой группой исследователей был проведен виртуальный скрининг и биологическая оценка для выявления фармацевтических препаратов, потенциально вызывающих гипертонию и гипокалиемию путем ингибирования стероидной 11 β -гидроксилазы [131]. Анализ структурной активности выявил свободную электронную пару атома азота как необходимое условие для взаимодействия лекарственного средства с ферментом, а значение рК является показателем ингибирующей активности. Также была промоделирована липофильность препарата. Замена этилэфирной группы на более гидрофильную группу карбоновой кислоты резко снизила ингибирующий потенциал. Таким образом применяемая методика моделирования является успешной стратегией для оценки биологической активности препаратов.

1.3.2 Биологическая активность противогрибковых препаратов групп азола и эхинокандина и их воздействие на дрожжи

На данный момент существуют соединения различных групп противогрибковых препаратов, которые применяются в лечении инфекций, вызванных дрожжами *Candida*. В связи с тем, что в данной работе исследуются широко распространённые лекарства группы азолов и препараты более новооткрытой группы эхинокандинов, в этом разделе будут рассмотрено воздействие и механизм действия препаратов данных групп.

К широко распространенным азолам относятся: итраконазол, флуконазол и вориконазол. Азолы вызывают фунгистатический эффект при помощи механизма дозозависимого ингибирования СYP-зависимой 14 α -деметилазы, необходимой в синтезе эргостерина из ланостерина. Эргостерин, как ранее упоминалось, является стероидом – компонентом цитоплазматической мембраны, и участвует в стабилизации клеточной мембраны дрожжей. При ингибировании его синтеза происходит нарушение структуризации ЦМ и ее целостности [132]. Азолы могут ингибировать и другие пути биосинтеза эргостерина. Так у *Candida albicans* флуконазол частично ингибирует эргостерин и полностью ингибирует синтез обтусифолиола, а вориконазол приводит к полной блокировке синтеза эргостерола и обтусифолиола [17]. Итраконазол с флуконазолом останавливают синтез 3-кеторедуктазы, катализирующей восстановление 3-кетостероида обтусифолиона до обтусифолиола [9].

Так на примере саперконазола – противогрибкового препарата третьего поколения триазолов (как и итраконазол, флуконазол) Montès et al. изучали его воздействие на один из самых часто встречающихся дрожжевых грибов при кандидозе у человека, *Candida albicans* [133]. РЭМ снимки контрольной группы дрожжей *Candida albicans* и обработанных саперконазолом представлены на рисунке 24 (А) и (Б), соответственно. В отличие от контрольных клеток дрожжей, имеющих яйцевидную форму и гладкую поверхность, клетки обработанные саперконазолом принимали округлую форму, а их поверхность становилась шероховатой. Также полученные Montès et al. ПЭМ снимки КС и ЦМ дрожжей *Candida albicans*, контроля и обработанных саперконазолом представлены на рисунке 24 (В) и (Г, Д), соответственно [133]. У контрольных клеток *Candida albicans* цитоплазматическая мембрана имеет целостную и слегка извилистую форму, когда у обработанных триазолом клеток, ЦМ становится более извилистой (рис. 24 (Г)) и с увеличением времени инкубации полностью разрушается (рис. 24 (Д)), при этом внутриклеточный материал проникает в клеточную стенку.

Данный тип изменения поверхностной структуры дрожжей подтверждается и методом АСМ при воздействии на дрожжи триазолом. В работе Tøndervik A. et al. изучалось воздействие флуконазола на дрожжи *Candida tropicalis* [134]. На полученных ими АСМ изображениях контрольных *Candida tropicalis* (рис. 24 (Е)) и обработанных флуконазолом (рис. 24 (Ж)) наблюдается сморщивание и утоньшение клеток под воздействием препарата. Также имеются данные о воздействии препаратов азольной группы на жесткость клеточной стенки клеток *Ochrobactrum anthropi* [135]. С помощью метода АСМ изучены механические свойства контрольной группы *Ochrobactrum anthropi* и, клеток обработанных флуконазолом (F1), эпоксиконазолом (Ер), климбазолом (Сb) и клотримазолом (Cl) (рис. 24 (деформация клеточной стенки (З) и ее модуль Юнга (И))). Выяснилось, что после обработки *Ochrobactrum anthropi* препаратами азольной группы, деформация клеточной стенки увеличивается, а ее величина модуля Юнга падает.

Исходя из имеющихся данных, общими показателями биологического эффекта препаратов азольной группы являются: разрушение цитоплазматической мембраны клеток дрожжей, нарушение поверхностной структуры клеточной стенки, выражающееся в проявлении шероховатого рельефа поверхности, и уменьшение жесткости КС.

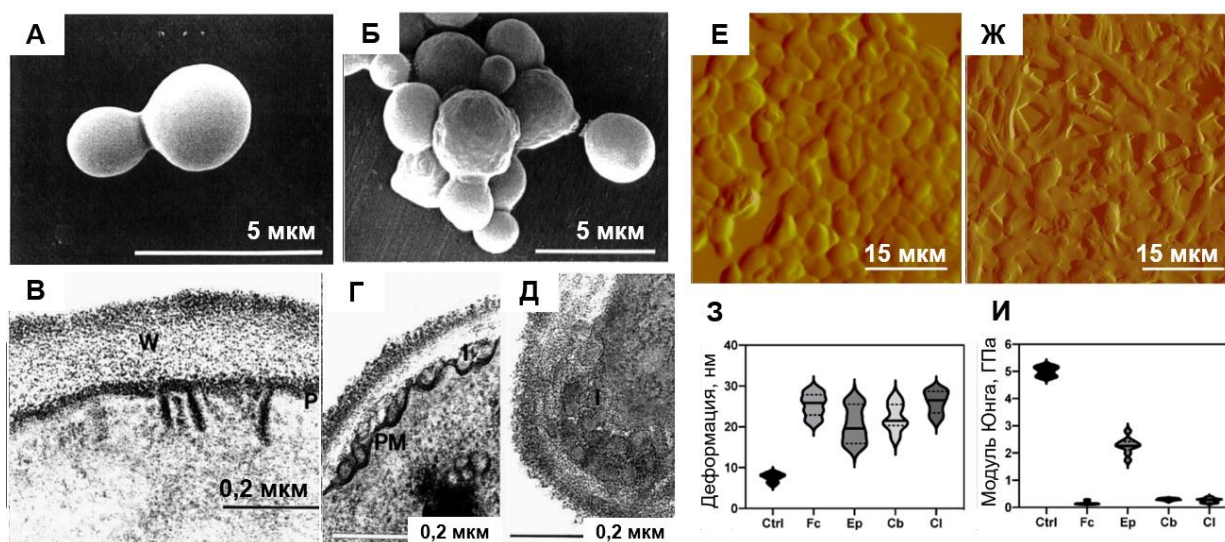


Рисунок 24 – РЭМ снимки контрольных клеток *Candida albicans* и обработанных саперконазолом (А) и (Б), соответственно; ПЭМ снимки контрольных клеток *Candida albicans* (В) и обработанных саперконазолом (в течение 6 часов (Г) и 24 часов (Д)), соответственно; АСМ изображения клеток *Candida tropicalis* и обработанных флуконазолом (Е) и (Ж), соответственно; деформация (З) и модуль Юнга (И) клеточной стенки *Ochrobactrum anthropi* обработанной препаратами азольной группы [133, 134, 135]

Однако, к препаратам азольной группы у большинства штаммов *Candida* уже выработана резистентность [136], а сами вещества действуют гораздо медленнее, чем препараты нового поколения. К другой группе относятся эхинокандины, которые являются неконкурентными ингибиторами 1,3- β - и 1,6- β -D-глюкансинтазы, участвующих в синтезе полисахарида 1,3- β -D-глюкана [137]. Как ранее отмечалось, глюкан является структурообразующим углеводным компонентом клеточных стенок дрожжей, в связи с чем ингибирование его синтеза приводит к лизису КС и осмотической нестабильности клеток дрожжей [138]. Важно отметить, что клетки человека не содержат 1,3- β -D-глюкан, что позволяет избежать прямого токсичного воздействия. Более того у эхинокандина быстрая фунгицидная активность в отношении большинства дрожжей *Candida spp.*, предсказуемая биологическая кинетика, нежели у препаратов азольной группы [139].

Воздействие эхинокандина на поверхность клеточной стенки дрожжей было исследовано Marcos-Zambrano L. J. et al. на примере клеток *C. albicans* и лекарственного препарата микафунгин группы эхинокандинов [140]. На представленных РЭМ снимках *Candida albicans* контрольных клеток (рис. 25 (А)) клетки дрожжей имеют гладкую поверхность, а при воздействии на них микафунгина (рис. 25 (Б)) на поверхности клеток образуются выпуклые участки клеточной стенки. Такого рода образование хорошо визуализировано в другой работе Guirao-Abad J. P. et al. методом ПЭМ, где также

подвергали дрожжи *Candida albicans* воздействию микафунгина [141]. Так по ПЭМ снимкам контрольных *Candida albicans* отчетлива видна целостная структура клеточной стенки и цитоплазматической мембраны (рис. 25 (В)), и литическое воздействие микафунгина, проявляющееся как разрушение целостности КС и ее выпячивания за счет осмотической нестабильности (рис. 25 (Г)).

Описанное воздействие эхинокандина также подтверждалось Formosa C. et al. на примере *Candida albicans* на этот раз с препаратом каспофунгином, также относящегося к группе эхинокандинов [142]. По полученным в их работе АСМ изображениям контрольных клеток дрожжей (рис. 25 (Д)) также заметен гладкий рельеф поверхности *Candida albicans*. А при обработке их каспофунгином на поверхности клеточной стенки проявляются невысокие образования (рис. 25 (Е)), которые при сопоставлении с ранее описанными ПЭМ снимками можно охарактеризовать как лизис КС. Кроме того, данными исследователями были получены карты модуля Юнга единичных клеток дрожжей (рис. 25 (Ж, З)). Выяснено, что при обработке *Candida albicans* каспофунгином жесткость клеточной стенки увеличивается с $E = (186 \pm 89)$ кПа до $E = (399 \pm 89)$ кПа. Что авторы связывают с повышением содержания хитина в клеточной стенке *C. albicans* и снижением β -глюканов с увеличением количества маннанов.

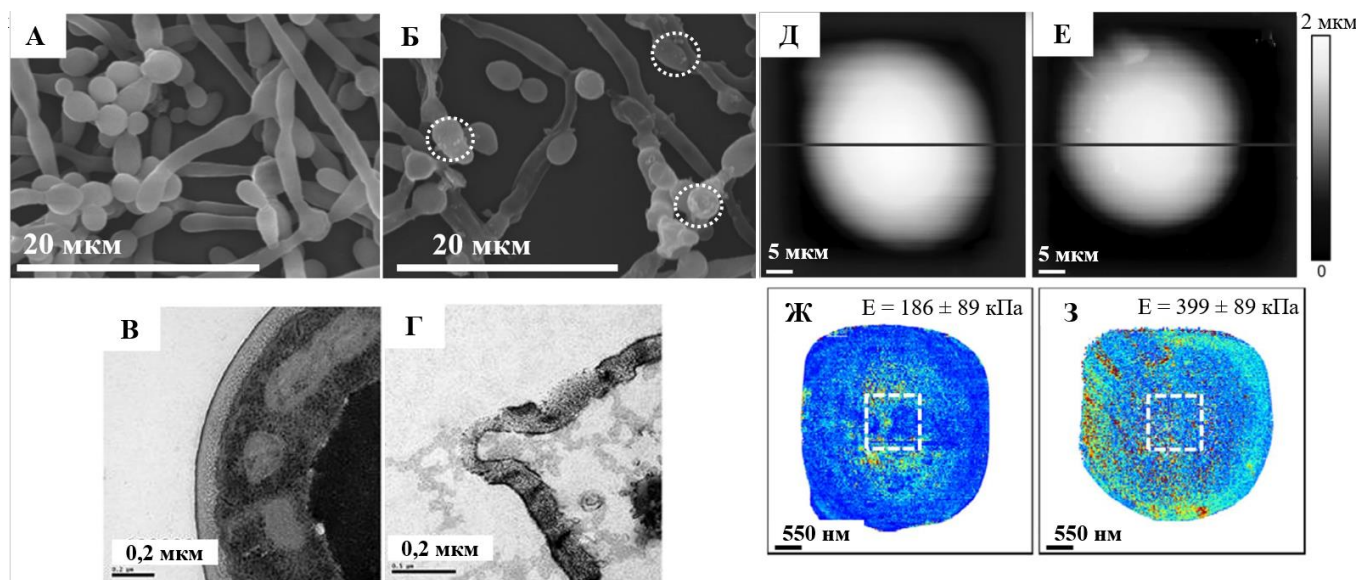


Рисунок 25 – РЭМ снимки контрольных клеток (А) и обработанных микафунгином (Б) *Candida albicans*; ПЭМ снимки контрольных клеток (В) и обработанных микафунгином (Г) *Candida albicans*; АСМ изображения клеток (Е) и обработанных каспофунгином (Е) *Candida albicans*; картирование модуля Юнга контрольных клеток (Ж) и обработанных каспофунгином (З) *Candida albicans* [140, 141, 142]

Исходя из представленных выше работ можно выделить следующий биологический эффект, оказываемый препаратами группы эхинокандинов на структуру дрожжей. Ингибирование 1,3-β- и 1,6-β-D-глюкансинтазы приводит к нарушению структуризации слоев глюканов, проявляющемся в лизисе клеточной стенки. Данное воздействие визуально проявляется как образование на поверхности клеточной стенки выпуклых участков. Кроме того, как ответ на вызванный стресс от воздействия препаратов, клетки *Candida spp.* начинают накапливать хитин, что приводит к ужесточению всей клетки с повышением ее модуля Юнга.

Основываясь на вышеперечисленных данных, в данной работе предполагается визуализировать методом СИПМ следующие эффекты воздействия противогрибковых препаратов на исследуемые дрожжи (рис. 26):

1. При воздействии на *Candida spp.* препаратами азольной группы, ожидается обнаружить разрушение структуры клеточной стенки.
2. При воздействии на *Candida spp.* препаратами группы эхинокандинов, ожидается обнаружить лизис клеточной стенки с образованием выпуклых участков.
3. В связи с малой силой воздействия СИПМ зонда на образец, индентация жесткой клеточной стенки не будет реализуемо, однако, данной силы будет достаточно для индентации мягких поврежденных участков клетки.

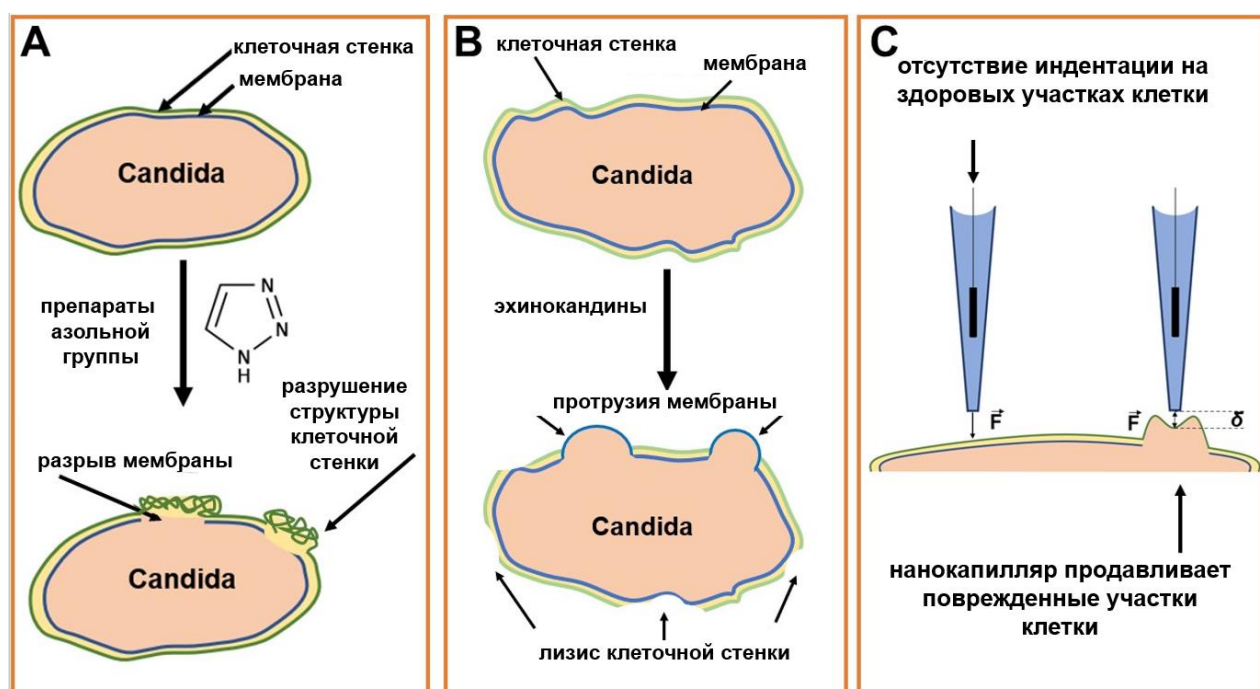


Рисунок 26 – (А) схема воздействия препаратов азольной группы на мембрану клетки;
 (Б) схема воздействия препаратов группы эхинокандинов на клеточную стенку клетки;
 (В) индентация мягких (поврежденных) участков зондом СИПМ

1.4. Выводы по главе

На данный момент слабо изучены наноразмерные структуры микроорганизмов, а также их свойства. Главным образом это обусловлено трудоемкостью проведения экспериментов из-за нестандартных требований к работе с биологическим образцом или инструментальными ограничениями приборов измерения. Так, например, методы электронной микроскопии требуют обезвоживания образца, что исключает возможность изучения динамических процессов, протекающих в клетке. Улучшение методов покрытия металлом поверхности образцов или фиксации дрожжей позволило удешевить эксперименты и облегчить пробоподготовку материала.

Атомно-силовая микроскопия хорошо проявляет себя как инструмент для визуализации наноразмерных объектов и анализа их механических свойств. Тем не менее, на объекты исследования все равно оказывается механическое давление, что может играть ключевую роль при изучении хрупких биологических материалов. Однако, эти проблемы можно избежать, используя метод СИПМ, позволяющий получать топографию и картирование по жесткости биологических образцов, находящихся в жидкости, исключая непосредственный контакт между биоматериалом и зондом. Таким образом, значительно упрощается пробоподготовка и минимизируется механическое воздействие на образец. Более того, данным методом возможно проводить измерения клеточных процессов в живых клетках.

Описанные в данной главе строение и состав оболочки дрожжей дают понимание биологических функций каждого компонента. Структурные свойства клеточной стенки изученные различными методами микроскопии дают понимание не только о морфологии дрожжей, но и о воздействии на клетки противогрибковых препаратов. Рассмотренный метод QSAR позволяет определять биологическую активность препаратов, что упрощает доклиническую разработку лекарств. А описанные биологические эффекты веществ групп азолов и эхинокандинов, дают представление ожидаемых результатов, полученных методом СИПМ. Таким образом данный обзор дает понимание физико-химических свойств клеточной стенки микроорганизмов, к которым относятся дрожжи *Candida spp.*, для дальнейшего их изучения методом сканирующей ион-проводящей микроскопии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования, оборудование и реактивы

Исследование проведено на дрожжевых грибах *Candida spp.*, находящихся в дрожжевой фазе развития, полученных из рабочей коллекции Института новых антибиотиков им. Гаузе: клинических изолятах *C. albicans* 8R, *C. krusei* 432M, *C. parapsilosis* ATCC 22019. Клетки дрожжей обрабатывались противогрибковыми препаратами. В данной работе использовались следующие коммерческие препараты: итраконазол (триазол с дихлорфениловой группой), вориконазол (триазол с дифторфениловой группой), микозидин (азол с хлорфениловой группой), микафунгин; и разрабатываемые препараты группы производных тиазолидин-2,4-дионон: L-272 (азол с этиловой группой), L-273 (азол с пропиловой группой), L-274 (азол с тетрабутановой группой), L-98R (азол с хлорфениловой группой), ди-флуконазол, 17b (тиазолидин с двумя фениловыми группами), L-170 (тиазолидин с двумя хлорфениловыми группами), L-173 (тиазолидин с триазолом и дифторфенилом) (рисунок 27).

Для определения противогрибковой активности рассматриваемых веществ использовали микрометод серийных разведений [143]. Противогрибковую активность изучали на следующих культурах: *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* 8R, *C. albicans* ATCC 24433, *C. krusei* 432M (дрожжевые грибы). В качестве препаратов положительного контроля для сравнения использовали коммерчески доступный противогрибковый препарат, такой как флуконазол (Quimica Sintetica SA, Испания, чистота $\geq 0,99\%$). Данные были любезно предоставлены Грамматиковой Н.Э. от "Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе" (таблица 2). Все синтезированные соединения проявляли микробиологическую активность в отношении штаммов патогенных грибов *C. parapsilosis* ATCC 22019 со значениями МПК от 0,06 до 8 мкг/мл.

Тиазолидиндион (L-173) тестировали на цитотоксичность с использованием стандартного MTS-анализа. Это исследование было проведено с использованием линии клеток эмбриональной почки человека HEK293 и линии клеток рака простаты человека (PC3).

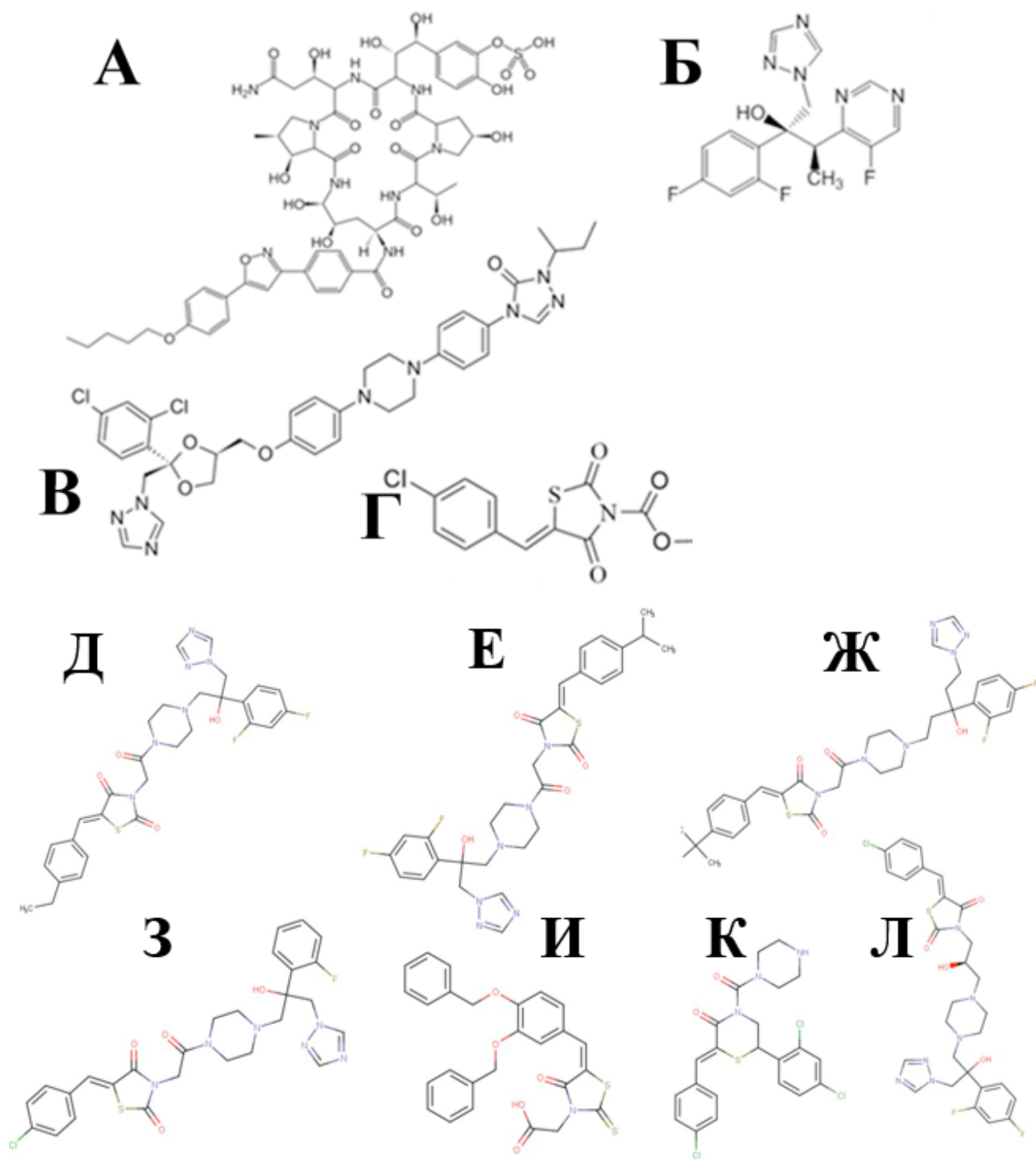


Рисунок 27 – Химические формулы коммерческих препаратов: (А) микафунгин, (Б) вориконазол, (В) итраконазол, (Г) микозидин; разрабатываемых препаратов: (Д) L-272; (Е) L-273; (Ж) L-274; (З) L-98R; (И) 17b; (К) L-170; (Л) L-173

Причины выбора клеточных линий заключались в том, что эти клеточные линии наиболее широко используются в клеточных исследованиях и существуют исследования, в которых ранее изучалось влияние соединений с азольной группой на эти клеточные линии [144]. Результаты этого анализа показаны на рисунке 28. Анализ MTS показал, что

флуконазол не вызывал цитотоксических эффектов ни в одной из тестируемых концентраций (рис. 28 (А)). Напротив, L-173 приводил к активации гибели клеток (рис. 28 (В)): IC₅₀ для клеточной линии РС-3 составлял 34,9 ± 0,26 мкМ; для культуры НЕК293 – 16,6 ± 0,2 мкМ.

Клетки РС-3 (клетки рака простаты человека) и НЕК293 (эмбриональные почки человека) были приобретены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния, США). Клетки РС-3 культивировали в среде RPMI-1640 (Gibco), дополненной 10 % FBS (Gibco), 2 мМ L-глутамина (Gibco) и 1 % раствором витамина RPMI (Sigma). Клетки НЕК293 культивировали в среде DMEM/F-12 (Gibco), дополненной 10 % FBS и 2 мМ L-глутамина. Клетки хранили при 37°C во влажном инкубаторе (Sanyo), снабжаемом 5 % CO₂.

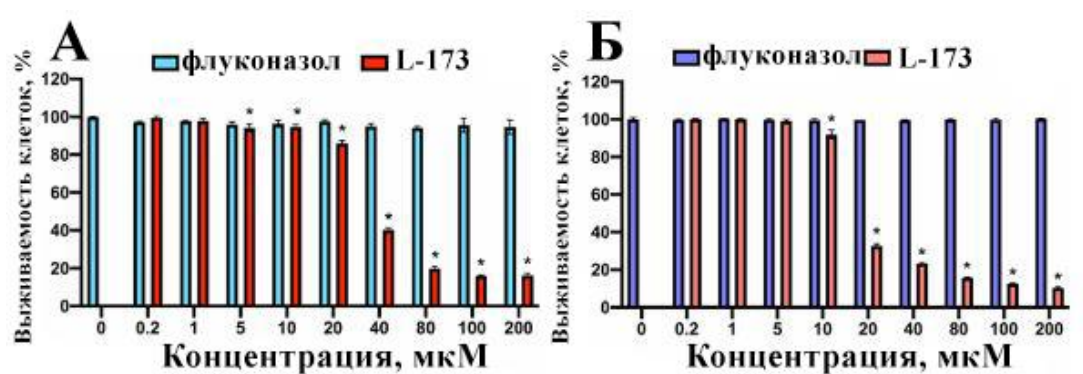


Рисунок 28 – Оценка выживаемости клеток после 72 часов инкубации с различными концентрациями флуконазола или L173 с помощью MTS-теста. Результаты показаны как средние значения ± SD, * p < 0,05 (t-критерий) при сравнении клеток, инкубированных в культуральной среде («ns» не имеет существенного значения). (А) клеточная линия РС-3; (Б) культура НЕК293.

Таблица 2 – Минимальная подавляющая концентрация (МПК) мкг/мл

Штаммы <i>Candida</i>	17b	98R	173	Итракона- зол	Микози- дин	Вориконазол
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,5	0,015	0,125	0,125	32	0,03
<i>C. albicans</i> 8R	32	н/д	32	0,5	32	0,5
<i>C. krusei</i> 432M	32	н/д	0,5-1	32	64	4

Применяемое в работе оборудование: шкаф сушильный ULAB UT-4620 (ULAB, КНР); сканирующий ион-проводящий микроскоп ICAPPIC. Микроскоп ICAPPIC разработан на базе инвертированного оптического микроскопа Eclipse Ti-2 (Nikon, Япония), расположенного на противовибрационном столе STable (Supertech instruments, Венгрия). Функциональные части СИПМ микроскопа: сканирующая платформа Mechanical Stand (ICAPPIC, Великобритания), система обратной связи Universal Controller (ICAPPIC, Великобритания), система позиционирования Piezo control system (ICAPPIC, Великобритания), интерфейс ввода и вывода сигнала Axon Digidata 1550B (Axon Instruments, США) и Multiclamp 700B. Лазерный пуллер P-2000 (Sutter Instruments, США) для изготовления нанокapилляров в качестве зондов; аналитические весы ViBRA AF 224RCE («Shinko Denshi Co. Ltd.», Япония), камера Горяева 2-х сеточная («МиниМед», РФ). АСМ микроскоп Biscope Resolve (Bruker, Санта-Барбара, Калифорния), установленный на инвертированном оптическом микроскопе Axio Observer (Carl Zeiss, Германия).

Применяемые в работе инструменты и расходные материалы: боросиликатные заготовки для изготовления зондов (Sutter Instruments, США), автоматические пипетки различного объема Eppendorf Research Plus («Eppendorf», Германия), сменные одноразовыми пластиковыми наконечники «Экохим» (РФ); система очистки воды Milli-Q («Millipore», США); фальконы объемом 15 и 50 мл (Экохим, РФ); культуральные чашки Петри (GBO, Австрия).

Применяемые в работе реактивы: раствор Хенкса (HBBS) (ПанЭко, Россия), вода деионизованная (Milli-Q, «Millipore», США), диметилсульфоксид (99,7 %, «Sigma-Aldrich», США), силиконовый эластомер SYLGARD™ 184 (DOWSIL, США).

2.2. Модификация субстрата и пробоподготовка дрожжевых клеток

Для получения качественных изображений высокого разрешения и повторного сканирования области без заметного дрейфа клеток целесообразно иммобилизовать клетки на подложке. Во избежание дрейфа микроорганизмов под действием малых вибраций в водной среде поверхность чашек Петри покрывали силиконовым эластомером SYLGARD™ 184 (рис. 29 (А)), после чего чашки помещали на час в шкаф сушильный ULAB UT-4620 (ULAB, КНР) при температуре $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем чашки Петри тщательно промывали дистиллированной водой и сушили для удаления лишней жидкости (рис. 29 (Б)). 48-часовую культуру дрожжей, выращенную на декстрозном агаре Sabouraud, суспендировали в физиологическом растворе до плотности 1×10^7 КОЕ/мл.

Концентрацию клеток определяли путем подсчета в камере Горяева. Приготовленную суспензию в виде небольшой капли наносили на модифицированную подложку (рис. 29 (В)). Время осаждения клеток и их иммобилизации на поверхности составляло три часа. После этого в чашку Петри наливали сбалансированный раствор соли Хэнкса или рабочий раствор Хэнкса с препаратом для контрольной группы и экспериментальной группы, соответственно. Образцы порошков лекарственных средств растворяли в диметилсульфоксиде чистотой 99,9 % до концентрации 0,1 мг/мл, а затем доводили до тестовых концентраций в 1 мл раствора Хэнкса (рис. 29 (Г)). Образцы инкубировали с препаратом в течение суток. После этого чашки Петри с образцами предварительно промывали физиологическим раствором, заполняли 2 мл раствора Хэнкса и помещали на платформу сканирования.

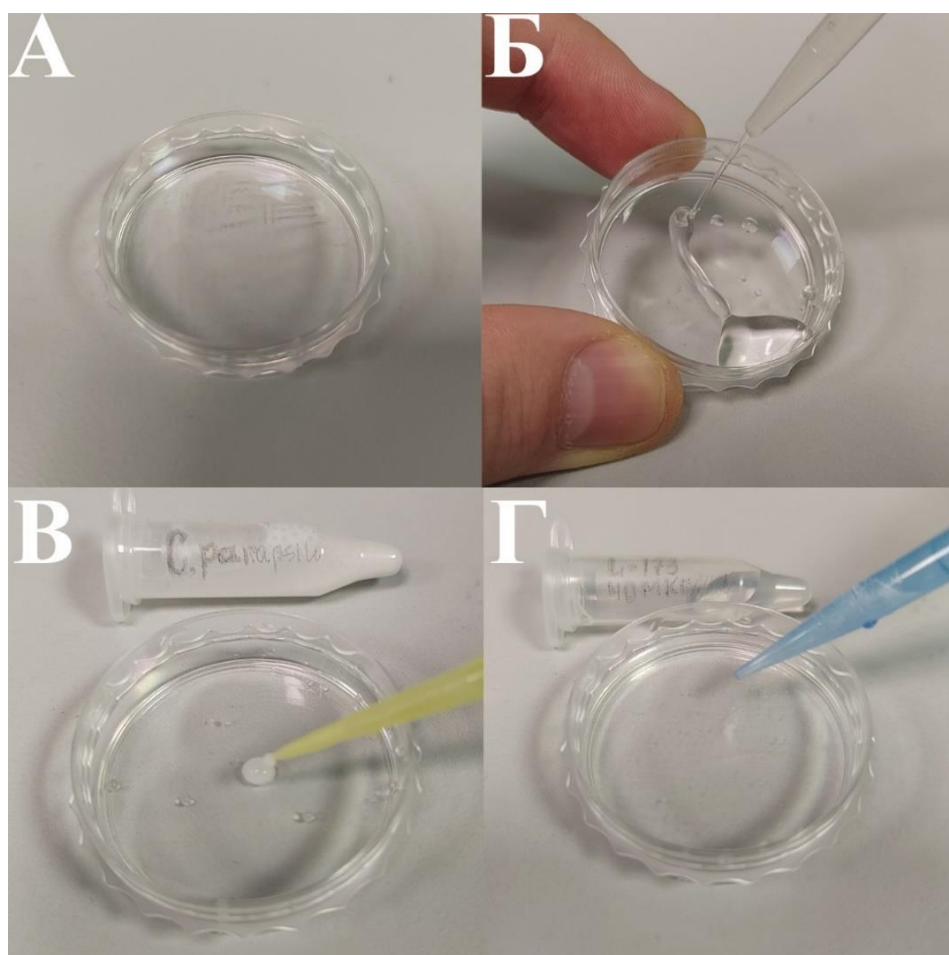


Рисунок 29 – Покрытие чашки Петри силиконовым эластомером (А); Промывка модифицированной чашки после выдерживания эластомера при температуре $T = 60^{\circ}\text{C}$ (Б) в течение часа; Нанесение суспензии дрожжей на иммобилизованную поверхность (В); Добавление препарата с дальнейшей инкубацией (Г).

2.3. Сканирующая ион-проводящая микроскопия, разработка методики

В инновационном методе СИПМ в качестве сканирующего зонда используется нанокapилляр. Сканирующая система с помощью обратной связи поддерживает постоянный ионный ток, протекающий через нанокapилляр для приближения к поверхности клеток, а также постоянное расстояние между наконечником и поверхностью, приблизительно равное внутреннему радиусу нанокapилляра. По полученным высотам капилляра близ образца создается трехмерное топографическое изображение клеточной мембраны (рис. 30) [79].

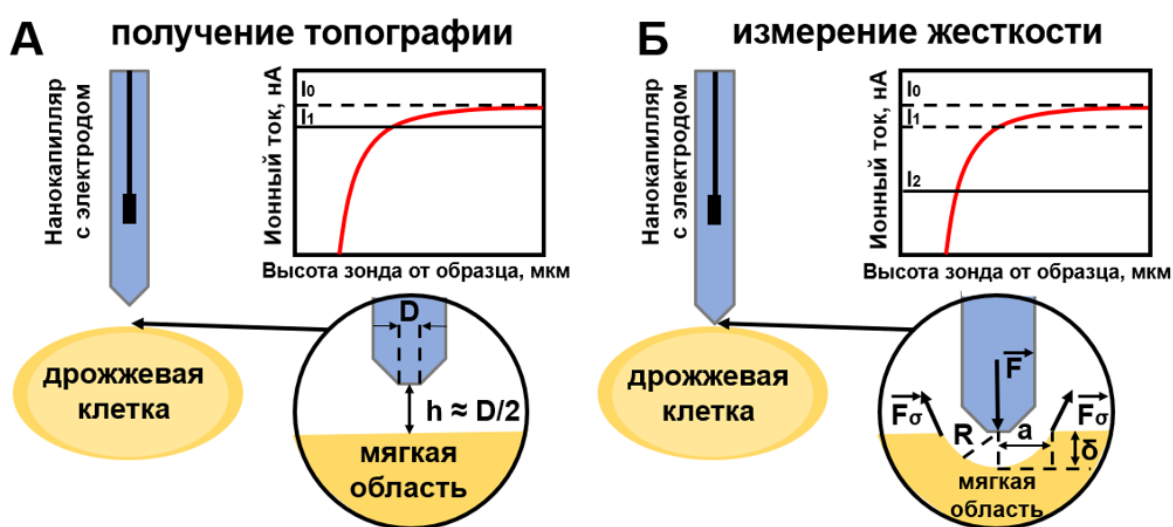


Рисунок 30 – (А) СИПМ схема получения топографии; (Б) СИПМ схема получения механических свойств

Бесконтактную топографическую съемку и измерения механических свойств при низкой нагрузке проводили с использованием СИПМ производства ICAPPIC (ICAPPIC Limited, Великобритания). СИПМ производства ICAPPIC был установлен на инвертированном оптическом микроскопе Eclipse Ti-2 (Nikon, Япония) и закрыт клеткой Фарадея для защиты от электрических помех. Для пьезопозиционирования и управления с обратной связью использовался универсальный контроллер и система пьезоуправления ICAP-PIC (ICAPPIC Limited, Великобритания). Для мониторинга ионного тока использовали усилитель MultiClamp 700B (Molecular Devices, США).

Для получения изображения клеток дрожжей настройки в программе задаются следующие: амплитуда прыжка 2000 нм, скорость подвода 50 нм/мс, задержка после подвода зонда 7000 мкс, задержка перед перемещением зонда 5 мс, задержка на точке 20, функция отскока (включена), размер квадрата предварительного сканирования 4.286 мкм,

высота подъёма при предварительном сканировании 5000 нм, скорость подвода вне съемки 25 мкм/с. Подбор параметров позволил устранить различного рода артефакты съемки, таких как смещение клеток по поверхности, рваные края объекта или смещения растровых слоев (рис. 31). В приложении В описана разработка методики. В приложении Г указана методика сканирования дрожжей методом СИПМ.

Нанокapилляры изготавливались с помощью лазерного пуллера Р-2000 (Sutter Instruments, США) из капилляров боросиликатного стекла (наружный диаметр 1,2 мм, внутренний диаметр 0,90 мм, длина 7,5 см). Капилляр помещается в зажимы регулируемой платформы. Испускается лазерный луч, нагревающий заготовку посередине. При этом заготовку растягивается в противоположных направлениях вдоль горизонтальной оси до тех пор, пока капилляр не разобьется на два нанокapилляра. Программа пуллера для получения нанопипеток радиусом 45 нм: Heat 310, Fil 3, Vel 30, Del 160, Pul 0, Heat 330, Fil 3, Vel 25, Del 160 и Pul 200. Программа пуллера для получения нанопипеток с радиусом в диапазоне от 20 до 35 нм: Heat 350, Fil 3, Vel 35, Del 160, Pul 0, Heat 330, Fil 3, Vel 50, Del 160 и Pul 220.

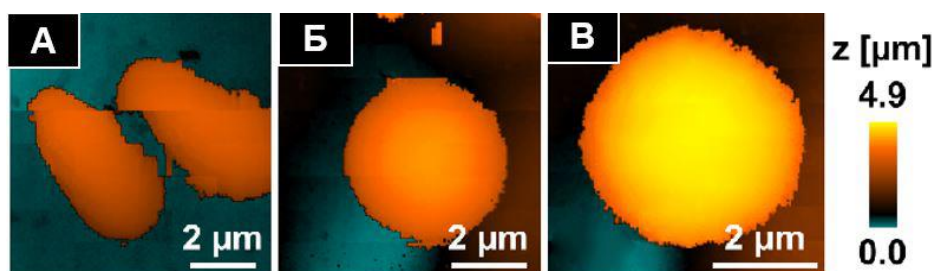


Рисунок 31 – (А) СИПМ-изображение клеток *C.parapsilosis* ATCC 22019 с артефактом смещения клеток по субстрату; (Б) СИПМ-изображение клеток с артефактом обрезанных краев клетки и смещения растра по высоте; (В) СИПМ-изображение клеток без артефактов съемки

Клеточные линии аденокарциномы простаты человека РС3 и эмбриональной почки человека НЕК 293 (АТСС, США) культивировали в модифицированной Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture F-12 (Gibco, США), содержащей 1 % GlutaMAX (Gibco, США), 1 % пеницилла-лин-стрептомицин (Gibco, США), 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) и хранили во влажном инкубаторе при 5 % CO₂ и 37 °С. Культуры клеток проверяли на отсутствие микоплазмы. За день до эксперимента 2×10^5 клеток РС3 и НЕК293 высевали в чашки Петри диаметром 35 мм. На следующий день культуральные чашки снова наполняли 2 мл теплой культуральной среды, содержащей 66 мкМ флуконазола, 34 мкМ L-173. В качестве контроля использовали необработанные

клетки. После 40 минутной инкубации клетки трижды аккуратно промывали теплым сбалансированным раствором Хэнкса («ПанЭко», Россия) и использовали для СИПМ измерений.

Для клеток млекопитающих измерения топографии и механических свойств были получены в растворе Хэнкса [145, 146], при этом первая величина падения ионного тока была $sp1$ установлена на 0,5 % (для топографии), а для получения карт модуля Юнга ($sp2$ и $sp3$) при падении ионного тока 1 % и 2 % соответственно. Использовались боросиликатные зонды радиусом 45 нм. Топографию дрожжевых клеток, иммобилизованных на слое силиконового эластомера SYLGARD™ 184 и в растворе Хэнкса. При этом концентрации препаратов составляли 1, 5, 10, 20 и 40 мкг/мл, падение ионного тока равнялось 0,2 % для топографии, и радиус нанокapилляра в диапазоне от 20 до 35 нм.

Изображения клеток дрожжей и млекопитающих записывали на участках 10×10 мкм и 30×30 мкм с уровнем разрешения 100 нм и 250 нм соответственно. Маленькие изображения дрожжевых клеток были получены на участках 1×1 мкм для поверхности клетки с уровнем разрешения 30 нм. Для каждой точки концентрации получали от трех до пяти больших изображений, всего от 15 до 20 клеток. Обработку изображений осуществляли с помощью программного обеспечения «SICMImageViewer». Анализ противогрибковой эффективности проводили путем сравнения высоты выпуклостей клеточной стенки на основе профилей поверхности.

Построение карт топографии и карт механических свойств происходит за счет нескольких рабочих точек обратной связи. Первая рабочая точка ($sp1$) – это детектирование, при котором падение тока составляет 0,2 %, при этом расстояние между крайней точкой зонда и объектом примерно равно радиусу нанокapилляра. Вторая ($sp2$) и третья ($sp3$) заданные точки – это положения по z_{sp2} и z_{sp3} , при которых ионный ток падает на 1 % (недеформируемая область) и 2 % (упругая деформация образца) соответственно. Значение индентации δ представляет собой разницу высот между первой, второй и третьей заданными точками [147], как показано ниже:

$$\delta = z_{sp2} - z_{sp3}, \quad (1)$$

где z_{sp2} – высота зонда в позиции $sp2$, z_{sp3} – высота зонда в позиции $sp3$.

Радиус нанокapилляра и механические характеристики рассчитывались по формуле [147]:

$$r = \frac{I_0}{k\pi V \tan(\alpha)}, \quad (2)$$

где угол полуконуса α составляет 3 градуса, k составляет 1,35 См/м, а V – удерживающий потенциал 200 мВ.

Величина модуля Юнга была рассчитана с использованием теоретической модели [148], как показано ниже:

$$E = pA \left(\frac{S_{sub}}{S_{cell}} - 1 \right)^{-1}, \quad (3)$$

где E – расчетный модуль Юнга, p – приложенное давление, A – константа, зависящая от геометрии нанокapилляра, а S_{sub} и S_{cell} – наклоны кривой ток-расстояние, наблюдаемые между уменьшением ионного тока на 1 % и 2 % при недеформируемой поверхности (S_{sub} – подложка) и клеточной поверхности (S_{cell}), соответственно.

2.4. Атомно-силовая микроскопия

Атомно-силовая микроскопия довольно хорошо зарекомендовавший себя метод, который позволяет проводить исследования различных параметров биологических объектов, в том числе и механические свойства клеток. Основной принцип работы АСМ построен на регистрации силового взаимодействия между зондом и поверхностью образца [43]. Зонд представляет собой острое, установленное на гибкий кантилевер, который освещается лазерным пучком. При механическом отклонении острия от образца, фотодиодом фиксируется отклонение лазерного пучка, величина которого зависит от сил взаимодействия между острием и образцом (рис. 32).

В данной работе оценка модуля Юнга клеток методом АСМ, проводится по модели Герца, которая описывает простой случай упругой деформации двух идеально однородных гладких тел, соприкасающихся под нагрузкой (рис. 32) [149]. В модели применяются следующие допущения: (а) форма индентора параболическая и (б) толщина образца много больше глубины индентации.

Измерения АСМ проводили с использованием АСМ Biscope Resolve (Bruker, Санта-Барбара, Калифорния), установленного на инвертированном оптическом микроскопе Axio Observer (Carl Zeiss, Германия) при комнатной температуре в солевом растворе. Использовались зонды PeakForce QNM-Live Cell (PFQNM-LC-A-CAL, Bruker AFM Probes, Камарилло, Калифорния, США), которые представляют собой короткие лопастные кантилеверы с предварительно калиброванной жесткостью пружины (0,107 Н/м) и радиусом 70 нм, длиной наконечника 17 мкм. Чувствительность кантилевера к отклонению (нм/В) калибровали по тепловому спектру непосредственно в чашке с образцом, используя предварительно калиброванное значение жесткости пружины. Режим Fast Force Volume использовался для наномеханического картирования с изображениями размером 10×10 или 2×2 мкм и размером от 40×40 до 100×100 точек. Отдельные кривые силы были получены при вертикальной пьезоскорости ~ 100 мкм/с (скорость линейного изменения 30 Гц с расстоянием 2 мкм) с заданным значением силы 5 нН.

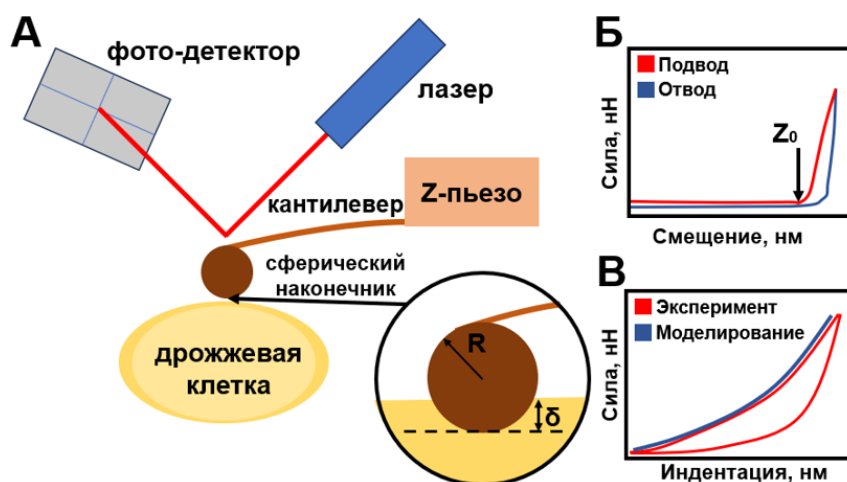


Рисунок 32 – (А) Схематическое изображение элементов установки АСМ. Сферический наконечник взаимодействует с поверхностью образца, что приводит к отклонению микрокантилевера, которое регистрируется фотодетектором с помощью лазерного луча, отраженного от микрокантилевера. При типичном измерении механических кривых основание микроконсоли приближается или удаляется с постоянной вертикальной скоростью, и сила регистрируется; (Б) Пример полученных кривых FZ, в которых стрелка указывает точку контакта зонда с образцом; (В) Пример преобразования кривой FZ в кривую силового вдавливания, из которой получается модуль Юнга.

Численная обработка кривых F-Z была выполнена с использованием программы MATLAB (The MathWorks, Натик, Массачусетс) в соответствии с работой [150] с использованием модели Герца:

$$F = \frac{4\sqrt{R}}{3(1-\nu^2)} E \delta^{\frac{3}{2}}, \quad (4)$$

где F – сила, действующая на кончик кантилевера; δ – глубина вдавливания; ν – коэффициент Пуассона образца (принимается равным 0,5); R – радиус вершины; E – локальный модуль Юнга. Коррекция нижнего эффекта не применялась из-за сопоставимой жесткости подложки и малой глубины отпечатка.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение топографии наноразмерных структур методом СИПМ

3.1.1. Влияние коммерческих противогрибковых препаратов на поверхностную структуру *C. parapsilosis* ATCC 22019

Азольные препараты ингибируют синтез эргостерола, что приводит к образованию цитоплазматической мембраны либо измененной структуры, либо даже к ее разрушению. Согласно предыдущим исследованиям [88, 94] влияние флуконазола на *Candida* можно наблюдать в виде образования выпуклых участков на поверхности клеток. Было высказано предположение, что после лечения *C. parapsilosis* вориконазолом и итраконазолом на поверхности клеток (рис. 26 (А)) на СИПМ изображениях должны быть видны выпуклые участки клеточной стенки. На СИПМ-изображениях контрольных клеток *C. parapsilosis* (приложение Д1) наблюдается слабо развитый рельеф клеточной стенки (рис. 33 (А, Р1)). Контрольные дрожжевые клетки имеют округлую вытянутую форму, их размер колеблется от 3 до 7 мкм. Дополнительно проводилось непрерывное сканирование контрольных клеток для подтверждения неинвазивности метода СИПМ (рис. 34). На поверхности *Candida*, обработанной вориконазолом (рис. 29 (Б, 2Р), приложение Д2)) или итраконазолом (рис. 33 (Д, 3Р), приложение Д3) в дозе 40 мкг/мл, обнаружены выпуклые участки клеточной стенки (средняя высота 130 и 200 нм, соответственно; $n = 15$ областей замера для каждого препарата). Процент поврежденной поверхности клеток после обработки вориконазолом и итраконазолом составляет $4 \pm 0,7 \%$ и $16 \pm 1 \%$, соответственно. Кроме того, на клетках, обработанных вориконазолом, были обнаружены бесформенные разрастания высотой до 0,8 мкм, предположительно являющиеся разрушенной капсулой клетки. Поскольку итраконазол демонстрирует более выраженное повреждение поверхностной структуры (итраконазол вызывает самый высокий процент повреждения клеток и площадь повреждения выше, чем у клеток обработанных вориконазолом), было решено использовать данный азол для изучения действия препарата при различных концентрациях.

Противогрибковый препарат микафунгин был выбран для демонстрации лизиса клеточной стенки, индуцированного препаратами группы эхинокандинов. Ожидается, что клетки, подвергшиеся воздействию препаратов, вызывающих лизис клеточной стенки, будут иметь приподнятые структуры или небольшие полости, как было продемонстрировано на примере другого эхинокандина [151]. *C. parapsilosis* ATCC 22019

инкубировали с этим препаратом в течение 24 часов при концентрации 40 мкг/мл. СИПМ-изображения клеток *Candida* продемонстрировали лизис клеточной стенки и выпячивание клеточной мембраны, которые выглядели как округлые структуры на поверхности дрожжей (рис. 33 (Г)). Полученные данные согласуются с ранее цитированными источниками.

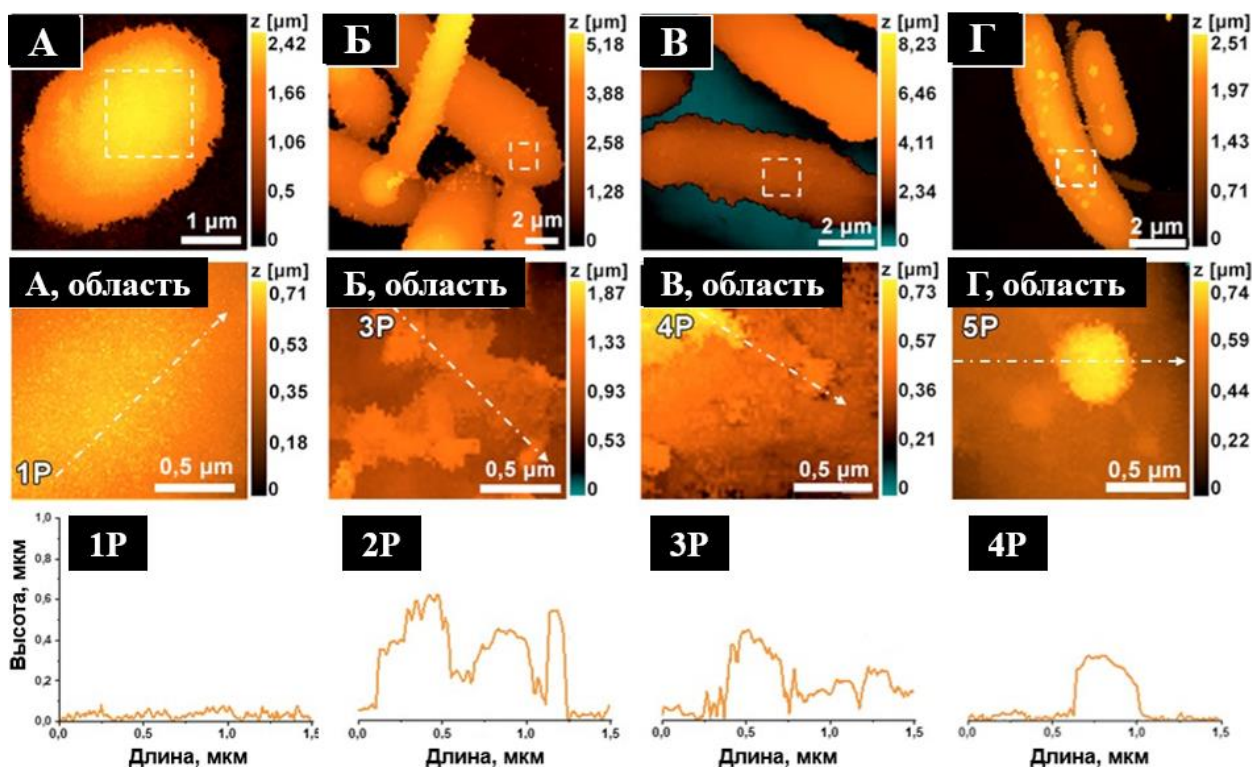


Рисунок 33 – СИПМ-изображения *C. parapsilosis* ATCC 22019, (А) контроль, (Б) после обработки вориконазолом в дозе 40 мкг/мл, (В) после лечения итраконазолом в дозе 40 мкг/мл, (Г) после обработки микафунгином в дозе 40 мкг/мл. Белыми пунктирными квадратами обозначены увеличенные области на вставках А1 – Г1. Белыми штрихпунктирными линиями отмечены профили (1Р-4Р).

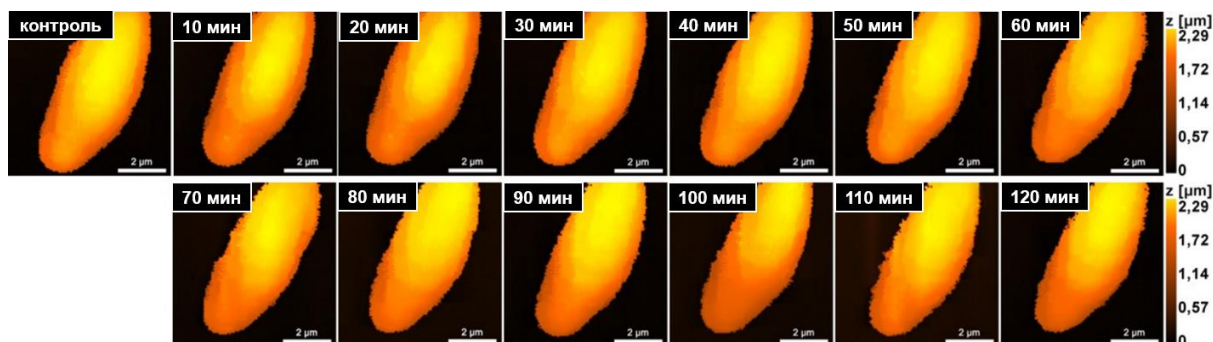


Рисунок 34 – СИПМ-изображения контрольной клетки *C. parapsilosis* ATCC 22019 при непрерывном сканировании в течение двух часов.

На СИПМ-изображениях *C. parapsilosis* ATCC 22019, инкубированных с итраконазолом при концентрациях 1, 5, 10, 20, 40 мкг/мл, наблюдается рост высоты рельефа участков на клетке при росте концентрации препарата (рис. 35 (А – Д; 1Р – 5Р)). При самой низкой концентрации 1 мкг/мл не было обнаружено изменений на поверхности клеток.

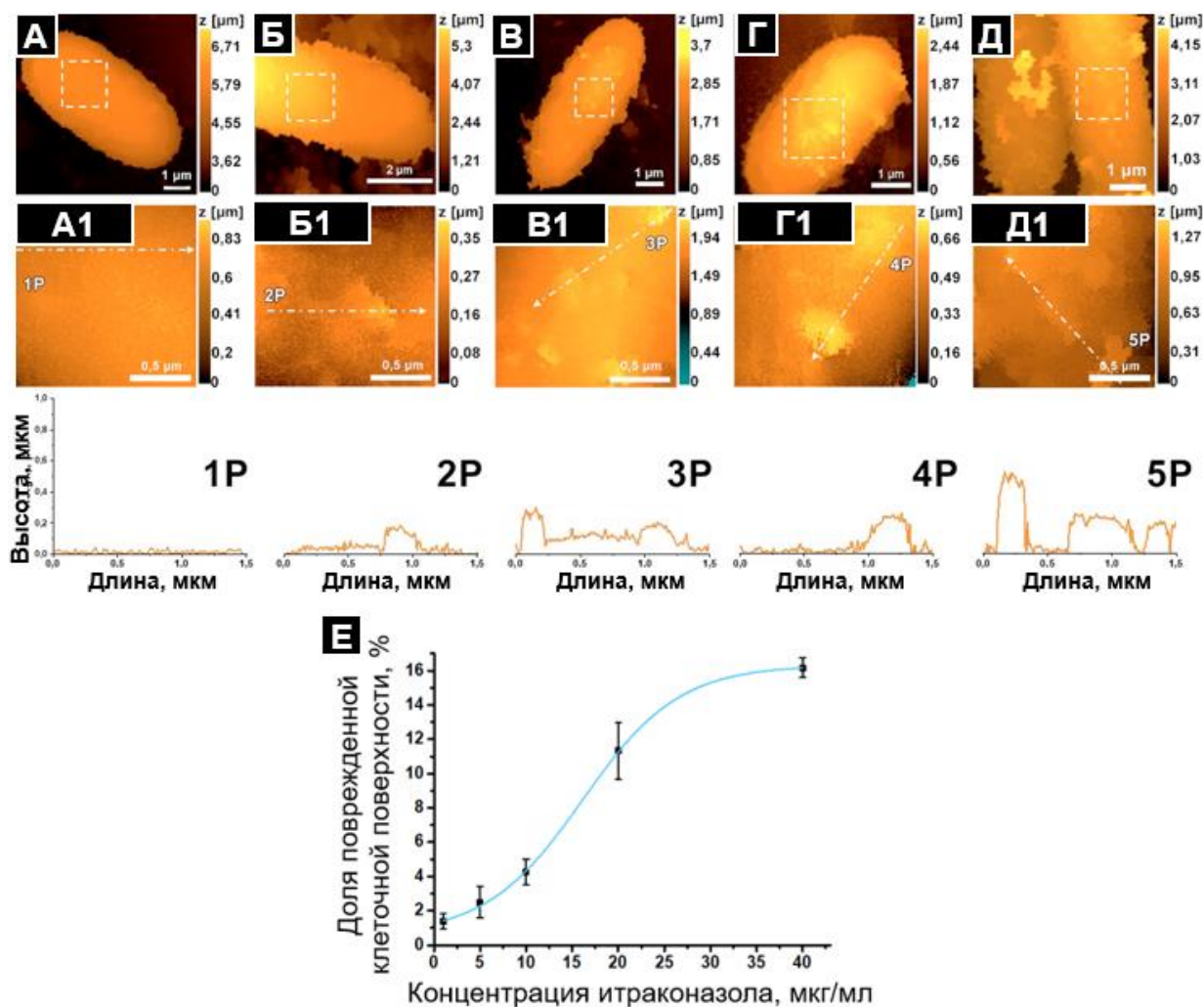


Рисунок 35 – СИПМ-изображения *C. parapsilosis* ATCC 22019 после лечения итраконазолом при концентрациях (А) 1 мкг/мл, (Б) 5 мкг/мл, (В) 10 мкг/мл, (Г) 20 мкг/мл, (Д) 40 мкг/мл. Белыми пунктирными квадратами обозначены увеличенные участки на области клетки (А – Д). Нормализованные профили высоты 1Р-5Р (белая пунктирная стрелка на топографии), (Е) Кривая доза-реакция доли поврежденной клеточной поверхности в зависимости от концентрации итраконазола.

Начиная с концентрации итраконазола 5 мкг/мл обнаружены низкие возвышения у клеточной стенки. При дальнейшем увеличении концентрации препарата увеличивалась не только высота рельефа участков клеточной стенки, но и площадь поверхности с

измененным рельефом. Используя данные о площади обработанной поверхности клеток, была построена кривая зависимости «доза-реакция» процента площади поврежденной поверхности клеток в зависимости от концентрации итраконазола (рис. 35 (Е)). Из представленного графика полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) итраконазола для *C. parapsilosis* ATCC 22019 составляет $16,11 \pm 0,46$ мкг/мл. Результаты показывают, что эффект воздействия итраконазола на рельеф поверхности *C. parapsilosis* ATCC 22019 усиливается с увеличением концентрации.

Полученные результаты согласуются с биологическими эффектами, описанными в литературном обзоре (подраздел 1.3.2). Предположительно триазолы с хлором в фениловой группе более выражено модифицируют рельеф поверхности, чем триазолы, у которых в этой группе фтор. Таким образом продемонстрировано, что метод СИПМ можно использовать для изучения модификации рельефа поверхности дрожжей под воздействием противогрибковых препаратов (групп азолов или эхинокандинов).

3.1.2. Влияние разрабатываемых противогрибковых препаратов на поверхностную структуру *Candida spp.*

После проведения экспериментов с коммерческими препаратами и подтверждения применимости метода СИПМ для оценки воздействия лекарственных средств, было проведено исследование воздействия разрабатываемых препаратов. В данном разделе использовали штаммы *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* ATCC 24433. Разумно использовать эффективные концентрации, чтобы увидеть любые изменения топографии, вызванные рассматриваемыми препаратами, и по этой причине были выбраны концентрации, равные МИК и $10 \times$ МПК как для микозидина, и для препарата 17b основанного на микозидине. МИК для микозидина в два раза ниже, чем для 17b, но 17b все еще был применен, поскольку он является высокоактивным ингибитором маннозилтрансферазы. После обработки клеток *C. albicans* ATCC 24433 и *C. parapsilosis* ATCC 22019 микозидином и соединением 17b (рис 36) обнаружены образования на поверхности клеток диаметром 100 – 200 нм. Появление таких образований на поверхности клеток, скорее всего, связано с разрушением клеточной стенки. С помощью представленной СИПМ методики возможно исследовать только клетки, прикрепленные к подложке, и, вероятно, по этой причине возможно найти устойчивые клетки без каких-либо повреждений, так как обильно поврежденные клетки перестают контактировать с подложкой и открепляются. Полученные результаты ясно демонстрируют, что действие как микозидина, так и 17b вызывает разрушение клеточной стенки, однако, микозидин достигает того же эффекта при гораздо меньшей концентрации.

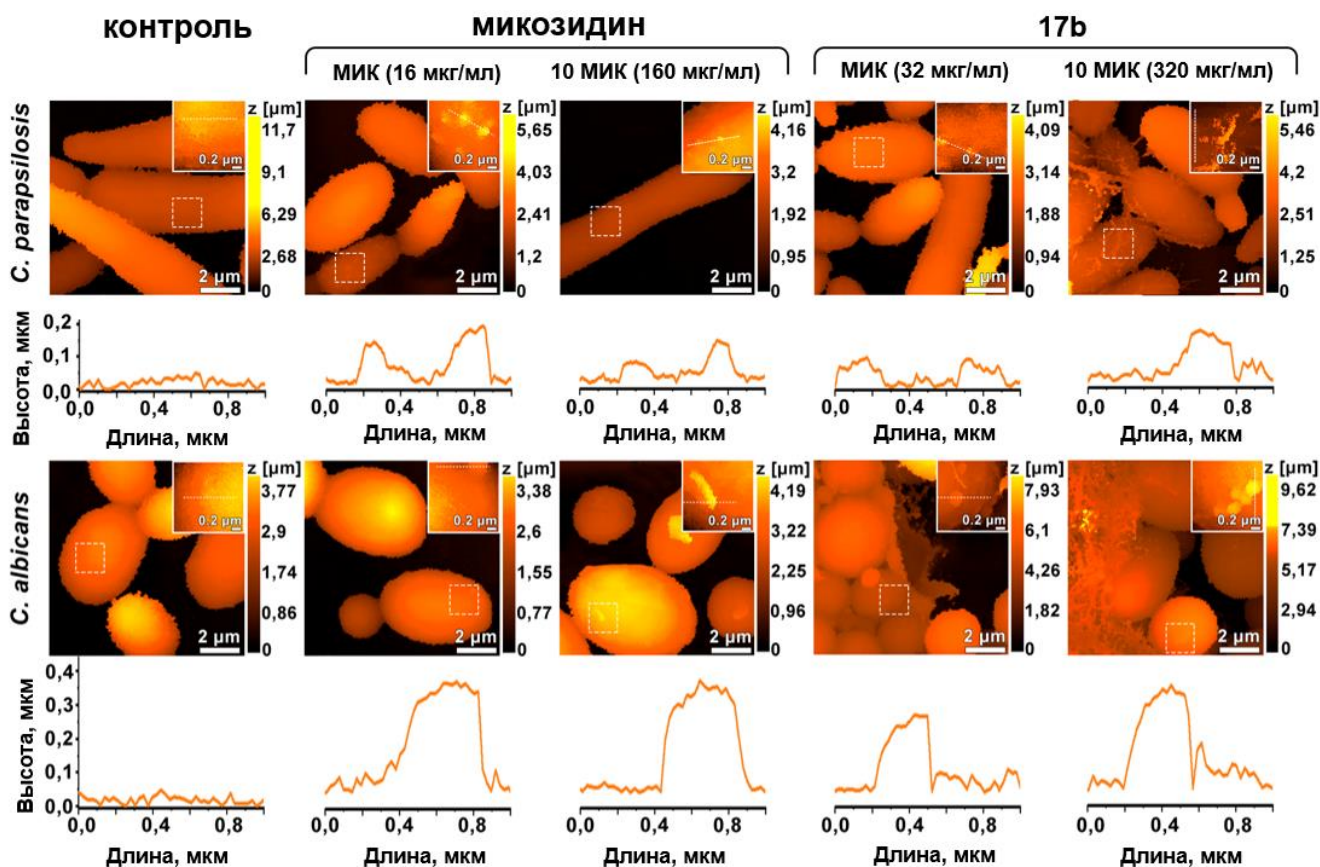


Рисунок 36 – СИПМ-изображения топографии клеток *Candida* (*C. parapsilosis* ATCC 22019 и *C. albicans* ATCC 24433) до и после обработки микозидином и 17b при МИК и 10×МИК

Затем было проведено исследование разрабатываемых препаратов производных тиазолидин-2,4-дионов на основе флуконазола (L-272, L-273, L-274, L-98R, дифлуконазол). При добавлении к дрожжам *C. parapsilosis* ATCC 22019 вещества L-272 (приложение Д4) концентрации $c = 1$ мкг/мл и суточной инкубации, на поверхности клеток появляются невысокие выпуклые участки, предположительно являющиеся деформированной клеточной стенкой. Однако, повышение концентрации препарата не приводит к значительному повышению величины поврежденных зон. Наилучший противогрибковый эффект L-272 достигается при $c = 40$ мкг/мл (рис. 37 (А)). Вещество L-273 (приложение Д5) при концентрации $c = 1$ мкг/мл вызывает образование выпуклых участков на поверхности *C. parapsilosis* ATCC 22019. Увеличение концентрации до $c = 10$ мкг/мл приводит к росту поврежденных участков по высоте, при этом дальнейшее повышение концентрации приводит к понижению выпуклых участков. Начиная с концентрации L-273 5 мкг/мл на клетках *C. parapsilosis* ATCC 22019 замечено образование волокнистых наростов. Оптимальной концентрацией для вещества L-273 является $c = 10$ мкг/мл (рис. 37 (Б)).

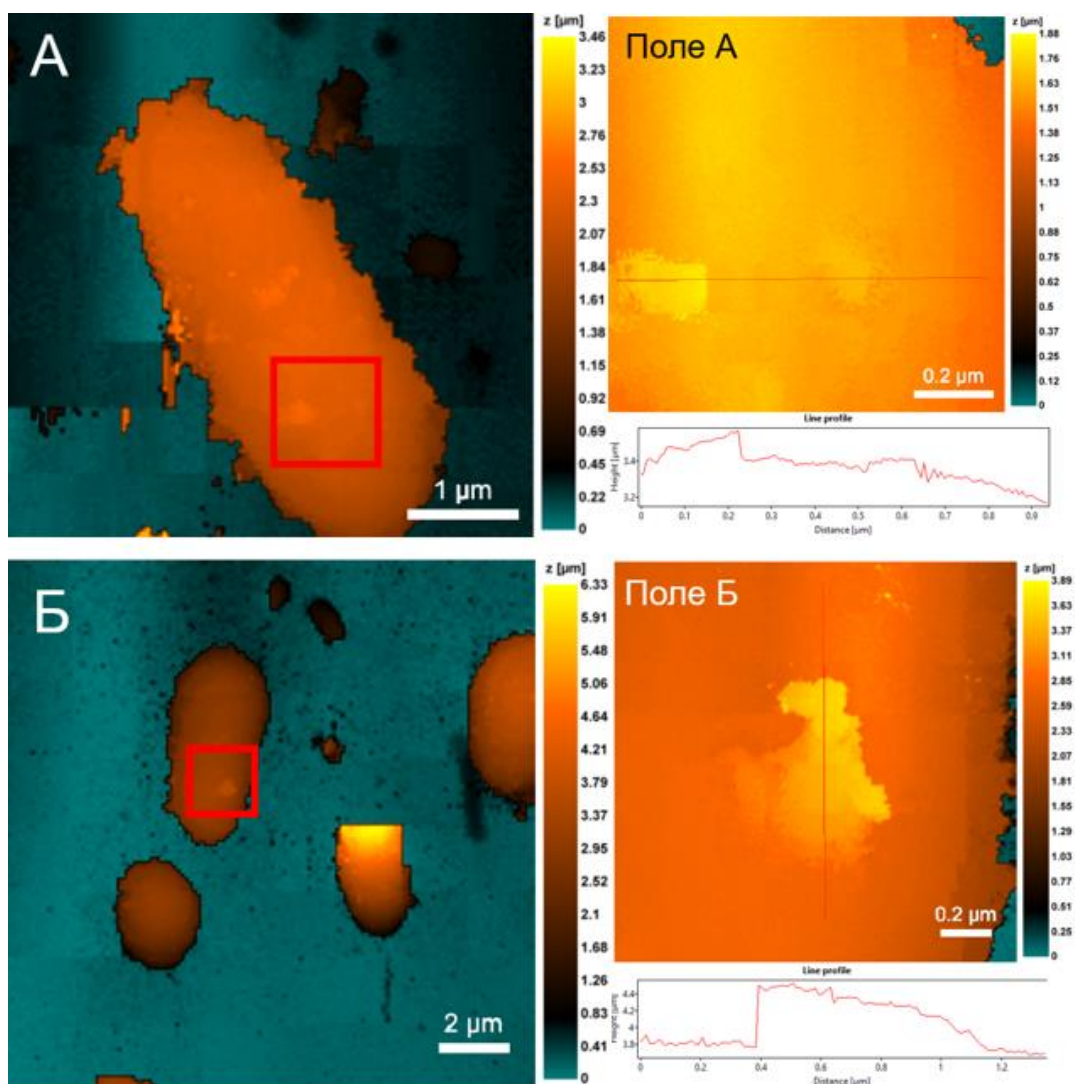


Рисунок 37 – Топография грибка *C. parapsilosis* ATCC 22019 при суточной инкубации с веществами (А) L-272 (с = 40 мкг/мл); L-273 (с = 10 мкг/мл)

Наиболее активным веществом из этой группы является L-274. У вида *C. parapsilosis* ATCC 22019 (приложение Д6) данное соединение вызывает обширное повреждение структуры поверхности начиная с концентрации в 1 мкг/мл. При более высоких концентрациях (20 и 40 мкг/мл), кроме возвышенных участков, обнаружены трещины на поверхности, что может свидетельствовать о лизисе клеточной стенки. Оптимальной концентрацией L-274 для *C. parapsilosis* ATCC 22019 является 5 мкг/мл (рис. 38 (А)). Также было дополнительно исследовано воздействие для вида *C. krusei* 432М (приложение Д7) противогрибковый эффект L-274 наблюдается начиная с 5 мкг/мл. Однако, при повышении концентрации вещества, высота выпуклых участков начинает снижаться, и начинается лизис клеточной стенки. Оптимальной концентрацией L-274 для *C. krusei* 432М является с = 5 мкг/мл (рис. 38 (Б)).

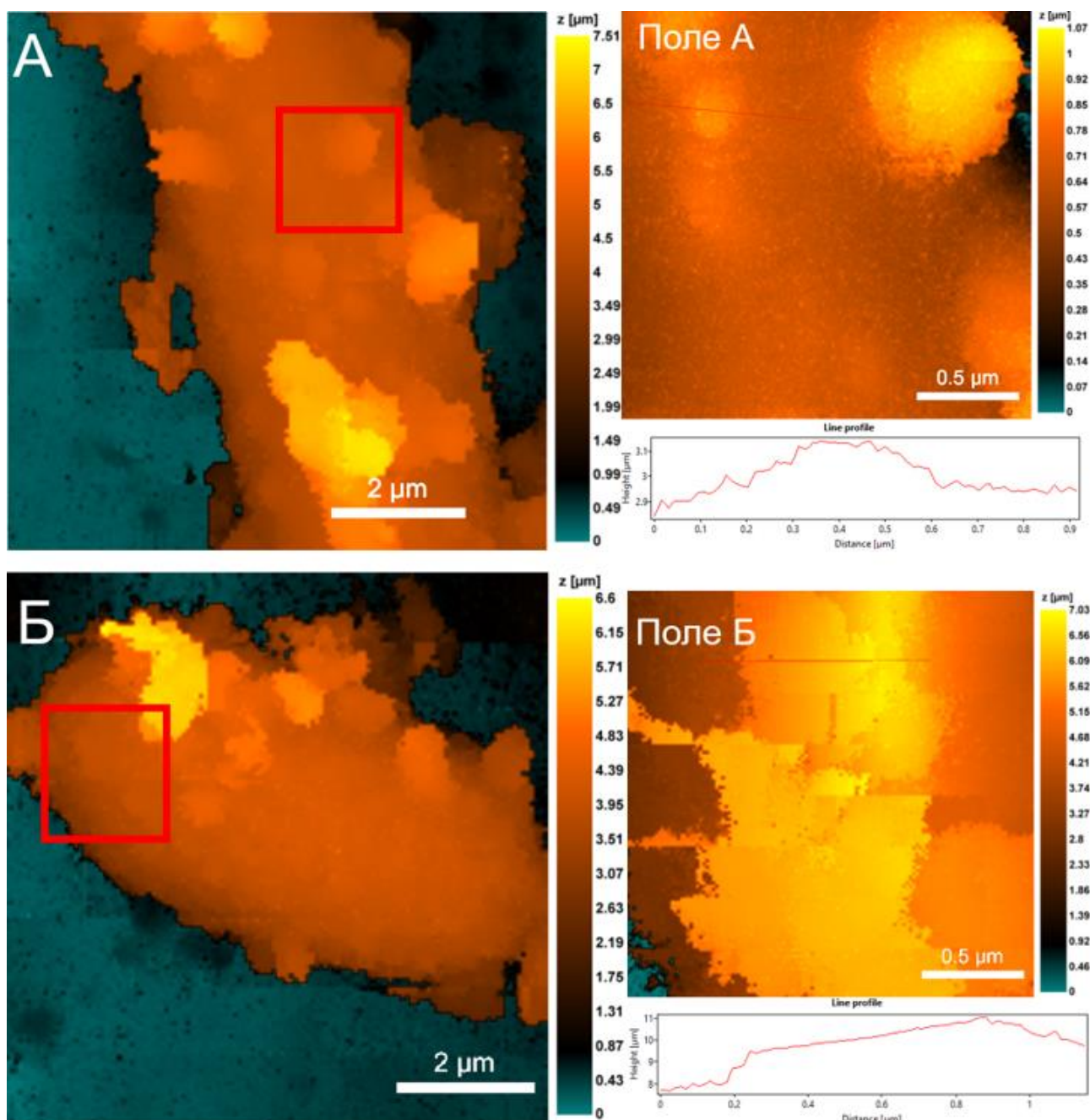


Рисунок 38 – Топография дрожжей (А) *C. parapsilosis* ATCC 22019 с L-274 (с = 5 мкг/мл) и (Б) *C. krusei* 432M с L-274 (с = 5 мкг/мл)

Наименьший противогрибковый эффект показало вещество L-98R. У дрожжей *C. parapsilosis* ATCC 22019, инкубированных с L-98R (приложение Д8), обнаружено слабое повреждение поверхностной структуры лишь при 40 мкг/мл (рис. 39 (А)). При инкубации *C. krusei* 432M с веществом L-98R (приложение Д9) обнаружено образование бесформенных наростов на поверхности клеток при концентрации 10 мкг/мл, и появление поврежденных участков клеточной стенки при 20 мкг/мл (рис. 39 (Б)). При более высокой дозе (40 мкг/мл) воздействие вещества не наблюдается.

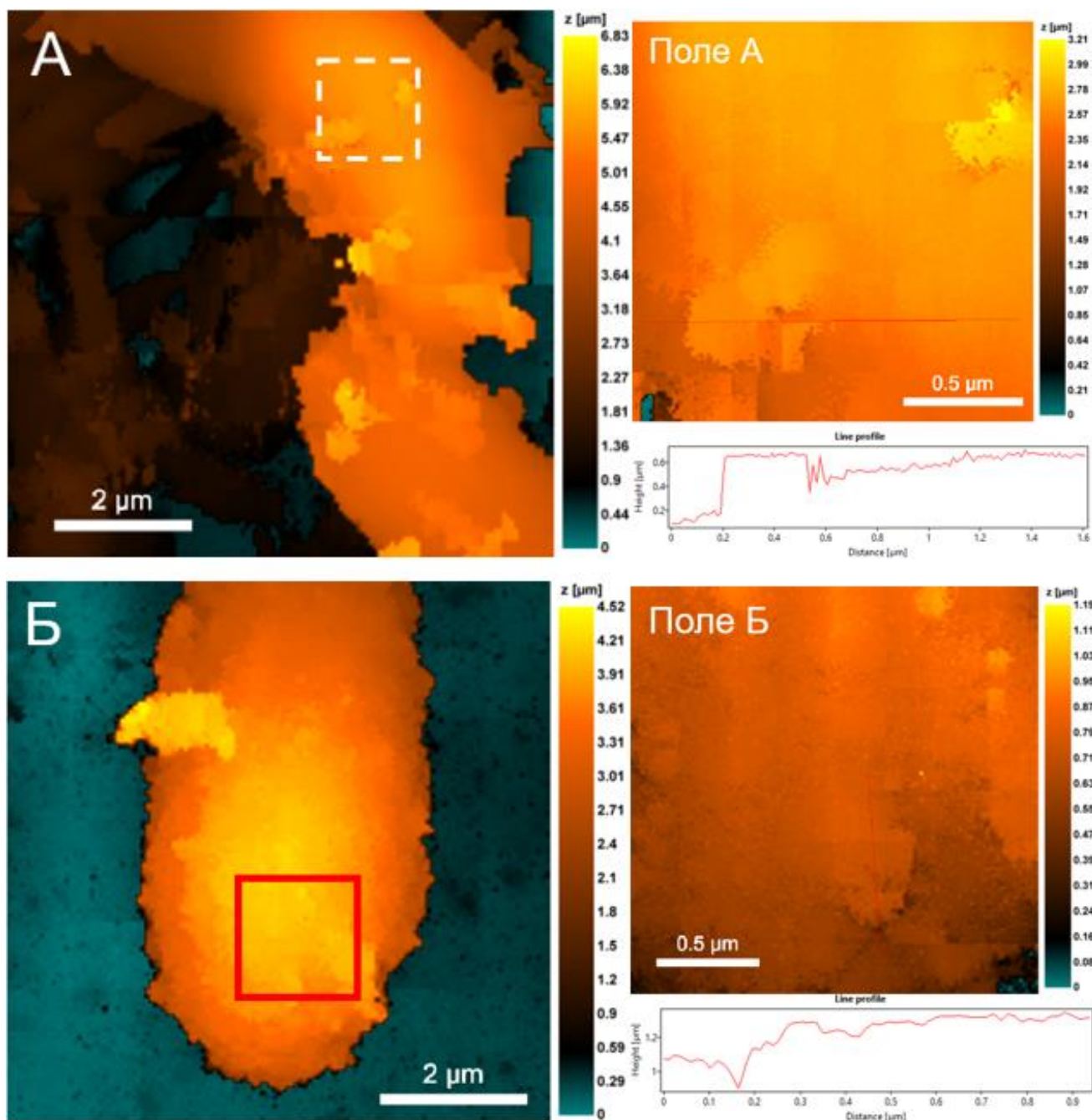


Рисунок 39 – Топография дрожжей (А) *C. parapsilosis* ATCC 22019 с L-98 R (с = 40 мкг/мл) и (Б) *C. krusei* 432M с L-98 R (с = 20 мкг/мл)

Инкубация *C. parapsilosis* с дифлуконазолом приводит к лизису клеточной стенки дрожжей (рис. 40 (Б), приложение Д10). При концентрации вещества в 1 мкг/мл клеточная стенка становится рыхлой, а на поверхности появляются выпуклые участки, что указывает на разрушение мембраны. С повышением концентрации на поверхности образуются трещины и волокнистые наросты. Оптимальной концентрацией дифлуконазола является 20 мкг/мл (рис. 40 (Б)).

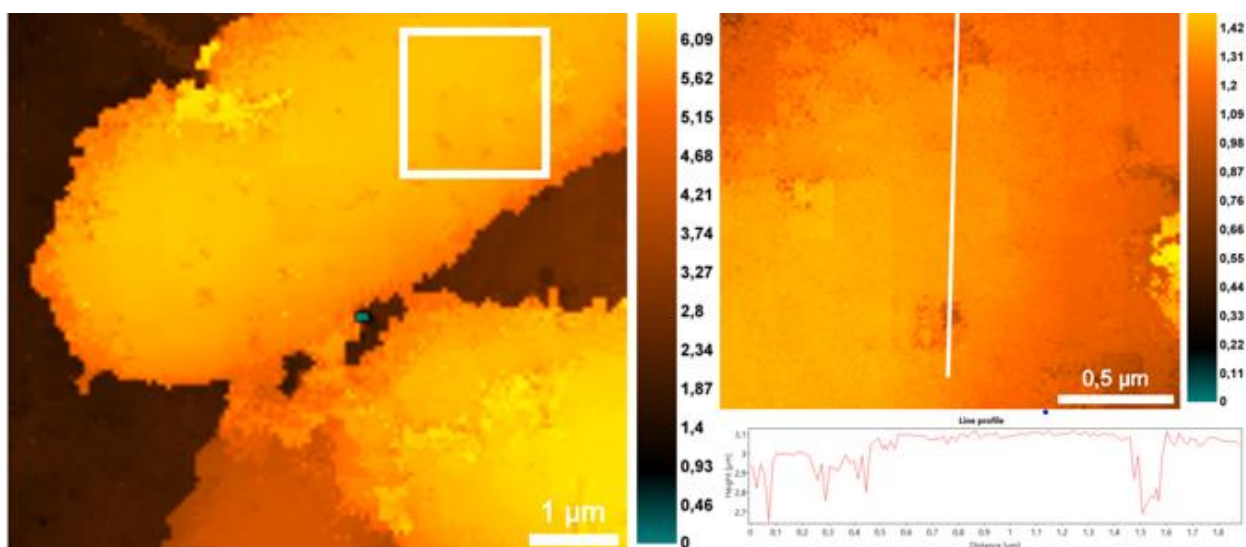


Рисунок 40 – Топография дрожжей *C. parapsilosis* ATCC 22019 дифлуконазолом (20 мкг/мл)

Последним рассматриваемым в данной работе производным тиазолидин-2,4-дионом является гибрид группы азолов и эхинокандинов L-173. При добавлении вещества L-173 концентрацией $c = 60$ мкг/мл и инкубации в течение трех часов, у одиночных грибов наблюдается образование на поверхности впадин, что демонстрирует деградацию клеточной стенки. У грибов в группах образуются выпуклые участки, предположительно свидетельствующие в осмотическом выпирании цитоплазматической мембраны (рис. 41), агрегации дрожжей не наблюдается (приложение Д11).

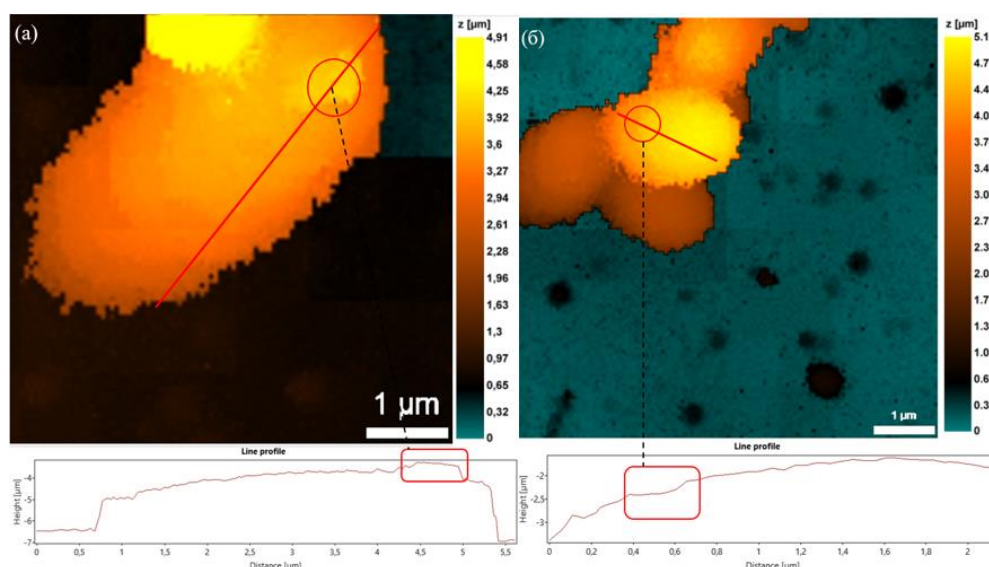


Рисунок 41 – Топография грибка *C. parapsilosis* ATCC 22019 под воздействием вещества L-173 концентрацией $c = 60$ мкг/мл: (а) выпуклые участки, (б) впадины

При суточной инкубации дрожжей с веществом L-173 ($c = 60$ мкг/мл) выявлено, что средняя высота выпуклых участков по поверхности составляет (655 ± 7) нм. Количество клеток, на которых обнаружен лизис клеточной стенки из группы в процентном соотношении составляет 46,7 %.

При инкубации с веществом L-173 ($c = 30$ мкг/мл) в течение суток, обнаружено разрушение грибка, поверхность которого становится рыхлой, на клетках образуется капсула, что предварительно можно объяснить одним из механизмов, направленных на поддержание жизнеспособности колонии (рис. 42). Обнаружено образование агломератов (приложение A12). Количество выпуклых участков практически не обнаружено, что может быть вызвано восстановлением клеточной стенки дрожжей в составе агломератов.

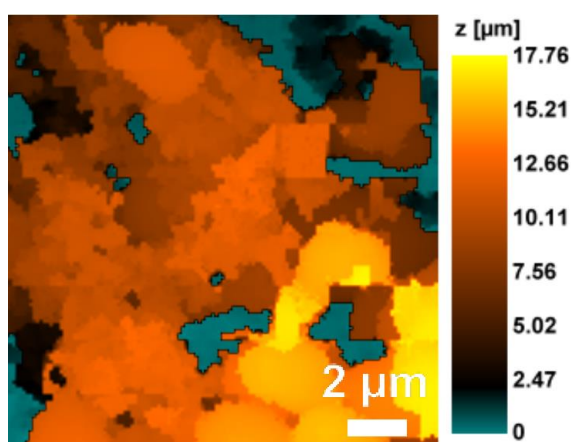


Рисунок 42 – Топография агломерата грибка *C. parapsilosis* ATCC 22019 при суточной инкубации с препаратом L-173 ($c = 30$ мкг/мл)

Обнаружено, что при низкой концентрации препарата L-173 (около 0,01 мкг/мл) на суточной инкубации, эффект воздействия на клеточную стенку незначителен, агломераты практически не возникают, а поверхность большинства клеток гладкая, как в контрольной группе. Начиная с концентрации 0,03 мкг/мл, заметно образование средних размеров агломератов, в составе которых на клетках не обнаружены выпуклости или впадины, на одиночных дрожжах заметны небольшие наросты или выпуклые участки (приложение A4). С увеличением концентрации прослеживается рост агломератов, а на поверхности начинают преобладать впадины (рис. 43). При концентрациях выше 30 мкг/мл удастся обнаружить лопнувшие грибки (рисунок 44).

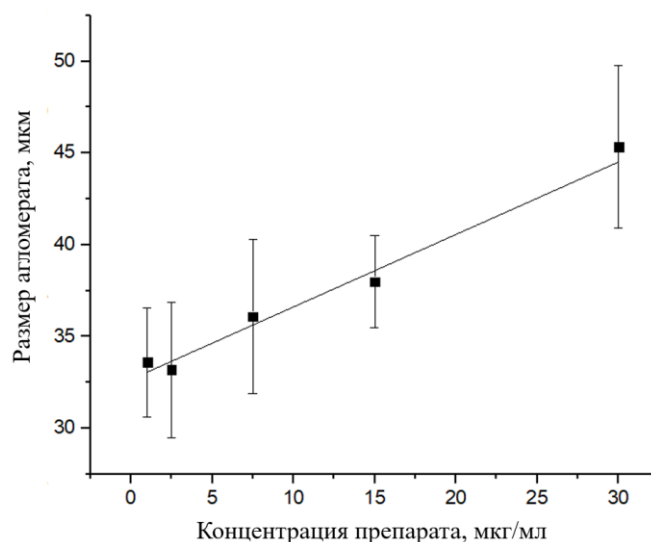


Рисунок 43 – Зависимость размеров агломератов *C. parapsilosis* ATCC 22019 от концентрации вещества L-173.

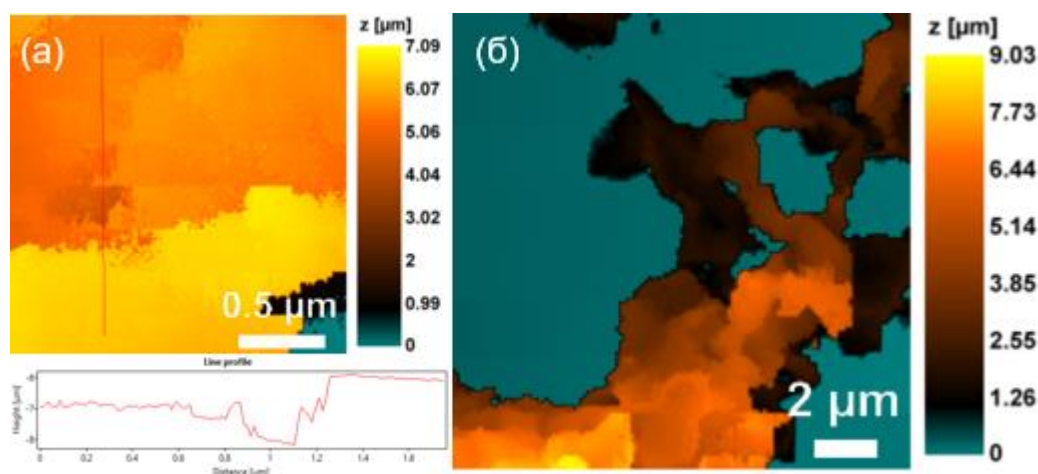


Рисунок 44 – Топография агломерата грибка *C. parapsilosis* ATCC 22019 при суточной инкубации с препаратом L-173 ($c = 30$ мкг/мл): (а) впадина на поверхности грибка; (б) лопнувшие грибки

Таким образом полученные данные о воздействии разрабатываемых препаратов на физико-химические свойства клеточных структур дрожжей. Так как производные тиазолидин-2,4-дионов приводят к разрушению мембраны, выражающееся через образование шероховатых поврежденных участков, и лизису клеточной стенки с последующим ее выпячиванием. Можно заключить о двойном воздействии исследуемых в данном разделе препаратов, а проявляющиеся биологические эффекты подтверждают ингибирование синтеза как глюканов, так и цитохрома. При этом активность тиазолидинов с фтор- или хлорфениловой группой, как у триазолов, уже не так высока.

Наибольший эффект воздействия проявляют тиазолидины с алкеновой группой, причем чем больше число атомов углерода в этой группе, тем выше активность препарата.

3.1.3. Сравнение воздействия препаратов на дрожжи *Candida spp.*

Классификация воздействия препаратов на дрожжи *C. parapsilosis* ATCC 22019 представляет собой следующие типы: «КС» – вещество приводит к лизису клеточной стенки; «ЦМ» – вещество приводит к разрушению цитоплазматической мембраны; «КС + ЦМ» – вещество приводит к лизису клеточной стенки и разрушению мембраны одновременно; «0» – воздействие вещества не обнаружено, клетки схожи с контрольной группой; «1» – замечено изменение поверхности клеточной стенки; «2» – выявлено выпирание клеточной стенки; «3» – обнаружены мертвые/разрушенные клетки. Общее воздействие препаратов на дрожжи представлены в таблице 3. Данные по воздействию препаратов при различных концентрациях на дрожжи *C. parapsilosis* представлены в таблице 4.

Таблица 3 – Воздействие исследуемых веществ на патогенные дрожжи в сравнении с коммерческими противогрибковыми препаратами

Препарат /штамм	L-272	L-273	L-274	L-98R	L-173	Дифлукона зол	17b
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	2 ЦМ	1 ЦМ	3 КС + ЦМ	1 ЦМ	3 КС + ЦМ	2 КС + ЦМ	2 КС
<i>C. albicans</i> R8	–	–	–	–	–	–	3 КС
<i>C. krusei</i> 432M	–	–	3 КС + ЦМ	1 ЦМ	–	–	–
Препарат /штамм	Ворико- назол	Итрако- назол	Микозидин	Мика- фунгин	–	–	–
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1 ЦМ	2 ЦМ	2 КС	2 КС	–	–	–

Исходя из представленных данных, можно сделать вывод, что препараты L-272, L-273, L-274 и L-173 наиболее активно, в сравнении с прочими, модифицируют рельеф поверхности, оказывают значимое воздействие на всем интервале концентраций и приводят к обширному поражению клеток.

Таблица 4 – Воздействие препаратов на дрожжи *C. parapsilosis* ATCC 22019

Вещество/ Концентрация, мкг/мл	1	5	10	20	40
L-272	2	2	2	2	2
L-273	2	2	1	1	1
L-274	3	3	1	1	2
L-98R	0	0	0	0	2
L-173	1	1	2	2	3
Дифлуконазол	2	1	2	2	1
Флуконазол	0	0	0	0	0
Итраконазол	1	1	2	2	3
Вориконазол	0	1	1	0	1
Микозидин	0	1	1	2	2
Микафунгин	0	0	2	2	2

3.1.4. Селективность препарата L-173

Так как препарат L-173 показал наилучшую активность, среди рассматриваемых в этом разделе препаратов (приводил к полному разрушению клеток), было решено проверить его селективность относительно других, более резистентных, видов дрожжей *Candida spp.* (*C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* 8R, *C. krusei* 432M). В контрольной группе *C. parapsilosis* ATCC 22019 форма клеток овальная или округлая, поверхность гладкая, размер варьирует от 2 до 15 мкм (рис. 45 (А), приложение Д1). Клетки контрольной группы *C. albicans* 8R округлые (размером от 2 до 7 мкм, приложение Д12), поверхность их гладкая, рельеф развит слабо (рис. 45 (Б)). Клетки контрольной группы *C. krusei* 432M имеют форму вытянутого эллипса (размер от 3 до 10 мкм, приложение Д13), поверхность их шероховатая, образуют агломераты диаметром до 60 мкм (рис. 45 (В)).

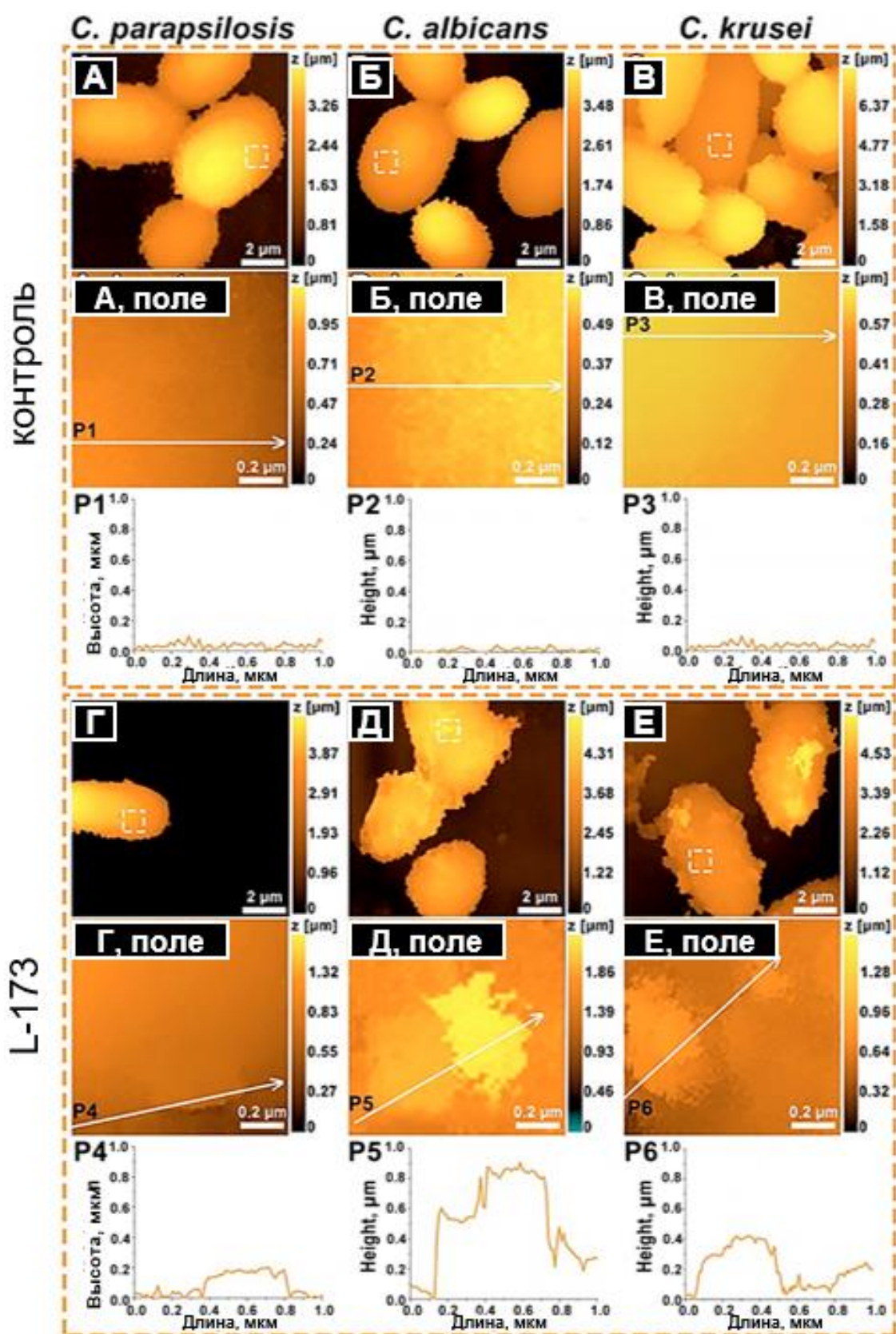


Рисунок 45 – СИПМ-изображения *C. parapsilosis* ATCC 22019 (А, Г), *C. albicans* 8R (Б, Д), *C. krusei* 432M (В, Е). Контрольные клетки (А – В) и клетки после обработки L-173 в концентрации 40 мкг/мл (Г – Е). Белыми пунктирными квадратами обозначены увеличенные участки на вставках А – Е. Белыми линиями отмечены профили (Р1 – Р6).

На основании полученных топографических данных были выявлены следующие виды повреждений: образование отрывной трещины на поверхности ячейки (пример на рис. 45 (Г, поле)); образование хлопьевидных структур на поверхности клеток, что мы интерпретируем как разрушение клеточной стенки (пример на рис. 45 (Д, поле)); образование волокнистых структур на поверхности клеток, которые мы интерпретируем как разрушенную полисахаридную капсулу (пример на рис. 45 (Е), правый верхний угол).

При инкубации *C. parapsilosis* ATCC 22019 с веществом L-173 концентрации 40 мкг/мл (а также 10 мкг/мл и 20 мкг/мл) в течение суток выявлено разрушение клеточной стенки гриба, поверхность которой становится рыхлой (рис. 45 (Г)). Количество поврежденных участков сравнительно невелико, а их средняя высота составляет около 0,2 мкм, что может быть связано с видоспецифичными особенностями этого штамма. При ингибировании в низких концентрациях (1 мкг/мл и 5 мкг/мл) на поверхности клеток образуются отрывные трещины. Клетки *C. albicans* 8R, инкубированные с L-173 (с = 40 мкг/мл), имеют широкую зону повреждения клеточной стенки и поверхностных полисахаридов, высота которой достигает 0,9 мкм (рис. 45 (Д)). При низких концентрациях L-173 (1 мкг/мл и 5 мкг/мл) эффекта не обнаружено, а при концентрациях 10 мкг/мл и 20 мкг/мл на поверхности обнаруживались поврежденные участки клеточной стенки. На поверхности клеток *C. krusei* 432M, обработанных препаратом L-173 (с = 40 мкг/мл), также выявлены разрушенные структуры полисахаридов (высотой до 1,5 мкм) и поврежденные участки клеточной стенки (высотой до 0,5 мкм). высокие) (рис. 45 (Е)). При низкой концентрации 1 мкг/мл эффекта не обнаружено, при концентрации 5 мкг/мл обнаружены незначительные изменения в структуре поверхности, а при концентрациях 10 мкг/мл и 20 мкг/мл на поверхности клеток наблюдалось разрушение клеточной стенки.

Для сравнения эффектов препарата L-173 в различных концентрациях использовалась следующая классификация: «0» - эффект препарата не выявлен, клетки аналогичны контрольной группе; «1» — на поверхности ячейки обнаружены отрывные трещины; «2» — на ее поверхности разрушается клеточная стенка, образуются шелушащиеся и волокнистые структуры; «3» — поверхность клеток повреждена более чем на 80 %, клетки считаются погибшими/разрушенными. Данные представлены в таблице 5.

Из полученных данных следует, что L-173 высокоактивен на дрожжах *C. krusei* 432M практически на всем интервале концентраций, в случае с дрожжами *C. albicans* 8R активность также высока, но проявляется уже с более высоких доз, начиная от 10 мкг/мл.

L-173 проявляет уже менее выраженную активность относительно штамма *C. parapsilosis* ATCC 22019, хоть и воздействует на всем интервале концентраций.

Таблица 5 – Воздействие препарата L-173 на дрожжи *Candida spp.* (где 0 – отсутствие эффекта, 3 – максимальный эффект)

Штамм/ Концентрация, мкг/мл	1	5	10	20	40
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1	1	2	2	2
<i>C. albicans</i> 8R	0	0	2	2	3
<i>C. krusei</i> 432M	0	1	2	2	3

3.2. Изучение механических свойств наноразмерных структур методом СИПМ

3.2.1. Апробация СИПМ методики для измерения механических свойств

В предыдущей главе была описана, разработанная в рамках данной работы, модель на основе деформации двойным электрическим слоем декан-солевого раствора с нанокapилляром для получения механических свойств методом СИПМ. Была проведена оценка силы, прикладываемой зондом. В качестве эталонного метода проводились измерения индентации с помощью АСМ. В качестве калибровочного образца использовался силиконовый эластомер Sylgard, применяемый ранее для модификации чашек Петри. Данный полимер индентировали кантилевером АСМ и нанокapилляром СИПМ (рис. 46). Минимальное значение индентации для АСМ на порядок превышает максимальное значение индентации зондом СИПМ.

Полученные методами СИПМ и АСМ изображения топографии и карты индентации, представлены на рисунке 47. Для метода СИПМ использовались зонды с радиусом наконечника 35 нм и соответствующей силой около 0,2 – 0,4 нН. Для метода АСМ использовались зонды с радиусом наконечника 70 нм и соответствующей силой около 1 нН. Модуль Юнга, определяемый как соотношение между напряжением и деформацией, зависит от структуры индентируемого образца. Живые клетки представляют собой гетерогенный материал, состоящий из цитоскелета, мембраны и клеточных органелл с разными механическими свойствами.

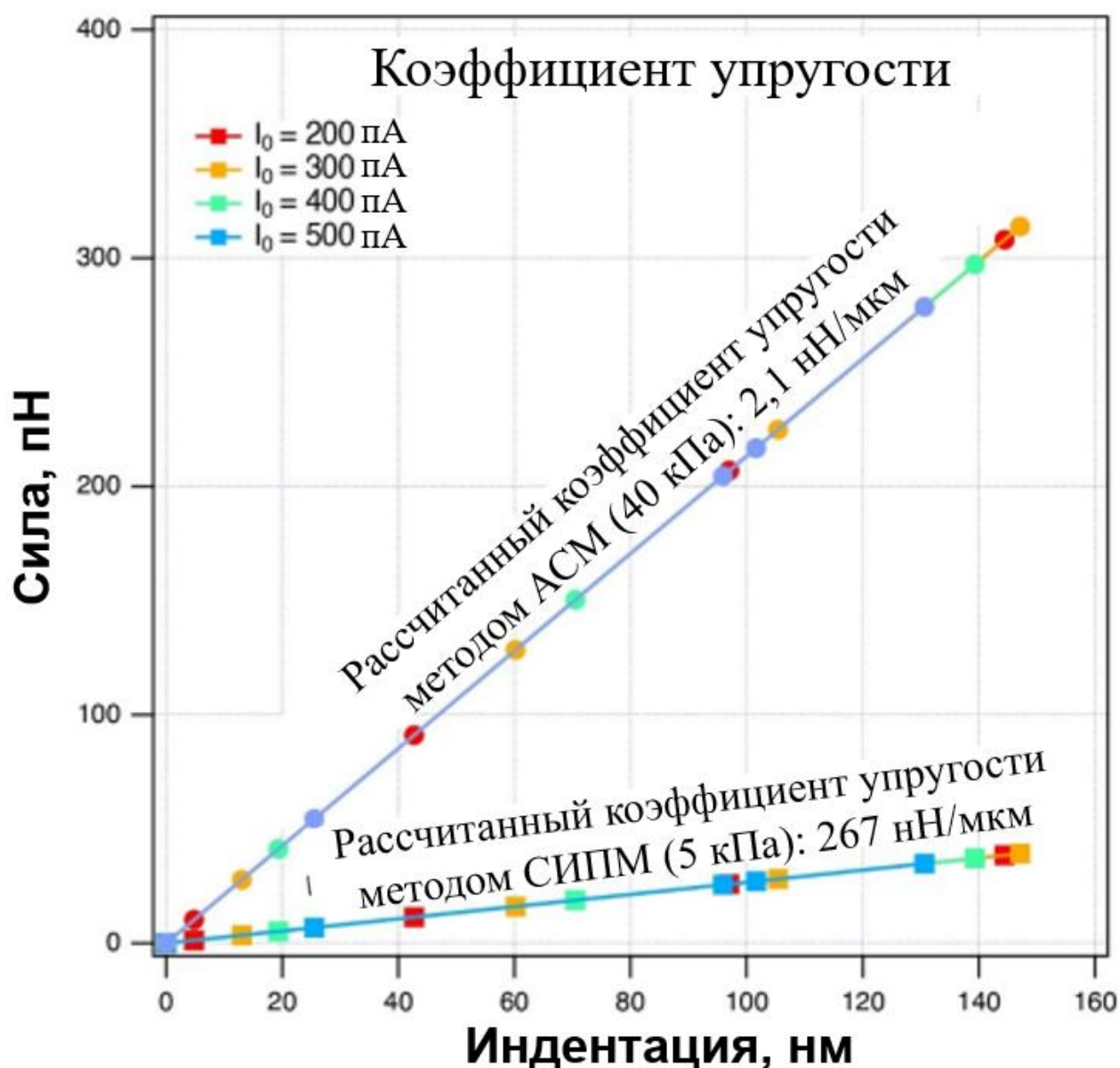


Рисунок 46 – Кривые сила-индентация на полимере Sylgard для СИПМ и АСМ

Методы зондовой микроскопии, используемые для получения индентации, могут вызывать разницу в значении модуля Юнга. Разница между картами индентации, полученными с помощью АСМ и СИПМ, вероятно, связана с силами, которые прикладывают к клетке. СИПМ изображения демонстрируют отклик поверхностного слоя клетки, состоящей в основном из частей цитоскелета. Однако АСМ данные содержат среднюю величину деформации всей клетки, включая цитоскелет и клеточные органеллы. Из полученных СИПМ данных отчетливо видна разница в тонких структурах цитоскелета (рис. 47 (В)), тогда как АСМ позволяет четко определить жесткость ядра внутри клетки (рис. 47 (Г)).

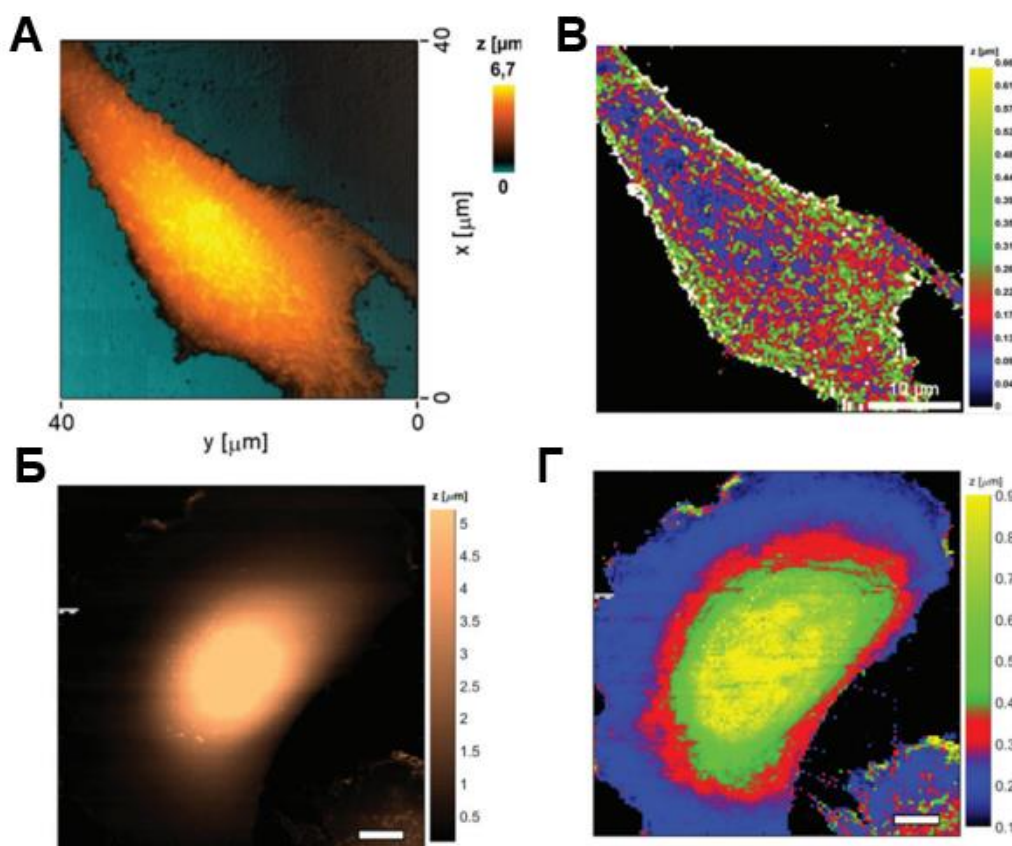


Рисунок 47 – Снимки клеток РС3 (А, Б) топография, (В, Г) карта индентации, полученные с помощью СИПМ (А, В) и АСМ (Б, Г)

3.2.2. Механические характеристики клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019

Основываясь на морфологических изменениях, наблюдаемых у *C. parapsilosis* ATCC 22019, обработанных итраконазолом в дозе 40 мкг/мл, было решено исследовать возможные механические изменения, возникающие в результате повреждения поверхности клеток. Предположительно, выпуклости на поверхности должны отражать участки с измененным рельефом поверхности (рис. 48 (А)). Поэтому такая поверхность должна быть мягче, чем у неповрежденных дрожжей. Механические свойства клеток определяли по глубине деформации, как сообщалось ранее. По изображениям клеток, обработанных итраконазолом при концентрации 40 мкг/мл (рис. 48 (Б)), выбиралась область с выпуклыми участками клеточной стенки и проводилось сканирование топографии с одновременным картированием механических свойств. На рисунке 48 (1, 2, 3) показаны топография, карта глубины деформации и карта модуля Юнга поврежденных участков на поверхности *C. parapsilosis* ATCC 22019, соответственно. Установлено, что зоны с неповрежденной клеточной поверхностью имеют незначительную глубину деформации, близкую к нулевой, а зоны с поврежденными участками клеточной стенки (на рис. 48 (Б) выделено белым пунктиром)

имеют глубину деформации около $\delta = 57 \pm 4$ нм и модуль Юнга $E = 1,9$ кПа. Средняя высота поврежденных участков $h = 0,32 \pm 0,02$ мкм. Таким образом модуль Юнга измененного рельефа ниже, чем модуль Юнга рельефа поверхности, не подвергшейся изменению.

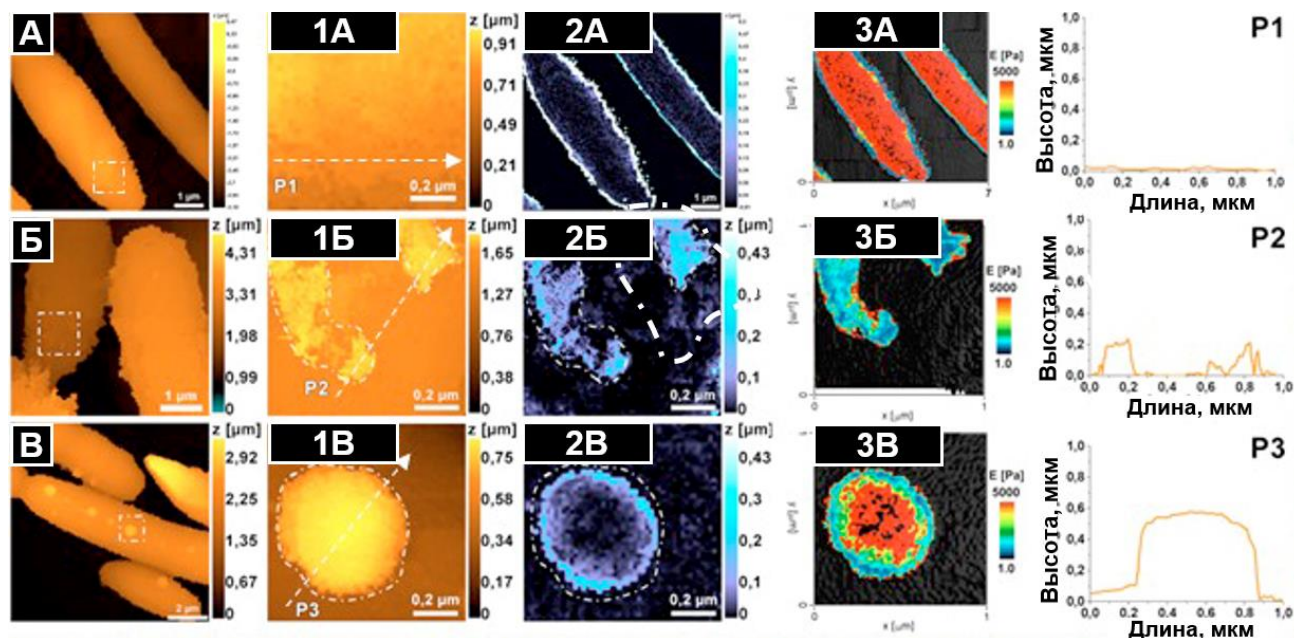


Рисунок 48 – СИПМ-изображения; топография (1), деформация (2), карта модуля Юнга (3); (А) контрольные клетки *C. parapsilosis* ATCC 22019; (Б) обработанные итраконазолом; (В) обработанные микафунгином. Нормализованные профили высот P1- P3 (белая черта на топографии (1) выше)

Аналогично была получена величина глубины деформации на поверхности клеток, обработанных микафунгином при концентрации 40 мкг/мл. На рисунке 48 (В) показана топография, картирование глубины деформации и картирование модуля Юнга клеточных участков с выпячиванием клеточной мембраны. Под воздействием данного препарата также характерно размягчение поврежденных участков дрожжевой клетки и образования незначительных углублений на здоровых участках. Средняя величина глубины деформации поврежденного участка $\delta = 32 \pm 3$ нм, модуль Юнга на поврежденных участках $E = 8,2 \pm 0,2$ кПа, средняя высота поврежденных участков $h = 0,5 \pm 0,03$ мкм. Однако метод СИПМ не позволяет в полной мере оценить модуль Юнга таких жестких конструкций из-за малой силы воздействия зонда на образец. Таким образом, были определены механические свойства измененного рельефа поверхности, предположительно являющегося участком клеточной стенки, подвергшейся лизису, у клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Для сравнительной оценки данных, полученных методом СИПМ, было проведено исследование аналогичных клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019 методом АСМ. На рисунке 49 (А, Б, В) показаны изображения контрольных и обработанных итраконазолом или микафунгином клеток. На поверхности контрольных клеток были обнаружены мягкие структуры (предположительно полисахариды) высотой $h = 0,15 \pm 0,05$ мкм, величиной глубины деформации $\delta = 100 \pm 50$ нм и величиной модуля Юнга $E = 0,3 \pm 0,2$ МПа. Модуль Юнга клеточной стенки контрольных клеток составляет $E = 0,8 \pm 0,3$ МПа. В клетках, обработанных итраконазолом, также наблюдались пораженные участки структуры клеточной поверхности высотой $h = 0,2 \pm 0,1$ мкм, величиной глубины деформации $\delta = 100 \pm 50$ мкм и модулем Юнга $E = 0,2 \pm 0,2$ МПа.

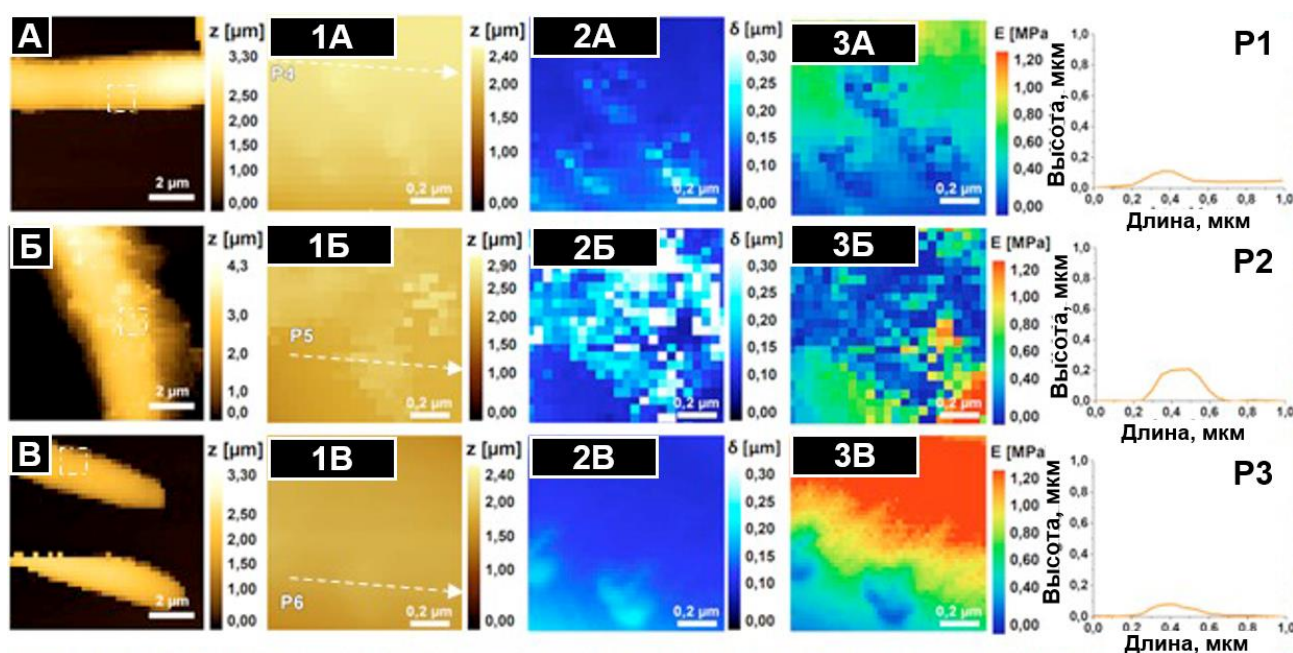


Рисунок 49 – АФМ-изображения; Топография (1), глубина деформации (2), карта модуля Юнга (3); (А) контрольные клетки *C. parapsilosis* ATCC 22019; (Б) обработанные итраконазолом; (В) обработанные микафунгином. Нормализованные профили высот P1- P3 (белая черта на топографии (1) выше).

Также было подтверждено образование выпуклых участков мембраны дрожжей под воздействием микафунгина; с высотой $h = 0,07 \pm 0,03$ мкм, величиной глубины деформации $\delta = 400 \pm 300$ нм и величиной модуля Юнга $E = 0,5 \pm 0,2$ МПа. Полученные данные по механическим свойствам структур, образующихся в результате воздействия противогрибковых препаратов, представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Модуль Юнга (кПа) поврежденных участков клетки *C. parapsilosis* ATCC 22019 под различными воздействиями препаратов (Itr – итраконазол; Vor – вориконазол; Mic – микафунгин).

Структура/ Препарат	Itr	Vor	Mic	17b	L-274	L-173
мембрана	–	–	8,2 ± 0,2	–	5,2 ± 0,4	3,1 ± 0,2
клеточная стенка	1,9 ± 0,1	2,3 ± 0,2	–	1,7 ± 0,1	–	1,5 ± 0,1

Полученная методом АСМ величина модуля Юнга сопоставима с величиной модуля Юнга дрожжевых клеток *Candida spp.* и имеют порядок в несколько сотен МПа [142]. Отличие на сотню МПа можно объяснить разницей в штаммах дрожжей, кроме того, клетки в сравниваемой работе находились в сухом состоянии. Значение модуля Юнга, полученное методом СИПМ для неповрежденной клеточной стенки, составляет порядка двух сотен кПа. Разница в три порядка относительно АСМ данных объясняется малой силой воздействия на образец, а следовательно, и глубиной деформации. При этом величина глубины деформации, полученная методом СИПМ, также отстает на три порядка относительно величины, полученной методом АСМ.

Метод СИПМ позволяет получать изображения высокого разрешения без грубого воздействия на образец, что было продемонстрировано малой величиной глубины деформации (не более 10 % от высоты объекта). Такой подход лучше применять для изучения хрупких структур, которые образуются при воздействии на клетки итраконазолом. В то же время метод АСМ больше подходит для изучения структур с высоким модулем Юнга, которые образуются при воздействии на клетки микафунгина.

СИПМ измерения механических характеристик для структур, образованных под воздействием разрабатываемых противогрибковых препаратов, были проведены точно над каждым участком и поделены по группам: (а) выпуклые участки мембраны; (б) поврежденная структура клеточной стенки. В таблице 8 приведен модуль Юнга для таких структур, образованных при концентрации препарата в 40 мкг/мл. Средние величины для каждого параметра приведены на основе 15 измерений для каждого случая повреждения. Так, наиболее эффективным препаратом *in vitro* из исследованных в данной работе является L-173, так как вызывает повреждения мембраны и клеточной стенки, а поврежденные участки наиболее мягкие среди прочих.

3.2.3. Влияние противомикробных препаратов на клетки млекопитающих

Представленная в данной работе методика для СИПМ может поспособствовать упрощению в разработке противомикробных препаратов, как прямого назначения (лечение инфекций), так и альтернативного применения (противоопухолевый эффект). В связи с чем, к изучению механических свойств наноразмерных структур дрожжей, изучено влияние противомикробного препарата флуконазола и препарата L-173 на клеточные линии рака предстательной железы человека PC3 и эмбриональной почки человека HEK 293; топографию (A1 – E1) и карты механических свойств (A2 – E2), представлены на рисунке 50.

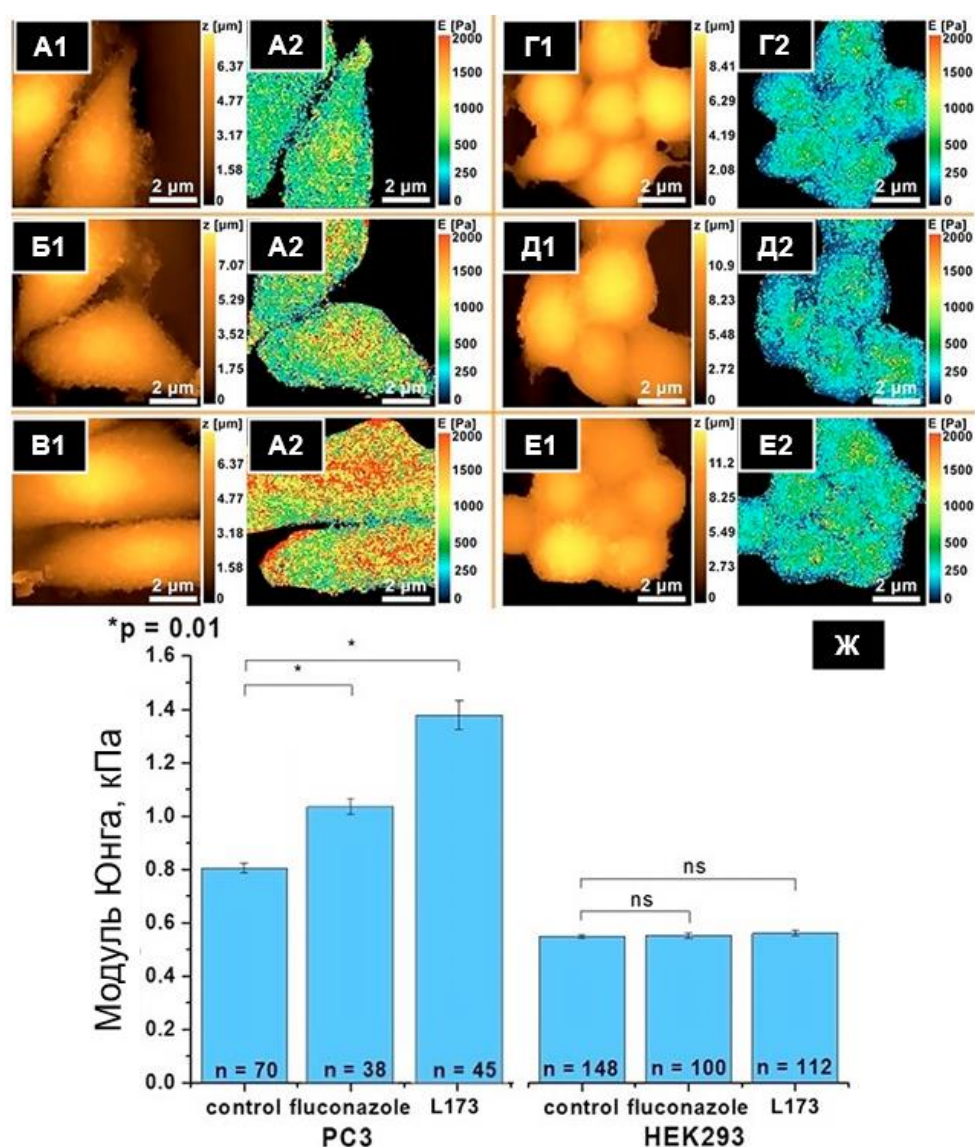


Рисунок 50 – Топография СИПМ (1) и карты модуля Юнга (2) контрольных клеток (А, Г); клетки, обработанные флуконазолом (Б, Д); клетки, обработанные препаратом L-173 (В, Е), где РС3 в (А – В) и НЕК 293 (Г – Д). Гистограмма жесткости клеток РС3 и НЕК 293 с добавлением противогрибковых средств, SE и (*) $p < 0,01$ (one-way ANOVA) (Ж).

По полученным данным установлено, что при воздействии флуконазола L-173 на раковые клетки РС3 увеличивается модуль Юнга и составляет $E = (0,80 \pm 0,01)$ кПа; $E = (1,02 \pm 0,02)$ кПа; $E = (1,37 \pm 0,05)$ кПа для контрольных клеток, клеток с добавлением флуконазола, клеток с добавлением препарата L-173, соответственно. В случае обработки противогрибковыми препаратами клетки НЕК 293 не обнаружено существенной разницы между величиной модуля Юнга контрольных клеток, клеток, обработанных флуконазолом, и клеток, обработанных препаратом L-173, $E = (0,77 \pm 0,01)$ кПа; $E = (0,78 \pm 0,01)$ кПа; $E = (0,79 \pm 0,01)$ кПа соответственно. На рис. 50 (Ж) показана гистограмма полученного модуля Юнга для клеток РС3 и НЕК 293.

Наблюдаемое уплотнение цитоскелета клеточной линии РС3 свидетельствует о цитостатическом действии препарата азольной группы флуконазола и вещества L-173 группы тиазолидиндиона. Это согласуется с наблюдавшимися ранее цитостатическими эффектами препаратов этих групп [152, 153]. Кроме того, отсутствие изменений механических свойств здоровой клеточной линии НЕК 293 при воздействии флуконазола и L-173 может свидетельствовать о низкой токсичности этих препаратов.

3.3. Изучение биологической активности противогрибковых препаратов

Дескрипторы противогрибковых препаратов рассчитывались в программе «MarvinSketch». Получены такие характеристики препаратов как: поляризуемость (свойство вещества приобретать электрический или магнитный дипольный момент во внешнем электромагнитном поле), липофильность, ионная липофильность $\log D$ и растворимость $\log S$. Полученные значения представлены в таблице 5. По данным СИПМ снимков клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019, обработанных исследуемыми веществами, была получена величина доли противогрибкового эффекта в процентном соотношении, представляющая собой отношение поверхности разрушенной структуры ко всей поверхности клетки. На основе построенного графика зависимости доли эффекта препарата к логарифму его концентрации в растворе, в котором инкубировались клетки, определен параметр полумаксимального эффекта ED_{50} (таблица 6). На рисунках 51 и 52 представлены кривые доза-эффект для препаратов, обладающих сильным и слабым эффектами, соответственно.

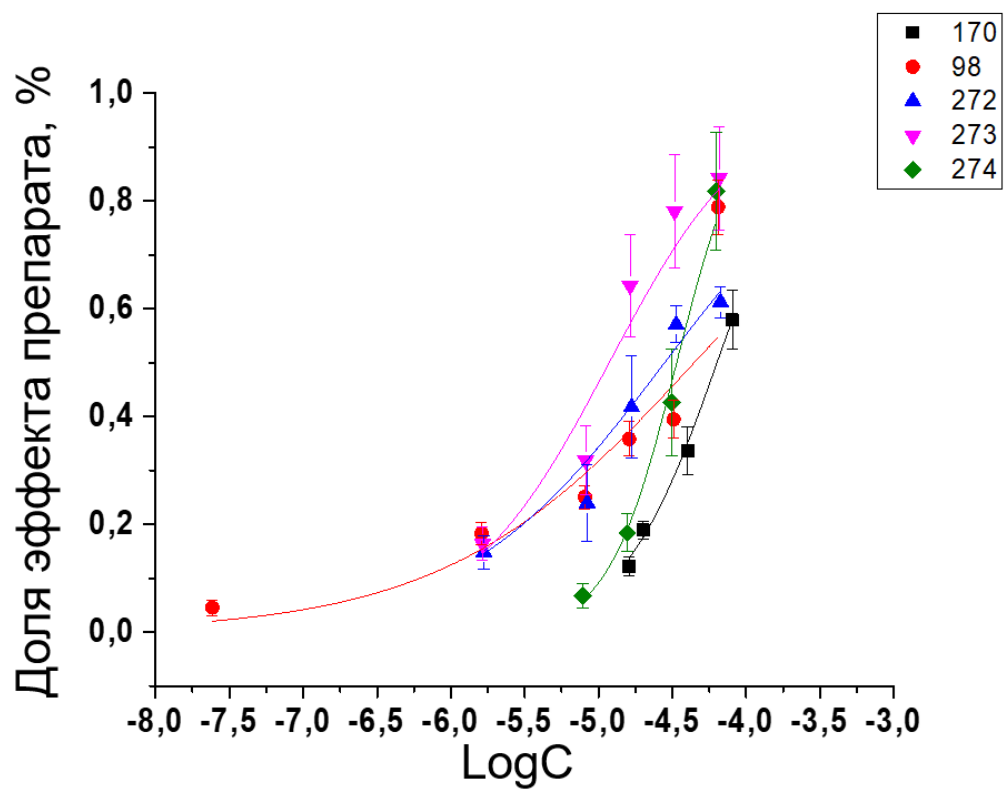


Рисунок 51 – Кривая доза-эффект для препаратов с сильным эффектом воздействия

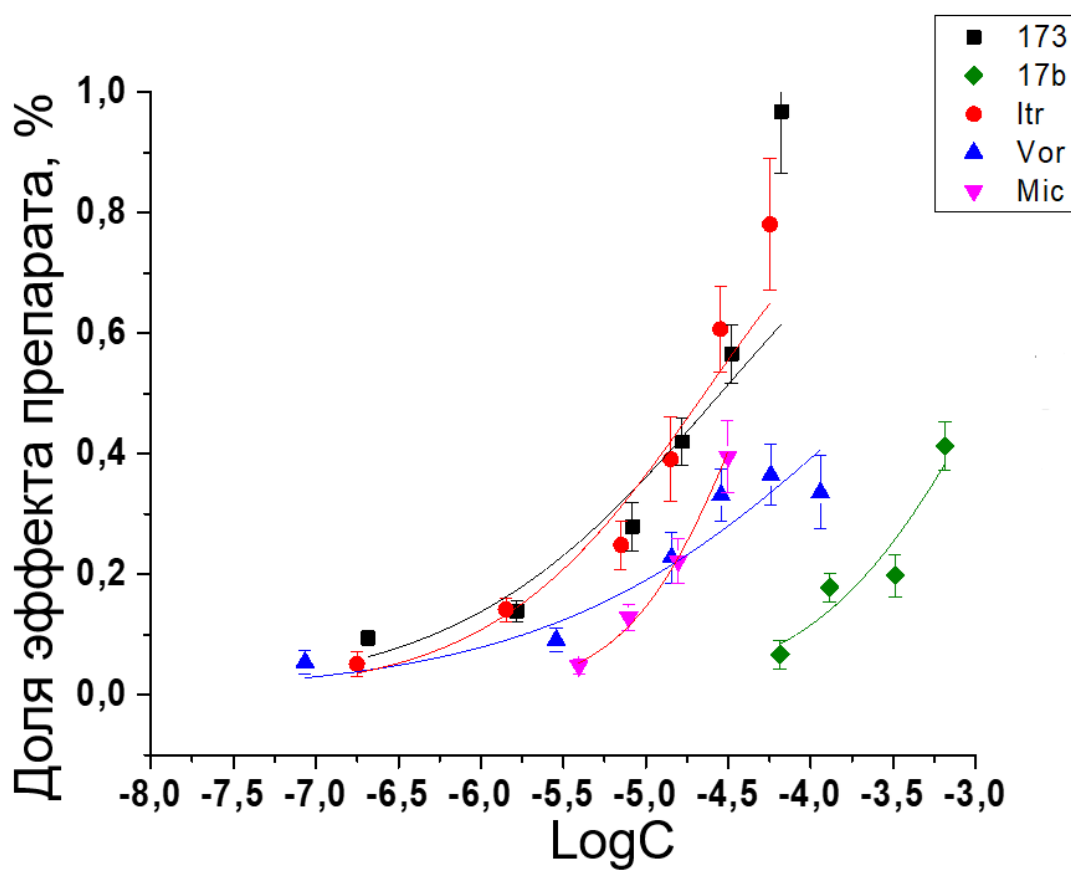


Рисунок 52 – Кривая доза-эффект для препаратов со слабым эффектом воздействия

Далее параметр ED₅₀ был использован для расчёта биологической активности log(1/C), данные приведены в таблице 7. Построенная зависимость биологической активности от липофильности препарата logP (рисунок 53) описывается параболой типа $\log(1/C) = a(\log P)^2 + b(\log P) + c$, с доверительным коэффициентом детерминации $R^2 = 0,89$ и коэффициентами функции $a = (-0,27)$; $b = 1,79$; $c = 1,64$. Полученные коэффициенты могут быть полезны в дальнейших исследованиях препаратов, к примеру, на другом виде дрожжей для оценки селективности лекарственных средств. Также обнаружено, что наибольшей активностью обладают препараты, находящиеся в интервале липофильности logP от двух до четырех, что также согласуется с данными о наилучших интервалах величины липофильности для разрабатываемых лекарственных препаратов. В дальнейшем для выявления наиболее активного препарата по воздействию на дрожжи *C. parapsilosis* ATCC 22019, рассчитанные дескрипторы и полученные параметры воздействия препаратов будут сравниваться по соответствию с этим интервалом биологической активности (от 4,3 до 5,0).

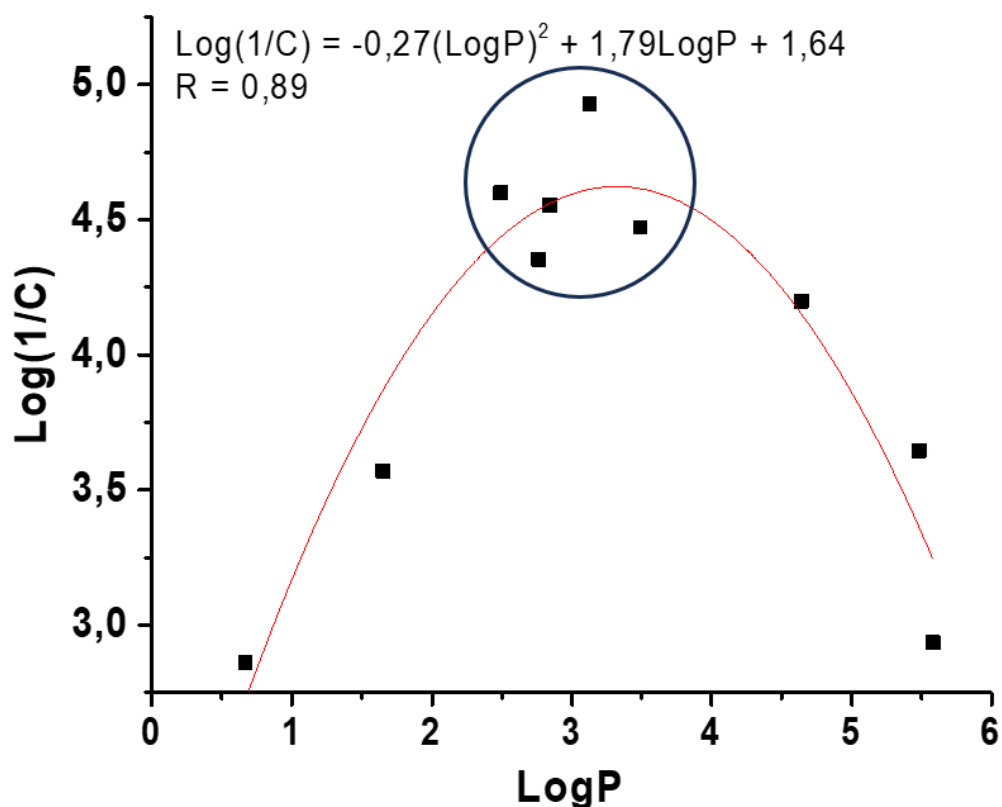


Рисунок 53 – Зависимость биологической активности от липофильности препарата

Также по полученным данным высот повреждённых участков были построены концентрационные зависимости (рисунки 54, 55). Графики аппроксимированы степенной функцией типа $y = a(x)^b$ для кривых. Для каждой функции доверительный коэффициент

детерминации R^2 и коэффициенты функции a ; b равны: L-170 – $R^2 = 0,997$, $a = 14$, $b = 0,86$; L-173 – $R^2 = 0,972$, $a = 88$, $b = 0,22$; L-98R – $R^2 = 0,987$, $a = 101$, $b = 0,3$; 17b – $R^2 = 0,964$, $a = 0,9$, $b = 0,92$; L-272 – $R^2 = 0,983$, $a = 91$, $b = 0,36$; L-273 – $R^2 = 0,982$, $a = 98$, $b = 0,5$; L-274 – $R^2 = 0,976$, $a = 45$, $b = 0,78$; итраконазол – $R^2 = 0,998$, $a = 22$, $b = 0,87$; вориконазол – $R^2 = 0,967$, $a = 126$, $b = 0,18$; микафунгин – $R^2 = 0,989$, $a = 31$, $b = 0,16$. Показатели степенной функции также представлены в таблице 6.

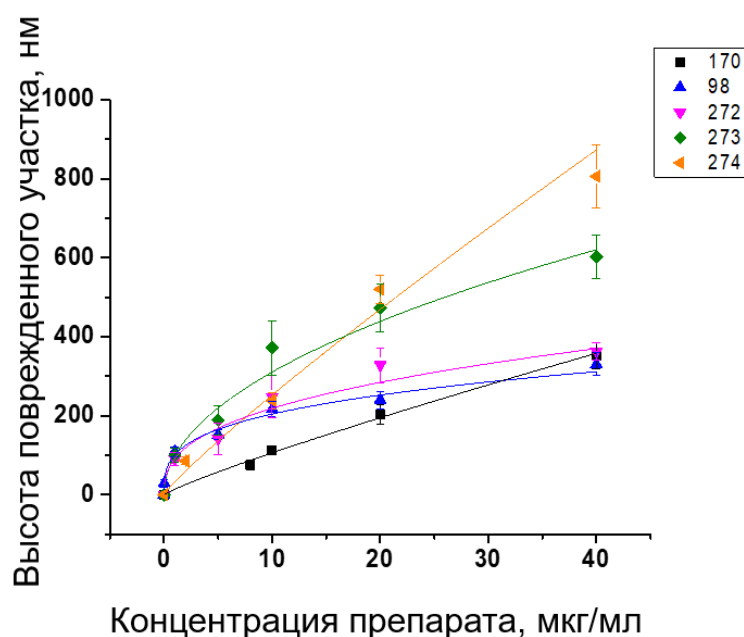


Рисунок 54 – Зависимость высоты поврежденных участков от концентрации высокоэффективных препаратов

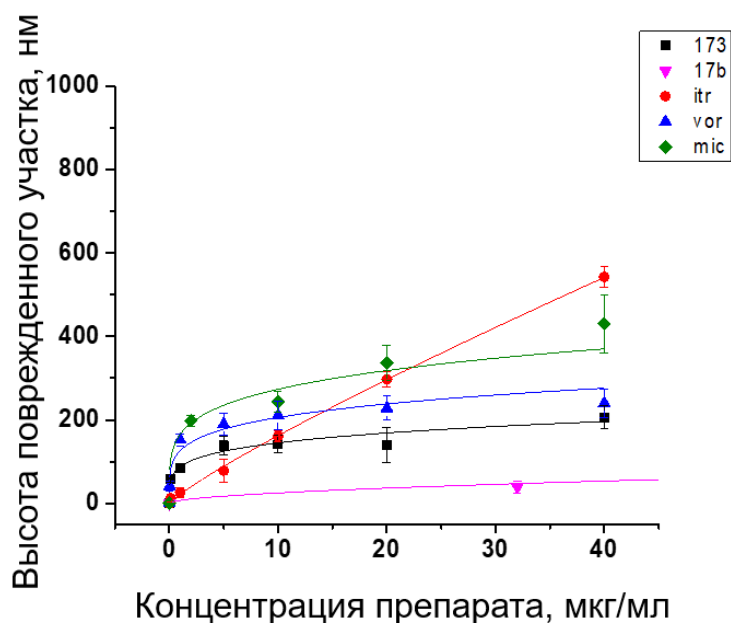


Рисунок 55 – Зависимость высоты поврежденных участков от концентрации низкоэффективных препаратов

По полученным данным показателям степенной функции построена их зависимость от липофильности препаратов (рисунок 56). Интервалам наиболее биологически эффективных препаратов соответствуют значения показателя степенной функции от 3,5 до 5,5. Стоит отметить, что наибольший показатель степени не обуславливает наибольшую биологическую активность препарата. Предположительно, если высота измененного рельефа клеточной стенки *Candida spp.* прямо пропорциональна корню квадратному или корню кубическому концентрации воздействующего на клетки противогрибкового вещества, то вещество обладает высокой биологической активностью.

Также были построены зависимости поляризуемости молекулы от липофильности $\log P$ и ионной липофильности $\log D$ препарата. На графике зависимости $\log P$ был выбран ранее найденный интервал значений, удовлетворяющий высокой биологической активности препарата, которой соответствует наибольшее изменение рельефа поверхности. Соответствующий интервал для поляризуемости молекулы составляет от 55 до 70 Å³ (10⁻³⁰ м).

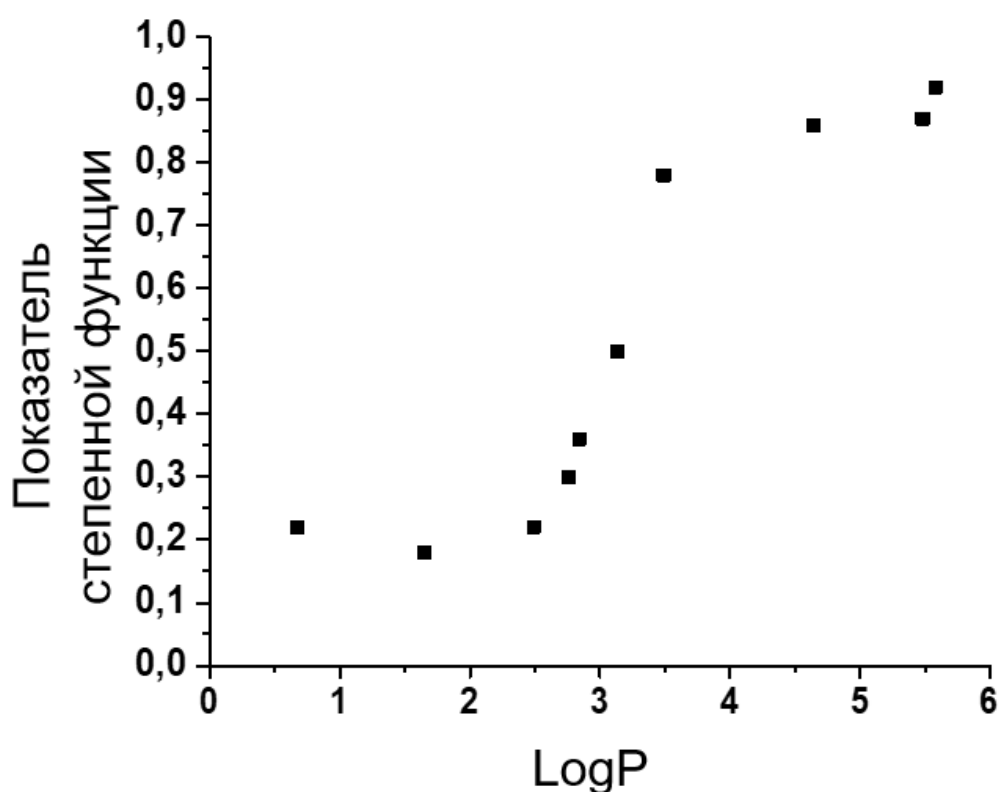


Рисунок 56 – Зависимость показателя степенной концентрационной функции от липофильности препарата

Оценка полученных дескрипторов биологической активности противогрибковых препаратов показывает, что у наиболее эффективных веществ физико-химические

параметры лежат в следующих интервалах: липофильность $\text{LogP} = (2,5 - 4,0)$; ионная липофильность $\text{LogD} = (1,5 - 3,5)$; растворимость $\text{LogS} = ((-6,0) - (-7,0))$; поляризуемость молекулы $\rho = (57 - 67) \text{ \AA}^3$. Наилучшими препаратами из исследуемых являются L-272 и L-273, в отношении не только максимального эффекта, который наблюдался у L-173 и L-274, но и биологической активности. Таким образом данная работа демонстрирует реализуемость подхода QSAR и математическое моделирование свойств лекарственных молекул в изучении фармакологического воздействия веществ методом ион-проводящей микроскопии.

Таблица 7 – Дескрипторы биологической активности противогрибковых препаратов

Препарат	ED ₅₀ , мкмоль/л	Log(1/ED ₅₀)	Поляризуемость $\text{\AA}^3 (10^{-30} \text{ м})$	LogP	LogD	LogS	Показатель степ. функции
17b	116,0	2,936	51,32	5,58	1,54	-3,84	0,92
Итраконазол	22,6	4,645	74,5	5,48	8,49	-4,9	0,87
L-170	63,4	4,198	50,81	4,64	3,62	-6,84	0,86
L-274	33,8	4,471	64,94	3,49	2,68	-6,97	0,78
L-273	11,8	4,928	61,75	3,13	2,3	-6,96	0,5
L-272	28,0	4,553	59,11	2,84	1,97	-6,6	0,36
L-98R	44,4	4,353	60,03	2,76	1,45	-5,08	0,3
L-173	25,1	4,599	57,74	2,49	1,63	-6,28	0,22
Вориконазол	270	3,569	30,54	1,65	1,31	-3,6	0,18
Микафунгин	43,6	4,363	128,66	0,67	0,31	-3,8	0,22

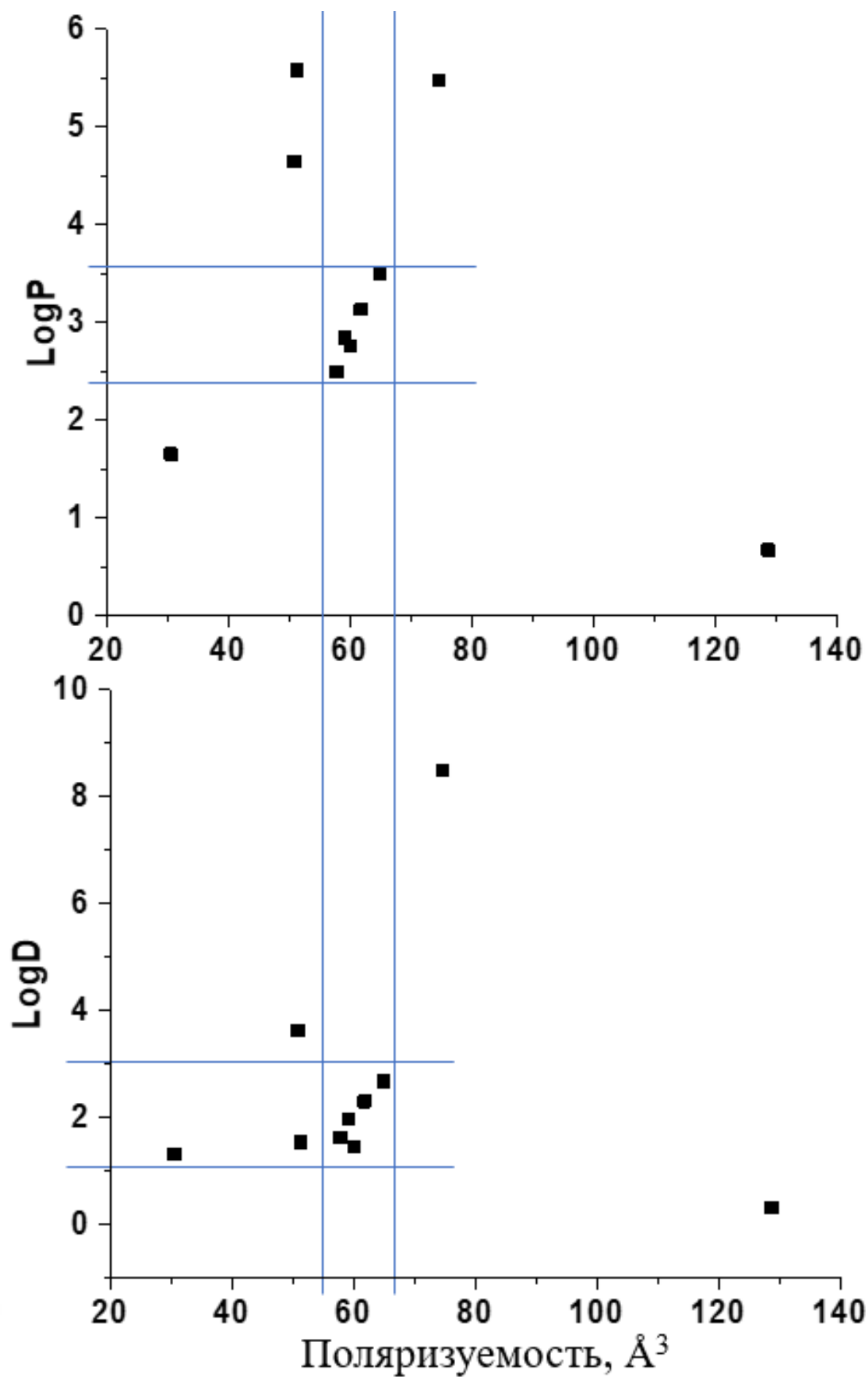


Рисунок 57 – Зависимости поляризуемость молекулы от липофильности logP и ионной липофильности logD препарата

3.4. Выводы по главе

Широкая область применения метода СИПМ позволяют решать задачи различного направления. В данной главе изучены поверхностные клеточные структуры микроорганизмов, воздействие на них противогрибковых препаратов и их биологическая активность. Основные полученные результаты:

1. Была разработана и апробирована на примере дрожжей рода *C. parapsilosis* ATCC 22019 методики получения топографии и механических свойств поверхностных структур дрожжей методом СИПМ. Подобран оптимальный набор параметров съемки, в том числе наиболее важные из них: первая рабочая точка при получении топографии должна составлять не более 0,3 %, радиус нанокapилляра для получения модуля Юнга клеточной стенки составляет 30 нм, параметры за счет которых удаётся отсканировать клетку без ее дрейфа Delay = 7000 мкс, Length = 5 мс.

2. Полученные изображения топографии поверхности позволили определить следующие свойства дрожжей:

(а) Клетки контрольной группы *C. parapsilosis* ATCC 22019 имеют продолговатую округлую форму (размер от 5 до 15 мкм), поверхность слегка шероховатая. Клетки контрольной группы *C. albicans* R8 имеют округлую форму (размер от 2 до 7 мкм). Клетки контрольной группы *C. krusei* 432М имеют округлую форму (размер от 1,5 до 7 мкм), их поверхность гладкая (рельеф мало развит), клетки образуют агломераты диаметром до 60 мкм.

(б) На поверхности клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019, обработанных вориконазолом, обнаружены выпуклые участки клеточной стенки. Эффект проявляется более выражено при повышении концентрации препарата. Заметно образование агломератов их рост с повышением концентрации (50 – 80 мкм при 10 мкг/мл; 70 – 120 мкм при 40 мкг/мл).

(в) На поверхности клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019, обработанных итраконазолом, также обнаружены выпуклые участки клеточной стенки. Противогрибковый эффект проявляется практически по всей поверхности дрожжей на высоких концентрациях препарата (40 мкг/мл) и незначительно снижается при уменьшении концентрации вплоть до 1 мкг/мл

(г) На поверхности клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019, обработанных микозидином обнаружены волокнистые структуры поврежденной клеточной стенки.

(д) Обработка *C. parapsilosis* ATCC 22019 микафунгином приводит к лизису клеточной стенки и осмотическому выпиранию клеточной мембраны.

(е) На поверхности клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019, обработанных веществом L-272, обнаружены выпуклые участки клеточной стенки. Противогрибковый эффект проявляется практически по всей поверхности дрожжей на высоких концентрациях вещества (40 мкг/мл) и незначительно снижается при уменьшении концентрации вплоть до 1 мкг/мл. Обнаружено образование небольших агломератов (3 – 7 клеток) при концентрациях вещества 1 и 5 мкг/мл

(ж) На поверхности клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019, обработанных веществом L-273, наблюдаются изменения структуры поверхности клеток при концентрациях от 1 до 40 мкг/мл, а при концентрациях 1 и 5 мкг/мл обнаружено разрастание капсулы на поверхности клеток.

(з) При воздействии на *C. parapsilosis* ATCC 22019 препаратом L-274, при низких концентрациях 1, 5 и 10 обнаружены выпуклые участки клеточной стенки до 1 мкм, и при высоких концентрациях 20 и 40 мкг/мл на поверхности клеток наблюдаются лизис клеточной стенки и трещины по поверхности. На поверхности клеток *C. krusei* 432M, обработанных L-274, обнаружены выпуклые участки клеточной стенки. Противогрибковый эффект проявляется практически по всей поверхности дрожжей при концентрациях от 5 до 40 мкг/мл. При концентрации вещества в 40 мкг/мл клеточная стенка подвергается лизису и становится шероховатой. При концентрации в 1 мкг/мл противогрибковый эффект не обнаружен.

(и) На поверхности клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019, обработанных веществом L-98R, при высоких концентрациях (от 10 до 40 мкг/мл) редко проявляются изменения структуры на поверхности дрожжей, и при снижении концентрации (1 и 5 мкг/мл) воздействие вещества не наблюдается. Образуются агломераты клеток не больше 25 мкм. На поверхности клеток *C. krusei* 432M, обработанных веществом L-98R, обнаружены выпуклые и рыхлые участки клеточной стенки (концентрации от 5 до 40 мкг/мл). Наилучший эффект наблюдается при концентрации вещества в 20 мкг/мл.

(к) На поверхности клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019, обработанных веществом бис триазол – «дифлуконазол» при концентрации 1 мкг/мл, в отличие от препарата Флуконазол обнаружены выпуклые участки клеточной стенки и крупные образования. При концентрации «дифлуконазола» в 5 мкг/мл, на поверхности клетки образуются трещины глубиной около 300 нм, что свидетельствует о лизисе клеточной стенки. При повышении концентрации вещества высота выпуклых участков увеличивается (10 мкг/мл), а глубина трещин уменьшается (20 мкг/мл) в среднем до 200 нм. При дальнейшем увеличении концентрации (40 мкг/мл) эффекты становятся менее выражены.

(л) При обработке клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019 и *C. albicans* ATCC 22019 препаратом 17b происходит ингибирование роста клеточной мембраны, приводящее к повреждению структуры клеточной стенки, что выражается образованием на поверхности клетки волокнистых структур.

(м) При суточной инкубации с L-173 в клетках *C. parapsilosis* ATCC 22019 препарат вызывает повреждение клеточной стенки при высоких и средних концентрациях. При низких концентрациях также наблюдается активность, но она слабо выражена. В целом L-173 оказывает стабильное и умеренное действие на клетки *C. parapsilosis* ATCC 22019. Иная картина наблюдается при воздействии на L-173 *C. albicans* 8R. В случае этого штамма при низких концентрациях препарата эффект не проявляется, однако, начиная с концентрации 10 мкг/мл, структуры клеточной стенки и полисахариды сильно разрушаются. Что касается штамма *C. Krusei* 432M, то при низкой концентрации препарата эффекта не наблюдается, но с увеличением дозы происходит постепенная деградация поверхностных структур, не только разрушение клеточной стенки, но и распад полисахаридов. Сравнительная оценка действия препарата L-173 на дрожжи показала, что наибольший противогрибковый эффект наблюдался в отношении вида *C. albicans* R8; более стабилен во всех рассматриваемых дозах, но менее активен в отношении видов *C. parapsilosis* ATCC 22019; и среднюю активность в средних и высоких дозах препарата в отношении вида *Candida krusei* 432M.

Таким образом были выявлены морфологические свойства поверхностных структур дрожжей *Candida spp.* и воздействия на них противогрибковых препаратов. Выявленные эффекты коммерческих препаратов соответствуют механизму их действия (ингибирование синтеза эргостеролов для азолов и синтеза 1,6- β -D-глюкансинтазы для эхинокандинов) на клетках дрожжей. Более того, обнаруженные эффекты препаратов группы гибридов подтверждают их предположительные механизмы блокировки синтеза структурообразующих компонентов дрожжевой оболочки.

2. Разработана и апробирована методика изучения механических свойств методом СИПМ. Получены величины индентации и модуля Юнга на здоровых клетках *C. parapsilosis* ATCC 22019 и клетках, обработанных противомикробными препаратами. Выявлен препарат, который наиболее эффективно разрушает структуры дрожжей. Также наблюдаемые эффекты подтверждены при помощи метода АСМ.

Установлено, что противогрибковые препараты флуконазол и L-173 оказывают выраженное цитостатическое действие на раковые клетки РС3. Так, модуль Юнга клеток, обработанных флуконазолом, увеличился примерно в полтора раза, а в клетках, обработанных L-173, жесткость увеличилась в два раза. Более того, препараты не

действуют на здоровые клетки НЕК 293, что может указывать на их низкую токсичность для клеток млекопитающих. Таким образом, модуль Юнга клеток НЕК 293, обработанных флуконазолом или L-173, статистически неотличим от модуля упругости контрольных клеток. Следует отметить, что новое перспективное соединение является наиболее безопасным, поскольку в меньшей степени влияет на здоровые клетки НЕК 293.

3. Проведен расчёт физико-химических свойств исследуемых препаратов и определение их биологической активности в отношении дрожжей *C. parapsilosis* ATCC 22019. Выявлено, что наибольшей биологической активностью обладают препараты L-272 и L-273. Дескрипторы противогрибковых препаратов должны быть в следующих интервалах: липофильность $\text{LogP} = (2,5 - 4,0)$; ионная липофильность $\text{LogD} = (1,5 - 3,5)$; растворимость $\text{LogS} = ((-6,0) - (-7,0))$; поляризуемость молекулы $\rho = (57 - 67) \text{ \AA}^3 (10^{-30} \text{ м})$.

Представленные данные демонстрируют расширенное применение методов сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) в областях биофизики, клеточной биологии и фармакологии. Продемонстрирован новый подход в изучении антимикробной и противораковой эффективности препаратов нового поколения. Инновационный метод СИПМ предоставляет информацию о топографии, механических и биофизических свойствах клеточной стенки дрожжей. В дальнейшем комплексный подход СИПМ может быть успешно применен при решении вопросов доклинических испытаний новых противогрибковых препаратов или фундаментального изучения поверхностных структур и их механических свойств дрожжей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1) При помощи разработанной математической модели, основанной на модели Герца и расклинивающем давлении между двойным электрическим слоем в методе СИПМ, рассчитана сила, прилагаемая нанокapилляром к капле декана. Так при использовании зондов с радиусами в 50 нм и 30 нм величина внутренней силы равна $(0,18 \pm 0,03)$ нН и $(0,34 \pm 0,02)$ нН, соответственно.

2) Разработанная методика сканирования методом СИПМ позволила получать изображения *Candida spp.* без применения фиксации клетки и токсичных реагентов в нативном для объекта условиях, что ранее не было осуществлено при помощи прочих методов микроскопии высокого разрешения. Полученная топография *Candida spp.* с пространственным разрешением до 30 нм позволяет изучать наноразмерные структуры на поверхности клеточной стенки. При непрерывном сканировании клетки дрожжей в течение двух часов не обнаружено механическое воздействие зонда на образец, что является важным фактором в исследовании мягких образцов с низким индексом адгезии к субстрату.

3) Выявлено, что препараты L-272, L-273, L-274, L-98R, 17b, L-170, L-173 одновременно приводят лизису клеточной стенки и разрушению капсулы. Тиазолидиндионы проявляют наибольшую фунгицидную активность если в арилиденовой части молекулы находится заместитель алкеновой группы, при этом с ростом числа атомов углерода у последней, повышается эффект воздействия.

4) Определен модуль Юнга измененной под воздействием противогрибковых препаратов поверхностной структуры клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019, в физиологическом растворе при малых деформациях клетки без разрушения капсулы, клеточной стенки. Так для участков, поврежденных вследствие разрушения мембраны клетки среднее значение модуля Юнга равно: препарат итраконазол $E = (1,9 \pm 0,1)$ кПа, препарат вориконазол $E = (2,3 \pm 0,2)$ кПа, препарат 17b $E = (1,7 \pm 0,1)$ кПа, препарат L-173 $E = (1,5 \pm 0,1)$ кПа. Для участков, поврежденных вследствие лизиса клеточной стенки среднее значение модуля Юнга равно: препарат микафунгин $E = (8,2 \pm 0,2)$ кПа, препарат L-274 $E = (5,2 \pm 0,4)$ кПа, препарат L-173 $E = (3,1 \pm 0,2)$ кПа.

5) Рассчитанные физико-химические свойства (дескрипторы) были сопоставлены с биологической активностью синтетических органических веществ, что позволило определить интервалы величин дескрипторов, при которых достигается оптимальная биодоступность тиазолидиндионов. Так в дальнейшем, при изыскании новых противогрибковых препаратов, следует отбирать вещества, у которых следующие

интервалы: липофильность $\text{LogP} = (2,5 - 4,0)$; ионная липофильность $\text{LogD} = (1,5 - 3,5)$; растворимость $\text{LogS} = ((-6,0) - (-7,0))$; поляризуемость молекулы $\rho = (57 - 67) \text{ \AA}^3$.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СЗМ – сканирующая зондовая микроскопия

АСМ – атомно-силовой микроскоп

СИПМ – сканирующий ион-проводящий микроскоп

ЭМ – электронная микроскопия

РЭМ – растровый электронный микроскоп

ПЭМ – просвечивающий электронный микроскоп

ЭСЭМ – экологический сканирующий электронный микроскоп

КМ – конфокальный микроскоп

КС – клеточная стенка

ЦМ – цитоплазматическая мембрана

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Seifert J. et al. Comparison of atomic force microscopy and scanning ion conductance microscopy for live cell imaging // *Langmuir*. – 2015. – Т. 31. – №. 24. – С. 6807-6813.
2. Takahashi Y. et al. High-speed SICM for the visualization of nanoscale dynamic structural changes in hippocampal neurons // *Analytical chemistry*. – 2019. – Т. 92. – №. 2. – С. 2159-2167.
3. Ali T. et al. Correlative SICM-FCM reveals changes in morphology and kinetics of endocytic pits induced by disease-associated mutations in dynamin // *The FASEB Journal*. – 2019. – Т. 33. – №. 7. – С. 8504.
4. Cremin K. et al. Scanning ion conductance microscopy reveals differences in the ionic environments of gram-positive and negative bacteria // *Analytical chemistry*. – 2020. – Т. 92. – №. 24. – С. 16024-16032.
5. Savin N. A. et al. Application of Nanotechnologies in Studying Yeast Structure in *Candida* // *Nanobiotechnology Reports*. – 2021. – Т. 16. – С. 450-472.
6. Levshin I. B. et al. Antifungal thiazolidines: Synthesis and biological evaluation of mycosidine congeners // *Pharmaceuticals*. – 2022. – Т. 15. – №. 5. – С. 563.
7. Rheinlaender J. et al. Comparison of scanning ion conductance microscopy with atomic force microscopy for cell imaging // *Langmuir*. – 2011. – Т. 27. – №. 2. – С. 697-704.
8. Ossola D. et al. Simultaneous scanning ion conductance microscopy and atomic force microscopy with microchanneled cantilevers // *Physical review letters*. – 2015. – Т. 115. – №. 23. – С. 238103.
9. Ghannoum M. A., Rice L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance // *Clinical microbiology reviews*. – 1999. – Т. 12. – №. 4. – С. 501-517.
10. Healey K. R., Perlin D. S. Fungal resistance to echinocandins and the MDR phenomenon in *Candida glabrata* // *Journal of fungi*. – 2018. – Т. 4. – №. 3. – С. 105.
11. Pristov K. E., Ghannoum M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2019. – Т. 25. – №. 7. – С. 792-798.
12. Cortegiani A. et al. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris* // *Journal of intensive care*. – 2018. – Т. 6. – С. 1-13.
13. Georgopapadakou N. H., Walsh T. J. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1996. – Т. 40. – №. 2. – С. 279-291.

14. Matsubara T. et al. Cerebroside of the dimorphic human pathogen, *Candida albicans* // Chemistry and physics of lipids. – 1987. – T. 43. – №. 1. – C. 1-12.
15. Hitchcock C. A. et al. Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 α -sterol demethylase purified from *Candida albicans* // Biochemical Journal. – 1990. – T. 266. – №. 2. – C. 475-480.
16. Geber A. et al. Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1995. – T. 39. – №. 12. – C. 2708-2717.
17. Sanati H. et al. A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1997. – T. 41. – №. 11. – C. 2492-2496.
18. Chen S. C. A., Slavin M. A., Sorrell T. C. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison // Drugs. – 2011. – T. 71. – C. 11-41.
19. Takahashi S. et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of trastuzumab deruxtecan with concomitant ritonavir or itraconazole in patients with HER2-expressing advanced solid tumors // Clinical Cancer Research. – 2021. – T. 27. – №. 21. – C. 5771-5780.
20. Lima T. S. et al. itraconazole reverts ABCB1-mediated docetaxel resistance in prostate cancer // Frontiers in pharmacology. – 2022. – T. 13. – C. 869461.
21. Rashid M., Shrivastava N., Husain A. Synthesis and SAR strategy of thiazolidinedione: A novel approach for cancer treatment // Journal of the Chilean Chemical Society. – 2020. – T. 65. – №. 2. – C. 4817-4832.
22. WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241> (accessed on 25 October 2022).
23. CP F. J. W., Boekhout T. The yeasts, a taxonomic study. – 1998.
24. Cosgrove D. J. Creeping walls, softening fruit, and penetrating pollen tubes: the growing roles of expansins // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1997. – T. 94. – №. 11. – C. 5504-5505.
25. Müller A. et al. The application of various protic acids in the extraction of (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* // Carbohydrate research. – 1997. – T. 299. – №. 3. – C. 203-208.
26. Stokke B. T. et al. Physicochemical properties of (1 $\rightarrow$ 6)-branched (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucans. 1. Physical dimensions estimated from hydrodynamic and electron microscopic data // Biopolymers: Original Research on Biomolecules. – 1993. – T. 33. – №. 4. – C. 561-573.

27. Kollár R. et al. Architecture of the yeast cell wall: The linkage between chitin and β (1 $\rightarrow$ 3)-glucan (*) // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – T. 270. – №. 3. – C. 1170-1178.
28. Blackwell J. The macromolecular organization of cellulose and chitin // *Cellulose and Other Natural Polymer Systems: Biogenesis, Structure, and Degradation*. – Boston, MA : Springer US, 1982. – C. 403-428.
29. Hartland R. P. et al. The linkage of (1–3)- β -glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast*. – 1994. – T. 10. – №. 12. – C. 1591-1599.
30. Orlean P. Biogenesis of yeast wall and surface components // *Cell cycle and cell biology*. – 1997.
31. Hagen, Ilja, et al. "Sed1p and Srl1p are required to compensate for cell wall instability in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in multiple GPI-anchored mannoproteins." *Molecular microbiology* 52.5 (2004): 1413-1425.
32. Borovikova D. et al. Anhydrobiosis in yeast: cell wall mannoproteins are important for yeast *Saccharomyces cerevisiae* resistance to dehydration // *Yeast*. – 2016. – T. 33. – №. 8. – C. 347-353.
33. Kaminskyj S. G. W., Dahms T. E. S. High spatial resolution surface imaging and analysis of fungal cells using SEM and AFM // *Micron*. – 2008. – T. 39. – №. 4. – C. 349-361.
34. Liu S., Wang Y. Application of AFM in microbiology: a review // *Scanning*. – 2010. – T. 32. – №. 2. – C. 61-73.
35. Dufrêne Y. F. et al. Five challenges to bringing single-molecule force spectroscopy into living cells // *Nature methods*. – 2011. – T. 8. – №. 2. – C. 123-127.
36. Neuman K. C., Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy // *Nature methods*. – 2008. – T. 5. – №. 6. – C. 491-505.
37. Formosa C. et al. Nanoscale effects of antibiotics on *P. aeruginosa* // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2012. – T. 8. – №. 1. – C. 12-16.
38. Formosa C. et al. Nanoscale analysis of the effects of antibiotics and CX1 on a *Pseudomonas aeruginosa* multidrug-resistant strain // *Scientific reports*. – 2012. – T. 2. – №. 1. – C. 575.
39. Tian J. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak // *International Journal of Food Microbiology*. – 2011. – T. 145. – №. 2-3. – C. 464-470.
40. Chandra J. et al. In vitro and in vivo activity of a novel catheter lock solution against bacterial and fungal biofilms // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2018. – T. 62. – №. 8. – C. 10.1128/aac.00722-18.

41. Sen B. H., Piskin B., Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM // *Dental Traumatology*. – 1995. – T. 11. – №. 1. – C. 6-9.
42. De Boer P., Hoogenboom J. P., Giepmans B. N. G. Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up! // *Nature methods*. – 2015. – T. 12. – №. 6. – C. 503-513.
43. Binnig G., Quate C. F., Gerber C. Atomic force microscope // *Physical review letters*. – 1986. – T. 56. – №. 9. – C. 930.
44. Meyer R. L. et al. Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions // *Ultramicroscopy*. – 2010. – T. 110. – №. 11. – C. 1349-1357.
45. Dufrêne Y. F. AFM for nanoscale microbe analysis // *Analyst*. – 2008. – T. 133. – №. 3. – C. 297-301.
46. Zhong Q. et al. *Surf. Sci. Lett.* – 1993.
47. Martin Y., Abraham D. W., Wickramasinghe H. K. High-resolution capacitance measurement and potentiometry by force microscopy // *Applied Physics Letters*. – 1988. – T. 52. – №. 13. – C. 1103-1105.
48. Janeczko M. et al. 1, 4-Naphthoquinone derivatives potently suppress *Candida albicans* growth, inhibit formation of hyphae and show no toxicity toward zebrafish embryos // *Journal of Medical Microbiology*. – 2018. – T. 67. – №. 4. – C. 598-609.
49. Kumagai Y. et al. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications // *Annual review of pharmacology and toxicology*. – 2012. – T. 52. – C. 221-247.
50. Ibis C. et al. Nucleophilic substitution reactions of 1, 4-naphthoquinone and biologic properties of novel S-, S, S-, N-, and N, S-substituted 1, 4-naphthoquinone derivatives // *Medicinal Chemistry Research*. – 2014. – T. 23. – C. 2140-2149.
51. Nittayananta W. et al. Effects of lawsone methyl ether mouthwash on oral *Candida* in HIV-infected subjects and subjects with denture stomatitis // *Journal of oral pathology & medicine*. – 2013. – T. 42. – №. 9. – C. 698-704.
52. Motalebnejad M. et al. The effect of topical application of pure honey on radiation-induced mucositis: a randomized clinical trial // *J contemp dent pract*. – 2008. – T. 9. – №. 3. – C. 40-47.
53. Al-Waili N. S. et al. Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control // *Journal of medicinal food*. – 2011. – T. 14. – №. 10. – C. 1079-1096.
54. Cooper R. A., Lindsay E., Molan P. C. Testing the susceptibility to manuka honey of streptococci isolated from wound swabs // *J Apiprod Apimed Sci*. – 2011. – T. 3. – C. 117-122.

55. Maddocks S. E. et al. Manuka honey inhibits the development of *Streptococcus pyogenes* biofilms and causes reduced expression of two fibronectin binding proteins // *Microbiology*. – 2012. – T. 158. – №. 3. – C. 781-790.
56. Alandejani T. et al. Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. – 2009. – T. 141. – №. 1. – C. 114-118.
57. Ansari M. J. et al. Effect of jujube honey on *Candida albicans* growth and biofilm formation // *Archives of medical research*. – 2013. – T. 44. – №. 5. – C. 352-360.
58. Lal P. et al. Exopolysaccharide analysis of biofilm-forming *Candida albicans* // *Journal of applied microbiology*. – 2010. – T. 109. – №. 1. – C. 128-136.
59. Helal G. A. et al. Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain // *Journal of Basic Microbiology*. – 2007. – T. 47. – №. 1. – C. 5-15.
60. Tyagi A. K., Malik A. In situ SEM, TEM and AFM studies of the antimicrobial activity of lemon grass oil in liquid and vapour phase against *Candida albicans* // *Micron*. – 2010. – T. 41. – №. 7. – C. 797-805.
61. Handorf O. et al. Antimicrobial effects of microwave-induced plasma torch (MiniMIP) treatment on *Candida albicans* biofilms // *Microbial biotechnology*. – 2019. – T. 12. – №. 5. – C. 1034-1048.
62. Martin-Yken H. et al. A conserved fungal hub protein involved in adhesion and drug resistance in the human pathogen *Candida albicans* // *The Cell Surface*. – 2018. – T. 4. – C. 10-19.
63. Aguayo S. et al. Early adhesion of *Candida albicans* onto dental acrylic surfaces // *Journal of Dental Research*. – 2017. – T. 96. – №. 8. – C. 917-923.
64. Uzunoglu E. et al. Biofilm-forming ability and adherence to poly-(methyl-methacrylate) acrylic resin materials of oral *Candida albicans* strains isolated from HIV positive subjects // *The journal of advanced prosthodontics*. – 2014. – T. 6. – №. 1. – C. 30-34.
65. Hwang G. et al. *Candida albicans* mannans mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development in vivo // *PLoS pathogens*. – 2017. – T. 13. – №. 6. – C. e1006407.
66. Alsteens D. et al. Force-induced formation and propagation of adhesion nanodomains in living fungal cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – T. 107. – №. 48. – C. 20744-20749.
67. Ebner A. et al. A new, simple method for linking of antibodies to atomic force microscopy tips // *Bioconjugate chemistry*. – 2007. – T. 18. – №. 4. – C. 1176-1184.

68. Madhavan C. et al. Nanoscale effects of caspofungin against two yeast species, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2013. – T. 57. – №. 8. – C. 3498-3506.
69. Quilès F. et al. AFM combined to ATR-FTIR reveals *Candida* cell wall changes under caspofungin treatment // *Nanoscale*. – 2017. – T. 9. – №. 36. – C. 13731-13738.
70. Smith A. S. et al. Force-induced growth of adhesion domains is controlled by receptor mobility // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – T. 105. – №. 19. – C. 6906-6911.
71. Bershadsky A., Kozlov M., Geiger B. Adhesion-mediated mechanosensitivity: a time to experiment, and a time to theorize // *Current opinion in cell biology*. – 2006. – T. 18. – №. 5. – C. 472-481.
72. Frank A. T. et al. Structure and function of glycosylated tandem repeats from *Candida albicans* Als adhesins // *Eukaryotic cell*. – 2010. – T. 9. – №. 3. – C. 405-414.
73. Kasas S., Ikai A. A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging // *Biophysical Journal*. – 1995. – T. 68. – №. 5. – C. 1678-1680.
74. Hasim S. et al. β -(1, 3)-glucan unmasking in some *Candida albicans* mutants correlates with increases in cell wall surface roughness and decreases in cell wall elasticity // *Infection and immunity*. – 2017. – T. 85. – №. 1. – C. 10.1128/iai. 00601-16.
75. Dague E. et al. An atomic force microscopy analysis of yeast mutants defective in cell wall architecture // *Yeast*. – 2010. – T. 27. – №. 8. – C. 673-684.
76. Perlin D. S. Echinocandin resistance in *Candida* // *Clinical Infectious Diseases*. – 2015. – T. 61. – №. suppl_6. – C. S612-S617.
77. Walker L. A. et al. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins // *PLoS pathogens*. – 2008. – T. 4. – №. 4. – C. e1000040.
78. Page A., Perry D., Unwin P. R. Multifunctional scanning ion conductance microscopy // *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. – 2017. – T. 473. – №. 2200. – C. 20160889.
79. Korcev Y.E., Bashford C.L., Milovanovic M., et al. // *Biophys. J.* – 1997.
80. Käppeli O., Müller M., Fiechter A. Chemical and structural alterations at the cell surface of *Candida tropicalis*, induced by hydrocarbon substrate // *Journal of bacteriology*. – 1978. – T. 133. – №. 2. – C. 952-958.
81. Walther P., Müller M., Schweingruber M. E. The ultrastructure of the cell surface and plasma membrane of exponential and stationary phase cells of *Schizosaccharomyces pombe*, grown in different media // *Archives of microbiology*. – 1984. – T. 137. – C. 128-134.

82. Käppeli O. et al. Structure of the cell surface of the yeast *Candida tropicalis* and its relation to hydrocarbon transport // *Archives of microbiology*. – 1984. – T. 138. – C. 279-282.
83. Müller M., Meister N., Moor H. Freezing in a propane jet and its application in freeze-fracturing // *Mikroskopie*. – 1980. – T. 36. – №. 5-6. – C. 129-140.
84. Käppeli O., Fiechter A. Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport // *Journal of Bacteriology*. – 1977. – T. 131. – №. 3. – C. 917-921.
85. Iimura Y., Hara S., Otsuka K. I. Fatty acids associated with the cell wall in film strains of *Saccharomyces* // *Agricultural and Biological Chemistry*. – 1981. – T. 45. – №. 5. – C. 1113-1119.
86. Desai J. V., Mitchell A. P., Andes D. R. Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4: a019729. – 2014
87. Deorukhkar S. C., Saini S. Research Article Medical Device-Associated *Candida* Infections in a Rural Tertiary Care Teaching Hospital of India // *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* – 2016.
88. Madhavan P. et al. Comparative study of the effects of fluconazole and voriconazole on *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida rugosa* biofilms // *Mycopathologia*. – 2018. – T. 183. – C. 499-511.
89. Walker L. A., Munro C. A. Caspofungin induced cell wall changes of *Candida* species influences macrophage interactions // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2020. – T. 10. – C. 164.
90. Kurtz M. B. et al. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1, 3)-beta-D-glucan synthase // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1994. – T. 38. – №. 7. – C. 1480-1489.
91. Cassone A., Mason R. E., Kerridge D. Lysis of growing yeast-form cells of *Candida albicans* by echinocandin: a cytological study // *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*. – 1981. – T. 19. – №. 2. – C. 97-110.
92. Yamaguchi H. et al. Effect of aculeacin A, a wall-active antibiotic, on synthesis of the yeast cell wall // *Microbiology and immunology*. – 1985. – T. 29. – №. 7. – C. 609-623.
93. Nishiyama Y., Uchida K., Yamaguchi H. Morphological changes of *Candida albicans* induced by micafungin (FK463), a water-soluble echinocandin-like lipopeptide // *Microscopy*. – 2002. – T. 51. – №. 4. – C. 247-255.
94. Jan A. et al. In vitro photodynamic inactivation effects of hypocrellin B on azole-sensitive and resistant *Candida albicans* // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. – 2019. – T. 27. – C. 419-427.

95. Böhnke M., Masters B. R. Long-term contact lens wear induces a corneal degeneration with microdot deposits in the corneal stroma // *Ophthalmology*. – 1997. – T. 104. – №. 11. – C. 1887-1896.
96. Masters B.R. // *CIS Selected Papers: Coherence-Domain Methods in Biomedical Optics*. 1996.
97. Webb R. H., Hughes G. W., Pomerantzeff O. Flying spot TV ophthalmoscope // *Applied optics*. – 1980. – T. 19. – №. 17. – C. 2991-2997.
98. Sudbery P., Gow N., Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans* // *Trends in microbiology*. – 2004. – T. 12. – №. 7. – C. 317-324.
99. Beaussart A. et al. Single-molecule imaging and functional analysis of Als adhesins and mannans during *Candida albicans* morphogenesis // *ACS nano*. – 2012. – T. 6. – №. 12. – C. 10950-10964.
100. Hazen B. W., Hazen K. C. Modification and application of a simple, surface hydrophobicity detection method to immune cells // *Journal of immunological methods*. – 1988. – T. 107. – №. 2. – C. 157-163.
101. Lyden A. et al. Characterization of carboxylate nanoparticle adhesion with the fungal pathogen *Candida albicans* // *Nanoscale*. – 2017. – T. 9. – №. 41. – C. 15911-15922.
102. Zhao X. et al. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p // *Microbiology*. – 2004. – T. 150. – №. 7. – C. 2415-2428.
103. Klein M. I. et al. An analytical tool-box for comprehensive biochemical, structural and transcriptome evaluation of oral biofilms mediated by mutans streptococci // *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. – 2011. – №. 47. – C. e2512.
104. Sanitá P. V. et al. Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against *Candida dubliniensis* biofilms // *Lasers in Medical Science*. – 2018. – T. 33. – C. 709-717.
105. Ribeiro A. P. D. et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts // *Lasers in medical science*. – 2013. – T. 28. – C. 391-398.
106. Quishida C. C. C. et al. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and LED light // *Lasers in medical science*. – 2016. – T. 31. – C. 997-1009.
107. Vicinanza M. et al. PI (5) P regulates autophagosome biogenesis // *Molecular cell*. – 2015. – T. 57. – №. 2. – C. 219-234.
108. Chi K. R. HIT OR MISS? // *Nature*. – 2009. – T. 461. – №. 7265. – C. 712.
109. Hell S. W. Far-field optical nanoscopy // *science*. – 2007. – T. 316. – №. 5828. – C. 1153-1158.

110. Melling M. et al. 3-D morphological characterization of the liver parenchyma by atomic force microscopy and by scanning electron microscopy // *Microscopy research and technique*. – 2004. – T. 64. – №. 1. – C. 1-9.
110. Bergmans L. et al. Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM // *International endodontic journal*. – 2005. – T. 38. – №. 11. – C. 775-788.
111. McKeown T. A., Moss S. T., Jones E. B. G. Ultrastructure of ascospores of *Tunicatispora australiensis* // *Mycological research*. – 1996. – T. 100. – №. 10. – C. 1247-1255.
112. Protasoni M. et al. The extracellular matrix of the cuticle of *Gordius panigettensis* (Gordioiidae, Nematomorpha): observations by TEM, SEM and AFM // *Tissue and Cell*. – 2003. – T. 35. – №. 4. – C. 306-311.
113. Cheville N. F., Stasko J. Techniques in electron microscopy of animal tissue // *Veterinary pathology*. – 2014. – T. 51. – №. 1. – C. 28-41.
114. Hickey P. C. et al. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy // *Methods in microbiology*. – 2004. – T. 34. – C. 63-87.
115. Chopinet L. et al. Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI™ mode // *Micron*. – 2013. – T. 48. – C. 26-33.
116. Collins S. P. et al. Advantages of environmental scanning electron microscopy in studies of microorganisms // *Microscopy Research and Technique*. – 1993. – T. 25. – №. 5-6. – C. 398-405.
117. Sánchez C., Moore D., Diaz-Godinez G. Microscopic observations of the early development of *Pleurotus pulmonarius* fruit bodies // *Mycologia*. – 2006. – T. 98. – №. 5. – C. 682-689.
118. Takeyasu K. (ed.). *Atomic force microscopy in nanobiology*. – CRC Press, 2014.
119. Tanaami T. et al. High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks // *Applied optics*. – 2002. – T. 41. – №. 22. – C. 4704-4708.
120. De P. et al. Prediction reliability of QSAR models: an overview of various validation tools // *Archives of Toxicology*. – 2022. – T. 96. – №. 5. – C. 1279-1295.
121. Nič M. et al. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2.1. 0* // IUPAC: Research Triangle Park, NC, ed. – 2009.
122. Liu X., Testa B., Fahr A. Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation // *Pharmaceutical research*. – 2011. – T. 28. – C. 962-977.
123. Lipinski C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings // *Advanced drug delivery reviews*. – 1997. – T. 23. – №. 1-3. – C. 3-25.

124. Jeppsson R. Parabolic relationship between lipophilicity and biological activity of aliphatic hydrocarbons, ethers and ketones after intravenous injections of emulsion formulations into mice // *Acta Pharmacologica et Toxicologica*. – 1975. – Т. 37. – №. 1. – С. 56-64.
125. Di L., Kerns E. H. Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization. – Academic press, 2015.
126. Amidon G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability // *Pharmaceutical research*. – 1995. – Т. 12. – С. 413-420.
127. Мельникова Н.Б., Малыгина Д.С. Современные подходы к синтезу новых лекарственных веществ. Учебное пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2022. – 131 с.
128. Csizmadia P. MarvinSketch and MarvinView: molecule applets for the World Wide Web. – 1999.
129. Revathi G., Girija K. In Silico Design and Solvent Free Synthesis of Some Novel Dihydropyrimidinethione Derivatives and Study of its Antimicrobial Activity // *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. – 2022. – Т. 16. – №. 3s. – С. 111-130.
130. Trilaksana H. et al. ADMET, Pharmacokinetic and Docking properties of the fungal drug 2-(2, 4-difluorophenyl)-1, 3-bis (1, 2, 4-triazol-1-yl) propan-2-ol by using Quantum computational methods // *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics (IJBB)*. – 2022. – Т. 60. – №. 1. – С. 58-64.
131. Jäger M. C. et al. Virtual screening and biological evaluation to identify pharmaceuticals potentially causing hypertension and hypokalemia by inhibiting steroid 11 β -hydroxylase // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2023. – Т. 475. – С. 116638.
132. Gubbins P. O. The systemically acting azoles // *Fungal Infections in the Immunocompromised Patient*. – 2005. – С. 479-506.
133. Montes B. et al. Morphological changes of *Candida albicans* induced by saperconazole: Saperconazol-induzierte morphologische Veränderungen an *Candida albicans* // *Mycoses*. – 1991. – Т. 34. – №. 7-8. – С. 287-292.
134. Tøndervik A. et al. Alginate oligosaccharides inhibit fungal cell growth and potentiate the activity of antifungals against *Candida* and *Aspergillus* spp // *PLoS One*. – 2014. – Т. 9. – №. 11. – С. e112518.
135. Pacholak A., Burlaga N., Kaczorek E. Evaluating the effect of azole antifungal agents on the stress response and nanomechanical surface properties of *Ochrobactrum anthropi* Aspcl2. 2 // *Molecules*. – 2020. – Т. 25. – №. 15. – С. 3348.

136. Whaley S. G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – T. 7. – C. 2173.
137. Stevens D. A. et al. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for β -1, 6-glucan synthesis inhibition by caspofungin // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2006. – T. 50. – №. 9. – C. 3160-3161.
138. Deresinski S. C., Stevens D. A. Caspofungin // *Clinical Infectious Diseases*. – 2003. – C. 1445-1457.
139. Denning D. W. Echinocandins: a new class of antifungal // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2002. – T. 49. – №. 6. – C. 889-891.
140. Marcos-Zambrano L. J. et al. The novel oral glucan synthase inhibitor SCY-078 shows in vitro activity against sessile and planktonic *Candida* spp // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2017. – T. 72. – №. 7. – C. 1969-1976.
141. Guirao-Abad J. P. et al. ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans* // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2017. – T. 307. – №. 4-5. – C. 241-248.
142. Formosa C. et al. Nanoscale effects of caspofungin against two yeast species, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2013. – T. 57. – №. 8. – C. 3498-3506.
143. PA W. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard // CLSI document M27-A2. – 2002.
144. Ptaszyńska N. et al. Peptide conjugates of lactoferricin analogues and antimicrobials—Design, chemical synthesis, and evaluation of antimicrobial activity and mammalian cytotoxicity // *Peptides*. – 2019. – T. 117. – C. 170079.
145. Kolmogorov V. S. et al. Mapping mechanical properties of living cells at nanoscale using intrinsic nanopipette-sample force interactions // *Nanoscale*. – 2021. – T. 13. – №. 13. – C. 6558-6568.
146. Novak P. et al. Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy // *Nature methods*. – 2009. – T. 6. – №. 4. – C. 279-281.
147. Clarke R. W. et al. Low stress ion conductance microscopy of sub-cellular stiffness // *Soft Matter*. – 2016. – T. 12. – №. 38. – C. 7953-7958.
148. Rheinlaender J., Schäffer T. E. Mapping the mechanical stiffness of live cells with the scanning ion conductance microscope // *Soft Matter*. – 2013. – T. 9. – №. 12. – C. 3230-3236.
149. Hertz H. Über die Berührung fester elastischer Körper // *J reine und angewandte Mathematik*. – 1881. – T. 92. – C. 156.

150. Efremov Y. M. et al. Viscoelastic mapping of cells based on fast force volume and PeakForce Tapping // *Soft Matter*. – 2019. – T. 15. – №. 27. – C. 5455-5463.
151. Ghannoum M. A. et al. Differential in vitro activity of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* isolates recovered from a burn unit // *Clinical microbiology and infection*. – 2009. – T. 15. – №. 3. – C. 274-279.
152. Tsubamoto H. et al. Repurposing itraconazole as an anticancer agent // *Oncology letter*. – 2017. – T. 14. – №. 2. – C. 1240-1246.
153. Abdelhameid M. K. et al. Design, synthesis, and cytotoxic screening of novel azole derivatives on hepatocellular carcinoma (HepG2 Cells) // *Bioorganic chemistry*. – 2020. – T. 101. – C. 103995.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает слова благодарности в адрес председателя диссертационного совета Дмитрия Владимировича Штанского за возможность представить к защите данную работу и консультации по ее содержательной сути. А также членов экспертного совета за уделенной работе внимание и высококвалифицированные отзывы, которые выявили недоработки и позволили исправить недостатки работы. Отдельные благодарности ученому секретарю диссертационного совета Марине Евгеньевне Самошиной за предоставление консультаций по вопросам подачи работы.

Автор выражает благодарность своему научному руководителю к.ф.-м.н Петру Владимировичу Горелкину за руководство и помощь в работе над диссертацией. За моральную поддержку, обширную помощь и дружескую атмосферу автор благодарит сотрудников лаборатории НИЛ «Биофизики» под предводительством заведующего к.ф.-м.н. Александра Сергеевича Ерофеева.

Автор от всего сердца благодарит к.ф.-м.н., заведующего Александра Григорьевича Савченко и весь профессорско-педагогический состав кафедры физического материаловедения НИТУ МИСИС за неоценимую помощь, бесценные советы и колоссальную поддержку на протяжении всего времени обучения и подготовки диссертации.

Автор признателен профессору, д.фарм.н. Игорю Борисовичу Левшину и к.б.н. Наталье Эдуардовне Грамматиковой за консультации в областях фармакологии и микологии. Также выражает глубокую признательность официальным рецензентам Алексею Андреевичу Никитину Роману Александровичу Акасову за объективные отзывы по диссертации.

Особые слова благодарности за моральную поддержку автор выражает своим друзьям родным и близким.

Приложение А

(обязательное)

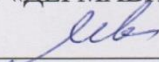
ООО "ДЕРМАВИТАЛ ГРУПП"

ИНН 7736501129/ КПП 773601001

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ООО «ДЕРМАВИТАЛ ГРУПП»

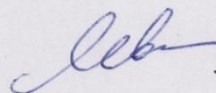
 И.Б. Левшин
«05» 03 2024 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящий акт составлен о том, что методика «Измерение топографии и механических свойств поверхностной структуры дрожжей, подверженных действию инновационных препаратов, обладающих противогрибковой активностью, методом сканирующей ион-проводящей микроскопии» разработанная Савиным Н.А. внедрена и используется в научно-исследовательской деятельности ООО «ДЕРМАВИТАЛ ГРУПП». Использование методики позволяет получать данные топографии, механических свойств клеточной стенки дрожжей под воздействием как известных, так и новых противогрибковых химических молекул, что расширяет возможности их оценки и способствует поиску новых высокоактивных соединений. Результаты работы, выполненной Н.А.Савиным вошли в отчет РНФ 22-23-00160 «Трансформация серосодержащих гетероциклов на примере производных тиазолидин-4-она, изучение строения, физико-химических свойств и биологической активности».

Генеральный директор
Проф.



 Левшин И.Б.

Приложение Б

(обязательное)

ООО "ДЕРМАВИТАЛ ГРУПП"

ИНН 7736501129/ КПП 773601001

АКТ

О применении результатов диссертационной работы Н.А. Савина
«Исследование физических процессов, протекающих на поверхности клеток
дрожжей, при взаимодействии с синтетическими органическими веществами,
обладающими противогрибковой активностью»

Результаты диссертационной работы Н.А. Савина были использованы компанией ООО «Дермавитал Групп» при реализации проектов, направленных на поиск новых противогрибковых препаратов широкого спектра действия. Наиболее значимыми из представленных в работе выводов являются следующие:

– фиксация необратимых изменений клеточной стенки грибов под действием отечественного топического антимикотика «Микозидин» и его аналогов

– наличие у нового гибридного соединения L 173, разрабатываемого в качестве потенциального системного препарата широкого спектра действия, наряду с высокой противогрибковой активностью, цитостатического эффекта относительно опухолевых клеточных линий

– установленные в ходе исследований с помощью ион-проводящего микроскопа закономерности влияния заместителей в арилиденовой части гибридной молекулы тиазолидин-2,4-диона и триазола на фунгицидную активность и степень их безопасности.

Отмечена целесообразность участия тех или иных синтезированных соединений в дальнейшем доклиническом исследовании. Кроме того, будет учитываться рекомендация о интервалах физико-химических параметров природных или химических соединений при достижении оптимальной биодоступности лекарственных средств.

Генеральный директор ООО «ДЕРМАВИТАЛ ГРУПП»

Проф.



Левшин И.Б.

Приложение В

(обязательное)

Разработка методики сканирования дрожжей методом СИПМ

Ранее применяемые параметры сканирования методом СИПМ были разработаны для работы с биологическими объектами типа клеток млекопитающих. Так как данные клетки не обладают относительно жесткой клеточной стенкой, а их адгезия к субстрату выше, чем у микроорганизмов, применение имеющихся параметров не позволило визуализировать клетки дрожжей. Главным образом потому, что зонд при приближении к поверхности отталкивал плохо закрепленные на субстрате дрожжи.

Для решения данной проблемы было проведено изменение ключевых параметров сканирования, и наиболее важным стал параметр рабочей точки, указывающий на момент остановки приближения зонда к поверхности при достижении величины падения ионного тока, протекающего через цепь, значение которого составляло 0,5 % в исходной методике.

Определение оптимальной величины рабочей точки проводились на образце *Saccharomyces cerevisiae* W303. Чем ниже величина рабочей точки, тем дальше от образца будет останавливаться зонд. Следовательно, снижается вероятность отталкивания стенкой капилляра объекта исследования. Снижение величины проводилось по одной десятой процента от изначальной величины рабочей точки. На рисунке Б.1 представлены изображения *Saccharomycetes*, полученные при различных значениях рабочей точки.

Установлено, что дрейф клеток, при уменьшении процента величины рабочей точки, пропадает при значении в 0,3 %, а при дальнейшем снижении величины снижения ионного тока на изображении появляются излишние шумы. Поэтому оптимальным значением рабочей точки является 0,3 %.

Так как шероховатость поверхности поверхности дрожжей имеют наноразмерную величину, для его визуализации требуется уменьшить поле сканирования до нескольких микрон. При этом стоит учитывать, что разрешающая способность зависит от радиуса зонда. Программа управления установки СИПМ позволяет варьировать величину пространственного разрешения. Так на поле сканирования в $(1,5 \times 1,5)$ мкм доступно минимальное разрешение в 31 нм, однако при выборе данного разрешения с использованием зонда радиусом в 50 нм на изображении будут проявляться артефакты в виде квадратных перепадов по высоте. Это представлено на рисунке 5, при этом следующее доступное значение разрешающей способности соответствует 63 нм, и при

использовании данного разрешения артефакты на изображении не появляются. Таким образом пространственное разрешение в программе не должно быть меньше радиуса зонда.

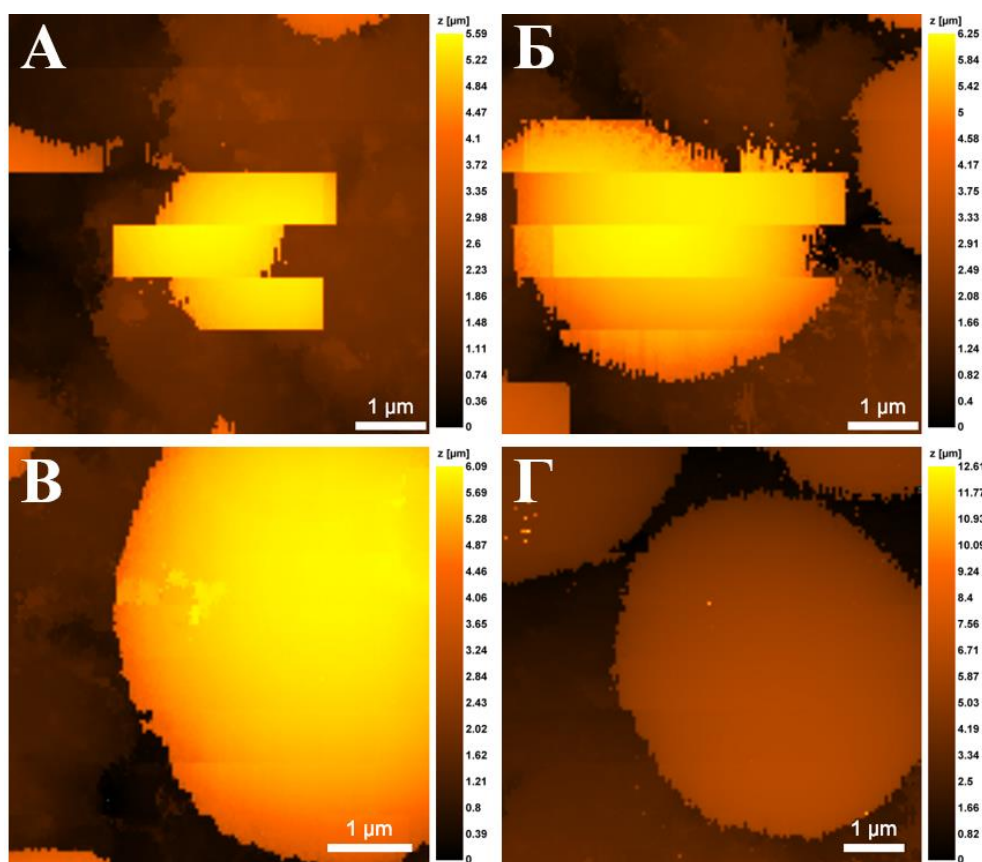


Рисунок Б.1 – СИПМ топография клеток *S. cerevisiae* W303 при величине рабочей точки в (А) 0,5 %; (Б) 0,4 %; (В) 0,3 %; (Г) 0,2 %

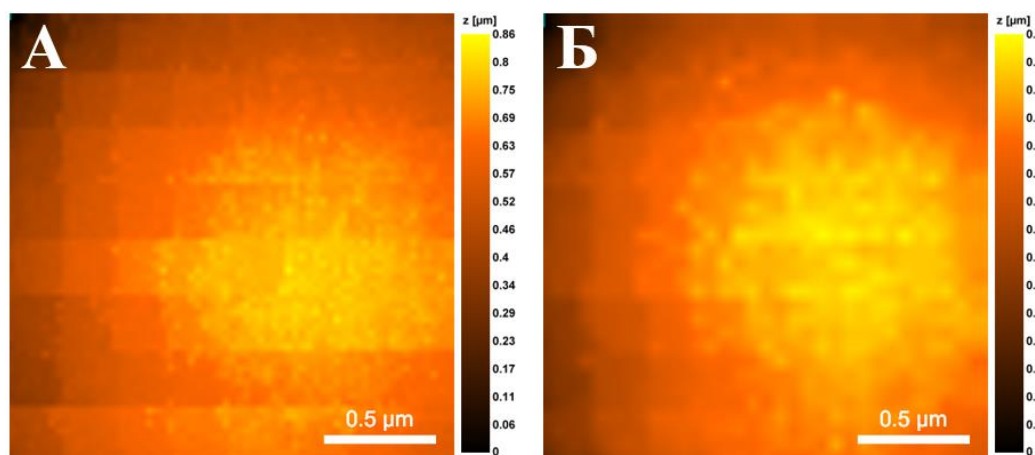


Рисунок В.2 – СИПМ топография клеток *S. cerevisiae* W303 при пространственном разрешении в (А) 31 нм; (Б) 63 нм

Клетки *C. parapsilosis* ATCC 22019 обладают меньшей силой адгезии к субстрату нежели клетки *S. cerevisiae* W303, а следовательно *C. parapsilosis* ATCC 22019 проще физически сместить зондом. Изменения величины падения ионного тока для получения изображения без смещения клетки уже недостаточно. Другой величиной, влияющей на отталкивание зондом образца, является скорость подвода зонда к поверхности. Изначальное значение данной величины в классическом протоколе равно 100 нм/мс. При снижении данной величины у системы увеличивается время для адекватного и своевременного отклика на достижение рабочей точки. Следовательно, чем ниже скорость подвода, тем точнее определяется положение зонда и меньше вероятность его соприкосновения с образцом. Так уменьшая скорость подвода к поверхности, было определено оптимальное значение данной величины, (рисунок В.3), которое соответствует 50 нм/мс при котором отсутствует дрейф клеток. При дальнейшем снижении скорости отличительных изменений не обнаружено, однако повышается время съемки.

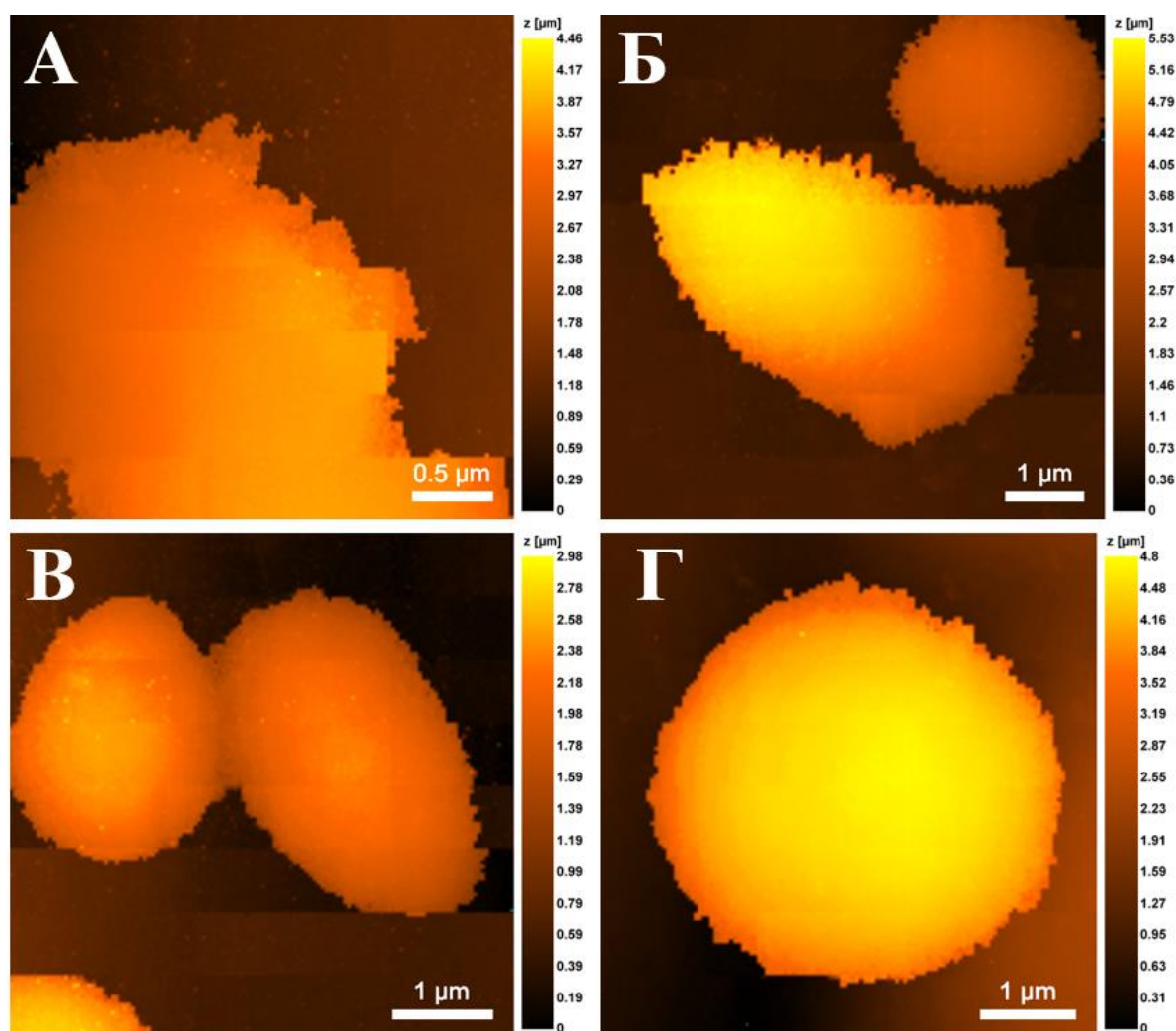


Рисунок В.3 – СИПМ топография клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019 при величине скорости подвода зонда равной (А) 100 нм/мс; (Б) 75 нм/мс; (В) 50 нм/мс; (Г) 40 нм/мс

Тем не менее на изображениях дрожжей все еще присутствуют участки, где клетка смещалась, данная картина более наглядна на снимках агломератов клеток. Следующим параметром, который может быть причиной этому, является длительность задержки зонда у поверхности перед дальнейшим отводом. Изначальная задержка составляет 7 мкс. При подводе зонда к поверхности его наконечник начинает колебаться. Предположительно, при увеличении параметра задержки увеличивается время, за которое погаснет колебание наконечника зонда, что сократит вероятность отталкивания зондом образца, вызванную данными колебаниями. На рисунке В.4 представлены изображения агломерата дрожжей *C. parapsilosis* ATCC 22019 при различных величинах задержки, также указано время получения данного изображения. Так при последовательном повышении времени задержки на 2 мкс, начиная с 7 мкс, количество артефактов на изображении уменьшается. После увеличения задержки до 13 мкс количество обнаруживаемых артефактов снижается до трех раз. При дальнейшем увеличении задержки количество артефактов не меняется, однако время, затраченное на получения изображения, увеличивается практически вдвое и достигает от 20 до 40 минут, в зависимости от выбранного разрешения. Чем дольше время проведения одного изображения, тем выше вероятность дрейфа клеток и смещения ее позиции во время сканирования, поэтому оптимальной величиной задержки принимается 13 мкс, как величина, при которой изображения получаются быстро и с малым количеством артефактов изображения.

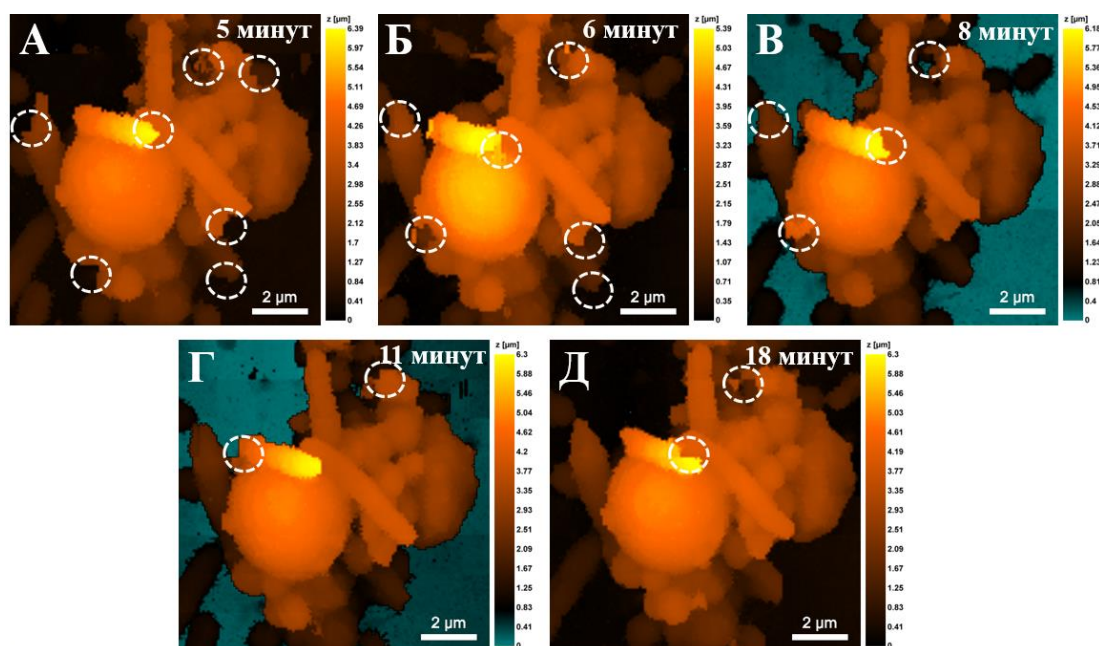


Рисунок В.4 – СИПМ топография клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019 при величине задержки равной (А) 7 мкс; (Б) 9 мкс; (В) 11 мкс; (Г) 13 мкс; (Д) 14 мкс. Пунктиром выделены артефакты изображения

Кроме дрейфа клеток имеется еще один вид артефакта, проявляющийся как несовпадение растров по высоте. Причиной этому служит неверно заданная величина предварительного сканирования по углам изображения. Чем больше данная величина, тем выше погрешность определения высоты относительно нуля по оси z . Данный параметр подбирается индивидуально под каждый образец, и для клеток млекопитающих в среднем составляет 5 мкм. Однако для поверхностей с низким перепадом высот такое значение неоптимально, так как подъем зонда на 5 мкм не требуется, а понижение этой величины уменьшит ошибку позиционирования. Как видно из рисунка В.5, снижение данной величины до 2 мкм позволяет избежать появления полос на изображении. Но при дальнейшем ее снижении возможен дрейф клетки из-за того, что зонд не может подняться с субстрата до поверхности клетки, не оттолкнув ее. Для получения изображения поверхности клеток без несовпадения растров по высоте и отсутствия смещения зондом клетки оптимальная величина предварительного сканирования поверхности клетки должна составлять 2 мкм.

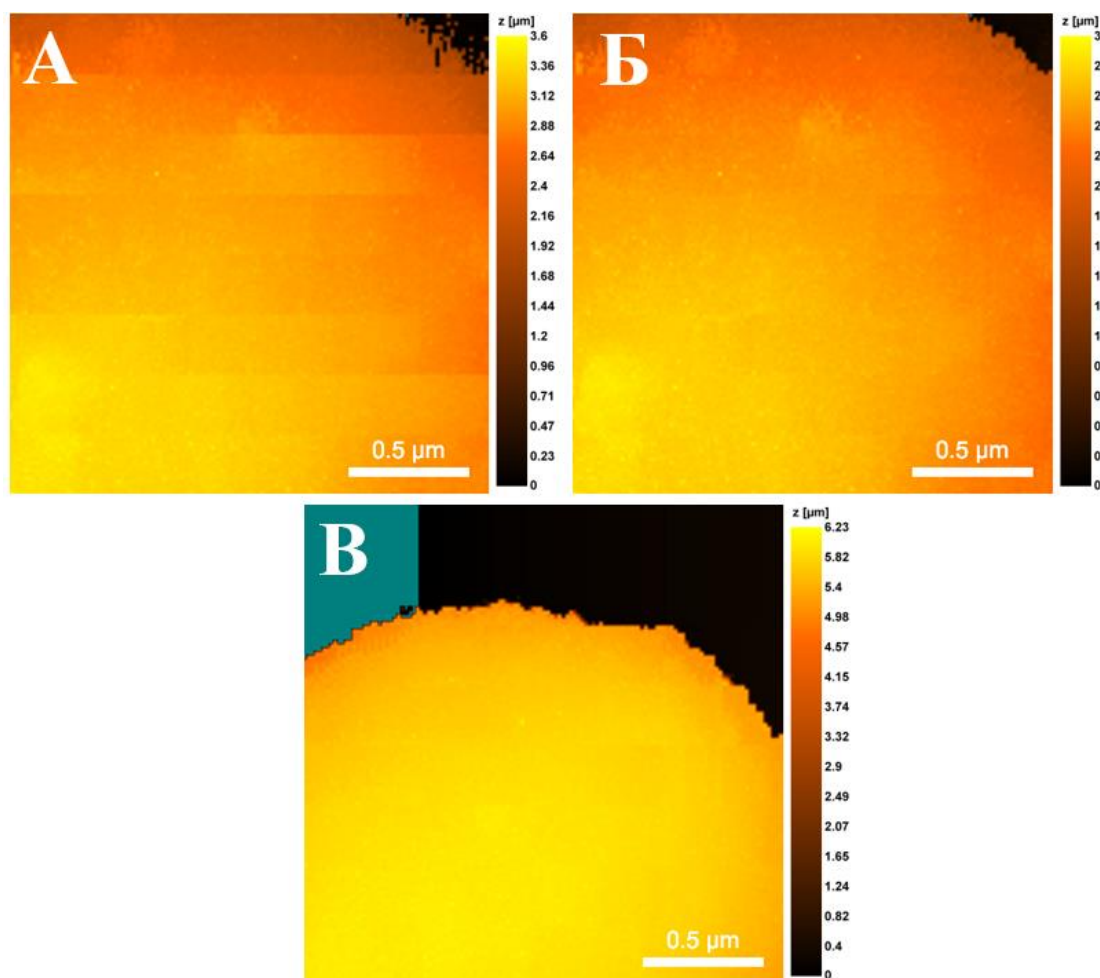


Рисунок В.5 – СИПМ топография поверхности клетки *C. parapsilosis* ATCC 22019 при величине высоты предварительного сканирования (А) 5 мкм; (Б) 2 мкм; (В) 1,5 мкм

Тем не менее, в случае получения изображения агломерата клеток малая высота предварительного сканирования приводит к смещению клеток по поверхности. Так на рисунке В.6 (А) представлено изображение с величиной предварительного сканирования в 2 мкм. С повышением данной величины до 3 мкм зонд перестает смещать клетки, и на изображении отсутствуют полосы (рисунок В.6 (Б)). При дальнейшем увеличении высоты предварительного сканирования обнаруживаются артефакты несоответствия высот ровной поверхности. Кроме того, чем больше высота предварительного сканирования, тем дольше время получения одного изображения. Для получения изображения агломерата клеток без несоответствия растров по высоте и расталкивания клеток зондом величина предварительного сканирования должна составлять 3 мкм.

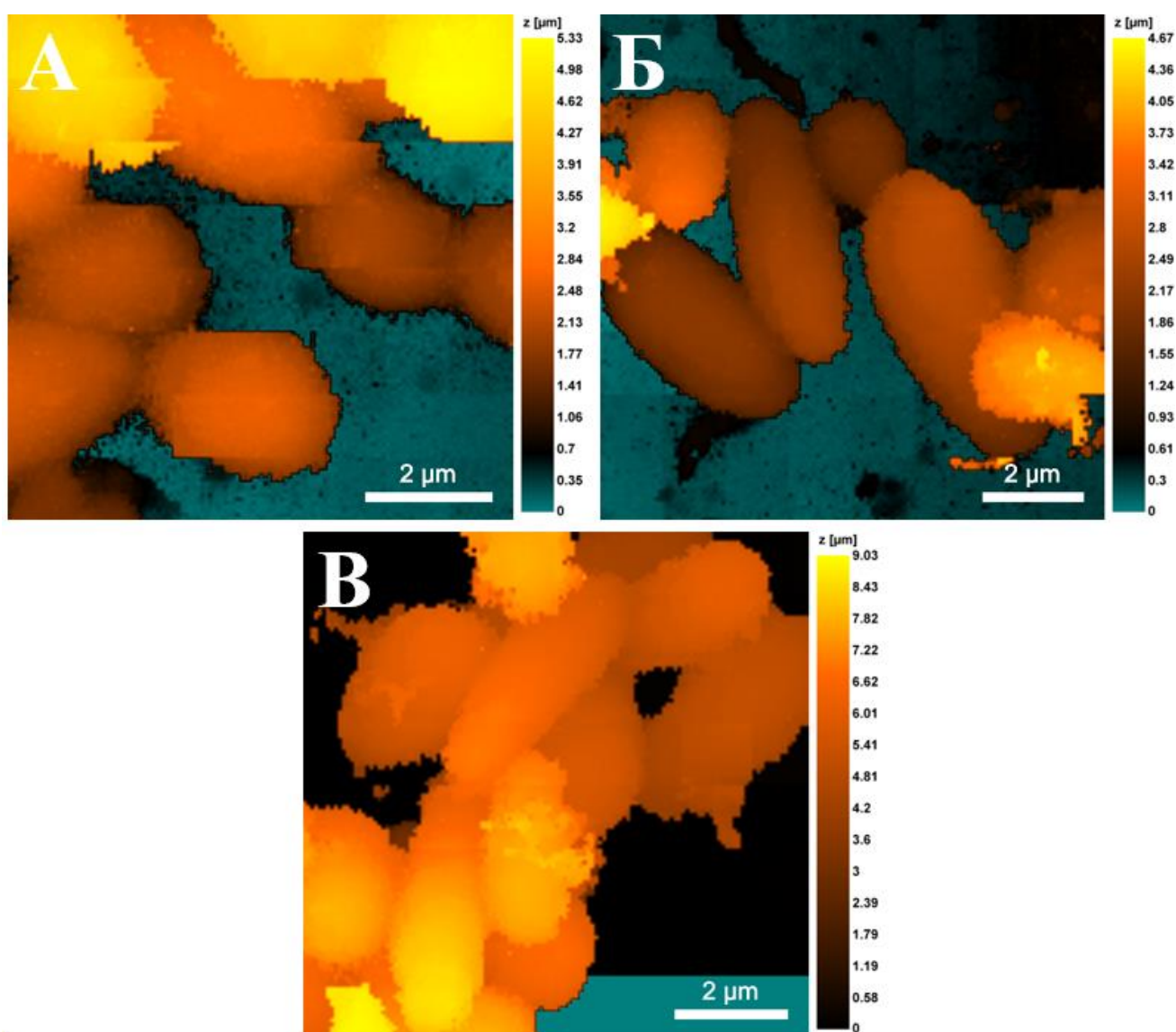


Рисунок В.6 – СИПМ топография поверхности клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019 при величине высоты предварительного сканирования (А) 2 мкм; (Б) 3 мкм; (В) 4 мкм

Картирование механических свойств клеток методом СИПМ проводится при помощи подачи давления через капилляр. У такого подхода низкое пространственное разрешение, в связи с использованием микроразмерных капилляров, а также данный метод не подходит для работы с хрупкими образцами, изучаемых в данной работе. В связи с этим, была разработана математическая модель для оценки механических свойств клеток на основе модели Герца и положении о расклинивающем давлении (теория ДЛФО (Дерягина-Ландау-Вервея-Овербека)) между наконечником зонда и образцом.

Известно, что стеклянный наконечник зонда отталкивает слой солевой раствор/декан по мере приближения к поверхности, то же справедливо и для клеток, и это взаимодействие не зависит от напряжения, а обусловлено внутренними коллоидными силами. В данной силе компонент электростатического отталкивания двойных слоев отсутствует, пока зазор не сократиться до длины Дебая составляющей 0,78 нм (при концентрации соли равной 150мМ). Согласно теории ДЛФО для слоев декан/солевой раствор/стекло должно происходить монотонное притяжение зонда к поверхности. Так как стеклянный зонд через солевой раствор отталкивает декан, предположения на основе теории ДЛФО должны быть пересмотрены.

Из-за резких изменений диэлектрической проницаемости в промежуточных слоях меняется знак и величина постоянной Гамакера. Слои на расстоянии сопоставимом с длиной Дебая вносят вклад в электростатические силы. У декана диэлектрическая проницаемость меньше, чем у солевого раствора, которая в свою очередь, меньше диэлектрической проницаемости двойного слоя рядом со стеклом. В связи с чем полагается, что константы Гамакера декан/солевой раствор/наконечник капилляра отталкивающие.

На поверхности мембраны или клеточной стенки присутствуют группы как с положительным, так и с отрицательным зарядом, поэтому, как и для декана, полагается притяжение клеток к стеклу, из-за более высокой диэлектрической проницаемости первого. Но в случае близкого сближения границ, диэлектрическая проницаемость стекла будет выше, чем у клетки, что приведет к отталкиванию, как у в случае с деканом.

Графическое представление сил между нанокapилляром и поверхностью представлено на рис. 3 (Б). Когда нанокapилляр начинает деформировать поверхность, уменьшение ионного тока происходит медленнее, чем в случае недеформированной поверхности. Расчёт внутренней силы исходит из предположения о балансе сил:

$$\vec{F} = 2\vec{F}_\sigma, \quad (\text{Б.1})$$

где F_σ – сила поверхностного натяжения декан-солевой прослойки.

Предполагается, что деформированная область имеет форму сферы с контактным радиусом a , и согласно модели Герца, этот параметр выражается по формуле:

$$a = \sqrt{R * d} \quad (\text{Б.2})$$

Сила поверхностного натяжения рассчитывается по формуле Лапласа:

$$F_\sigma = 2\pi a \sigma, \quad (\text{Б.3})$$

где, R – внутренний радиус нанокapилляра, a – расстояние между точкой максимальной глубины индентации (d) и точкой нулевой индентации поверхности, σ – параметр поверхностного натяжения.

Из комбинации уравнений (1), (2), (3) рассчитывается внутренняя сила по уравнению:

$$F = 4\pi\sigma\sqrt{R * d}. \quad (\text{Б.4})$$

Типичные значения приложенного напряжения были рассчитаны путем деления площади поверхности контакта нанокapилляра с деформированной поверхностью, радиус контактирующей поверхности определялся как радиус наконечника R .

Применив данный подход на капле декана, были получены значения величин прилагаемой зондом силы к объекту исследования. Так при использовании зондов с радиусами в 50 нм и 30 нм величина внутренней силы равна $(0,18 \pm 0,03)$ нН и $(0,34 \pm 0,02)$ нН, соответственно.

Величина падения ионного тока не должна превышать 0,3 %. Однако при получении карт глубины деформации необходимо продавливать клетку, что осуществимо только при величине рабочей точки равной 2 % и более. В связи с чем замер механических характеристик клетки возможно только на небольшом размере области сканирования по центру клетки. Так зонд не отталкивает клетку своей боковой стороной при замере точки вблизи границ клетки. Такой подход позволил избежать дрейфа клетки. Так как клеточная стенка жестче мембраны клеток млекопитающих, давления (18 кПа), оказываемого

обычно применяемыми капиллярами с радиусом в 50 нм, было недостаточно для деформации поверхности дрожжей, и большая часть поверхности не была исследована (рисунок В.7 (А)).

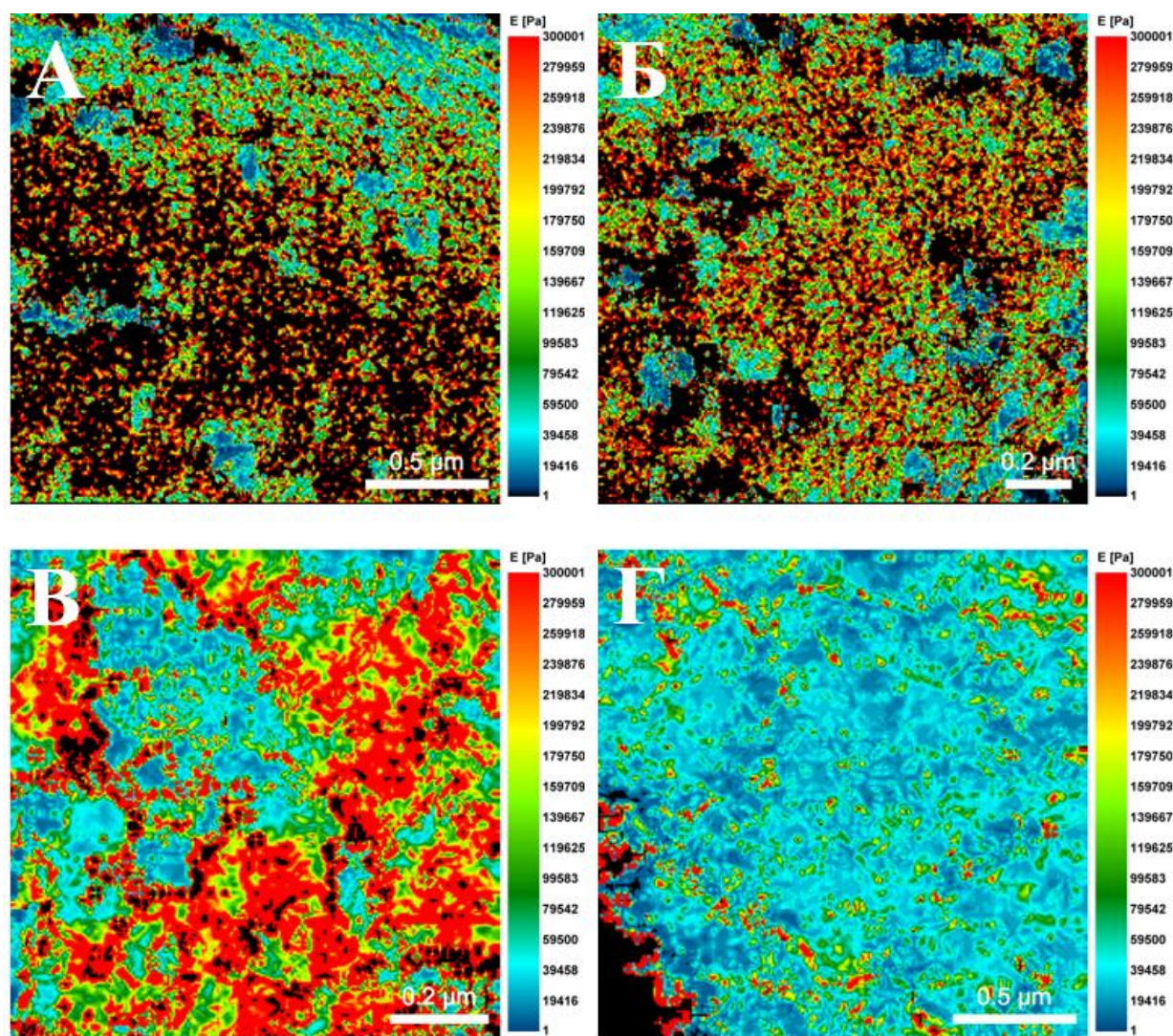


Рисунок В.7 – СИПМ карты модуля Юнга поверхности *C. parapsilosis* ATCC 22019 при использовании зондов радиуса (А) 50 нм; (Б) 40 нм; (В) 30 нм; (Г) 20 нм

При уменьшении радиуса зонда до 40 нм (оказываемое зондом давление равно 44 кПа) количество деформированных зон на изображении увеличивается (рисунок В.7 (Б)), , тем не менее этого давления все еще недостаточно для повсеместной деформации. При использовании зонда с радиусом в 30 нм (оказываемое зондом давление равно 145 кПа) деформируется практически вся поверхность клеточной стенки (рисунок В.7 (В)), при этом отличны участки без повреждения (красные области) и участки с повреждением (синие области). При использовании более мелких зондов (20 нм в радиусе) оказываемое давление чрезмерно (760 кПа) и на карте распределения модуля Юнга уже не отличимы

поврежденные и целостные участки (вся область окрашена синим). Кроме того, чем меньше радиус нанокапилляра, тем выше вероятность его загрязнения крупными фракциями из раствора. Для деформации относительно мягких участков клеточной стенки и получения карт распределения модуля Юнга следует использовать зонды радиусом в 30 нм.

Суммируя все вышеизложенное, оптимальные значения параметров сканирования дрожжей следующие: при получении топографии рабочая точка равна 0,3 %, разрешение малого поля ($1,5 \times 1,5$ мкм) равное 63 нм при радиусе зонда равному 50 нм, скорость подвода зонда равна 50 нм/мс, величина задержки зонда у поверхности равна 13 мкс, высота предварительного сканирования для участка при поверхности клетки равна 2 мкм, для участка, охватывающего агломерат клеток 3 мкм, радиус зонда при получении механических свойств клеточной стенки равен 30 нм.

Приложение Г
(обязательное)

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования "Национальный исследовательский технологический
университет "МИСИС"

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по науке и инновациям

НИТУ МИСИС

М.Р. Филонов



«5» марта 2024 г.

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ ТОПОГРАФИИ И МЕХАНИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТНОЙ СТРУКТУРЫ ДРОЖЖЕЙ,
ПОДВЕРЖЕННЫХ ДЕЙСТВИЮ ИННОВАЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ,
ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТЬЮ, МЕТОДОМ
СКАНИРУЮЩЕЙ ИОН-ПРОВОДЯЩЕЙ МИКРОСКОПИИ

Разработал

Савин Н.А.

Заведующий лабораторией биофизики, к.ф.-м.н.

Ерофеев А.С.

Москва, 2024

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наиболее интересными структурами, используемыми для скрининга лекарств, являются цитоплазматическая мембрана и клеточная стенка дрожжей, в том числе рода *Candida*. Известно, что эти структуры являются наиболее частой мишенью антимикробных агентов.

Метод сканирующей ион-проводящей микроскопии на данный момент применялся только в изучении клеток млекопитающих, а применяемая в нем методика сканирования не позволяет изучать клетки, которым присуща клеточная стенка. Поэтому разработка нового метода изучения структуры патогенных клеток в физиологических условиях так актуальна.

Данная методика предназначена для исследования физико-химических свойств клеточной стенки микроорганизмов дрожжей и применима в области биофизики. Отличительной особенностью данной методики является возможность одновременного изучения топографии и механических свойств ранее не детектируемых наноразмерных структур клеточной стенки микроорганизмов в их нативной среде.

В данной методике описаны процедуры, связанные с подготовкой биологических образцов, измерительной установки, изготовлением нанокапилляров, и методика проведения эксперимента получения топографии и механических свойств поверхностной структуры дрожжей, подверженных действию инновационных препаратов методом сканирующей ион-проводящей микроскопии в комбинации с конфокальной микроскопией.

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ ТОПОГРАФИИ И МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТНОЙ СТРУКТУРЫ ДРОЖЖЕЙ, ПОДВЕРЖЕННЫХ ДЕЙСТВИЮ ИННОВАЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТЬЮ, МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ИОН- ПРОВОДЯЩЕЙ МИКРОСКОПИИ

1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Данный документ устанавливает порядок подготовки образцов и работы на уникальной научной установке для проведения измерений структурных свойств клеток дрожжей.

2 ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта исследования выбраны дрожжи рода *Candida* spp., подверженных действию препаратов, обладающих противогрибковой активностью.

3 НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

При разработке данной методики получения топографии клеток методом сканирующей ион проводящей микроскопии, использованы следующие нормативные документы:

ГОСТ 8.417-2002 Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы величин

ГОСТ 8.207-76 Государственная система обеспечения единства измерений. Прямые измерения с многократными наблюдениями. Методы обработки результатов наблюдений. Основные положения

ГОСТ 12.2.007.0-75 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.3.019-80 Система стандартов безопасности труда. Испытания и измерения электрические. Общие требования безопасности

МИ 1317-2004 Государственная система обеспечения единства измерений. Результаты и характеристики погрешности измерений. Формы представления. Способы использования при испытаниях образцов продукции и контроле их параметров образцов продукции, и контроле их параметров

МИ 3269-2010 Построение, изложение, оформление и содержание документов на методики (методы) измерений

И 220.25-12 Должностная инструкция специалиста по технике безопасности

Примечание: при применении настоящей методики целесообразно проверить действие ссылочных стандартов на территории Российской Федерации по

соответствующему указателю стандартов, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменён (изменён), то при пользовании настоящей методикой следует руководствоваться заменённым (изменённым) стандартом. Если ссылочный документ отменён без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

4 МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ МЕТОДИКИ

4.1 ПРИБОРЫ

- С клетками работу проводят в ламинарном шкафу II класса защиты для поддержания стерильных условий.
- Подсчет концентрации клеток осуществляют с помощью камеры Горяева.
- Оценка плотности клеточной культуры осуществляется с помощью инвертированного светового микроскопа Nikon.
- Работа с жидкостями проводят с помощью механических дозаторов.
- Для работы за установкой СИПМ используется следующее оборудование:
 - уникальная научная установка «Сканирующий ион-проводящий микроскоп с конфокальным модулем».
 - СИПМ разработан на базе инвертированного оптического микроскопа Eclipse Ti-2 (Nikon, Япония), расположенного на антивибрационном столе.
 - Микроскоп включает в себя несколько функциональных частей, а именно:
 - ☐ систему исследования биологических микрообъектов методами измерения ионной проводимости
 - ☐ универсальный контроллер для сканирующей зондовой микроскопии
 - ☐ высоковольтный усилитель с системой считывания сигналов сенсоров перемещения пьезоманипуляторов
 - Лазерный пуллер Р-2000 для изготовления нанокапилляров в качестве зондов.

4.2 РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Чашки Петри большого диаметра для хранения приготовленных нанокапилляров, и малого диаметра в качестве ёмкости для буферного раствора.

- боросиликатные заготовки с внешним диаметром 1.2 мм, внутренним диаметром 0.69мм и длиной 7.5 см (Sutter Instruments, США)
- одноразовые пластиковые наконечники «Экохим» (РФ)
- пробирки с объемами 1,5 15 и 50 мл (Экохим, РФ)
- Чашки Петри с диаметром 35-мм со стеклянным дном для конфокальной микроскопии (Corning, США)

4.3 РЕАКТИВЫ

- Физиологический раствор (ПАНЭКО, РФ).
- Диметилсульфоксид чистотой 99,9 % (ПАНЭКО, РФ).

4.4.1 ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ

Описание последовательности действий:

1. Для иммобилизации дрожжей к субстрату производится покрытие чашек Петри силиконовым эластомером SYLGARD™ 184, после чего чашки помещаются на час в сушильный шкаф ULAB UT-4620 (ULAB, КНР) с поддержанием постоянной температуры $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2. После выдерживания чашек в сушильном шкафу чашки Петри промываются дистиллированной водой и подсушиваются в комнатных условиях для удаления излишней жидкости.

3. Подготавливается суспензия дрожжей разбавлением их в физиологическом растворе до плотности 1×10^7 КОЕ/мл.

4. Производится оценка концентрации клеток в суспензии путем подсчета в камере Горяева.

5. Приготовленная суспензия объёмом 10 мкл наносится на модифицированную эластомером чашку Петри. Время осаждения клеток составляет приблизительно три часа.

6. После чего чашка Петри заполняется 2 мл сбалансированного раствора Хэнкса для контрольных точек или рабочим раствором Хэнкса с исследуемым препаратом для экспериментальной точки.

7. После суточной инкубации в растворе дрожжи отмываются раствором Хэнкса и им же заполняется чашка Петри в объёме 2 мл.

4.4.2 ПОДГОТОВКА РАБОЧИХ РАСТВОРОВ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, ОБЛАДАЮЩИМИ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Подготовка рабочих растворов производится следующим образом. Навеску порошка лекарственного вещества (по 10 мкг) растворяют в диметилсульфоксиде

чистотой 99,9 % до концентрации 0,1 мг/мл, затем раствор доводится до тестовых концентраций в 10 мл раствора Хэнкса.

4.4.3 ИЗГОТОВЛЕНИЕ НАНОКАПИЛЛЯРОВ

Измерения проводят с помощью нанокapилляров, заполненные электролитом. Для изготовления капилляров необходимо выполнить ряд действий:

1. Капилляр помещается в зажимы регулируемой платформы.
2. Производится настройка следующих параметров:

Для зонда радиусом 45 нм: Heat 310, Fil 3, Vel 30, Del 160, Pul 0, Heat 330, Fil 3, Vel 25, Del 160 и Pul 200.

Для зондов с радиусом 30 нм: Heat 350, Fil 3, Vel 35, Del 160, Pul 0, Heat 330, Fil 3, Vel 50, Del 160 и Pul 220.

3. Производится запуск пуллера, после завершения рабочего цикла получают две симметричных заготовки.

4.4.4 ПОДГОТОВКА СИСТЕМЫ СИПМ

Первоначально производится запуск всех модулей СИПМ микроскопа в произвольном порядке. Базовый вариант установки включает в себя: систему пьезоуправления ICAPPIC (ICAPPIC Limited, Великобритания), установленную на инвертированном оптическом микроскопе Eclipse Ti-2 (Nikon, Япония) и закрытую клетку Фарадея; универсальный контроллер ICAP-PIC (ICAPPIC Limited, Великобритания); усилитель MultiClamp 700B (Molecular Devices, США). На сканирующую платформу помещается чашка Петри, в которую вносится электрод сравнения. В пьезоактуатор помещается заполненный раствором Хэнкса зонд, производится фокусировка микроскопа на объект исследования. Затем на ЭВМ запускается программа «ScanIC Control» и начинается настройка параметров.

4.4.5 НАСТРОЙКА ПАРАМЕТРОВ СИПМ УСТАНОВКИ

Для получения изображения клеток дрожжей настройки в программе «ScanIC Control» задаются следующие: амплитуда прыжка 2000 нм, скорость подвода 50 нм/мс, задержка после подвода зонда 7000 мкс, задержка перед перемещением зонда 5 мс, задержка на точке 20, функция отскока (включена), размер квадрата предварительного сканирования 4.286 мкм, высота подъема при предварительном сканировании 3000 нм, скорость подвода вне съемки 25 мкм/с.

4.4.6 ХОД ЭКСПЕРИМЕНТА

1. После настройки оборудования запускается подвод зонда к поверхности жидкости чашки Петри, шум не должен превышать 2 пА.

2. Подается напряжение через цепь величиной в 200 мВ. Производится дальнейший подвод зонда к поверхности субстрата чашки Петри.

3. При помощи оптического микроскопа производят нацеливание наконечника зонда на дрожжевые клетки, запускается сканирование на участке 30 x 30 мкм. На полученном снимке, через программное обеспечение, выделяется конкретный участок с несколькими клетками размером в 10 x 10 мкм, запускается сканирование в хорошем разрешении.

4. После получения топографии целой клетки зонд отводится на 20 мкм по высоте и выбирается область 1x1 мкм на поверхности клетки. Для замеров механических свойств подключаются рабочие точки sp1 и sp2 Зонд подводится, и запускается сканирование при среднем разрешении (60 нм). Таким образом измеряется максимально возможное количество участков (по одному на клетку).

5. Для каждой экспериментальной точки требуется от 15 замеров участков по 1 x 1 мкм. После набора статистических данных берется новый образец (экспериментальная точка). Двух повторов одной группы образцов для получения достоверных данных достаточно.

4.4.7 ОБРАБОТКА ДАННЫХ

После получения экспериментальных данных проводится их обработка в программе «SICMImageViewer». Для этого в программном обеспечении выбирается изображение, окрашивается в цветовую гамму представленных палитр, подключается функция «избавление от шумов», проводятся и сохраняются в формате «.xlsx» профили по поверхности клеток, сохраняется изображение в формате «.JPG». Визуализация и нормирование графиков проводится в программе «OriginLab». Затем в программе «SICMImageViewer» на выбранном изображении проводится расчет механических свойств и построение их карт при помощи функции «анализ жесткости методом Шефелда». На изображении выделяются области поврежденных структур, и программа в численном виде выдает значения деформации и модуля Юнга. Данные статистически обрабатываются в программе «OriginLab». Результаты измерений представляются в виде рисунков СИПМ снимков топографии дрожжей и численных значений величин деформации и модуля Юнга поверхностных структур клеточной стенки.

ВЫВОДЫ:

Описанная методика позволяет проводить сканирование топографии, локальных механических свойств живых клеток дрожжи рода *Candida spp.* с применением сканирующей ион-проводящей микроскопии

Приложение Д
(обязательное)

Снимки дрожжей *Candida spp.* полученные методом СИПМ

Приложение Д1. Снимки контрольной группы *C. parapsilosis* ATCC 22019 на рисунке Д.1.

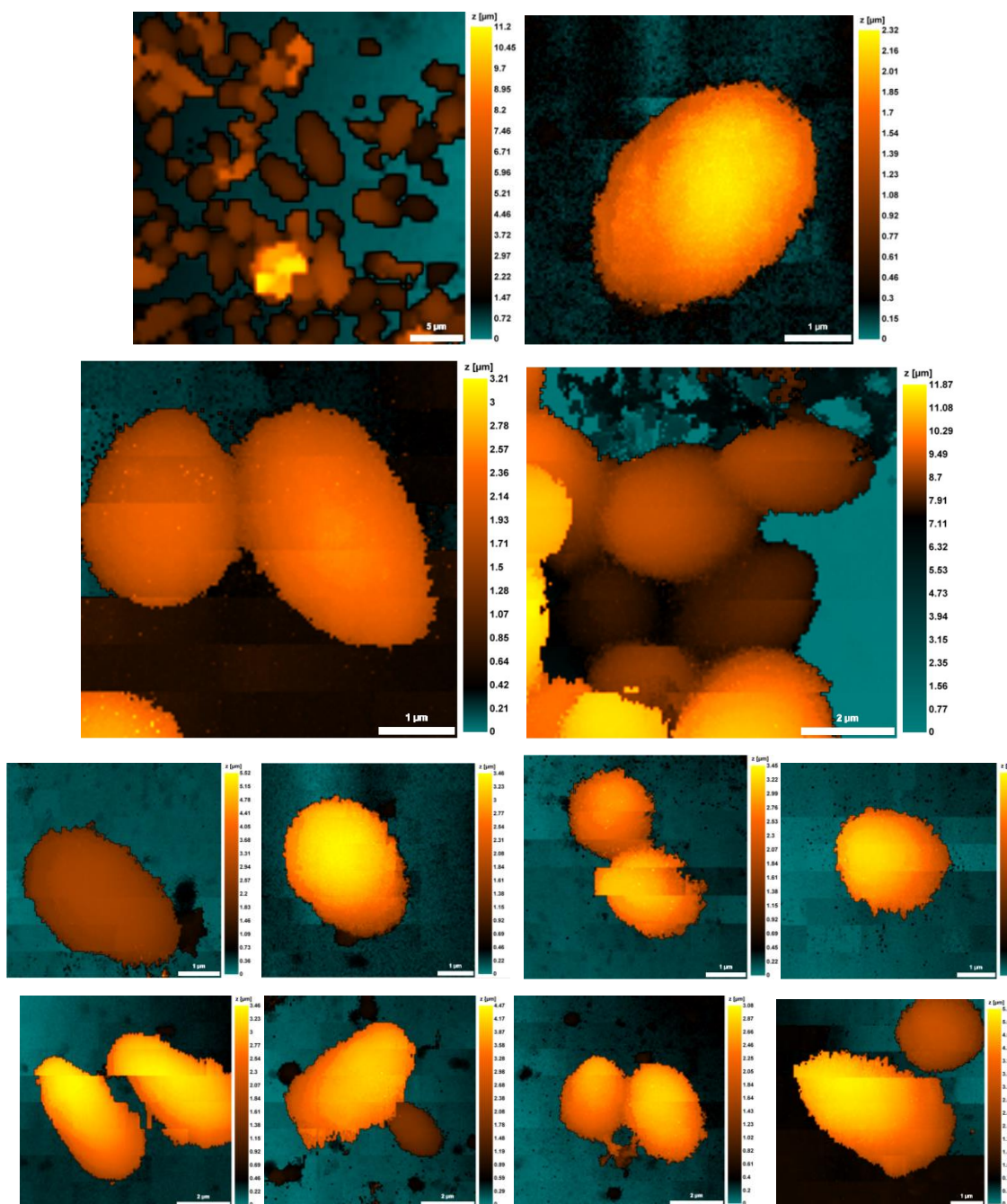
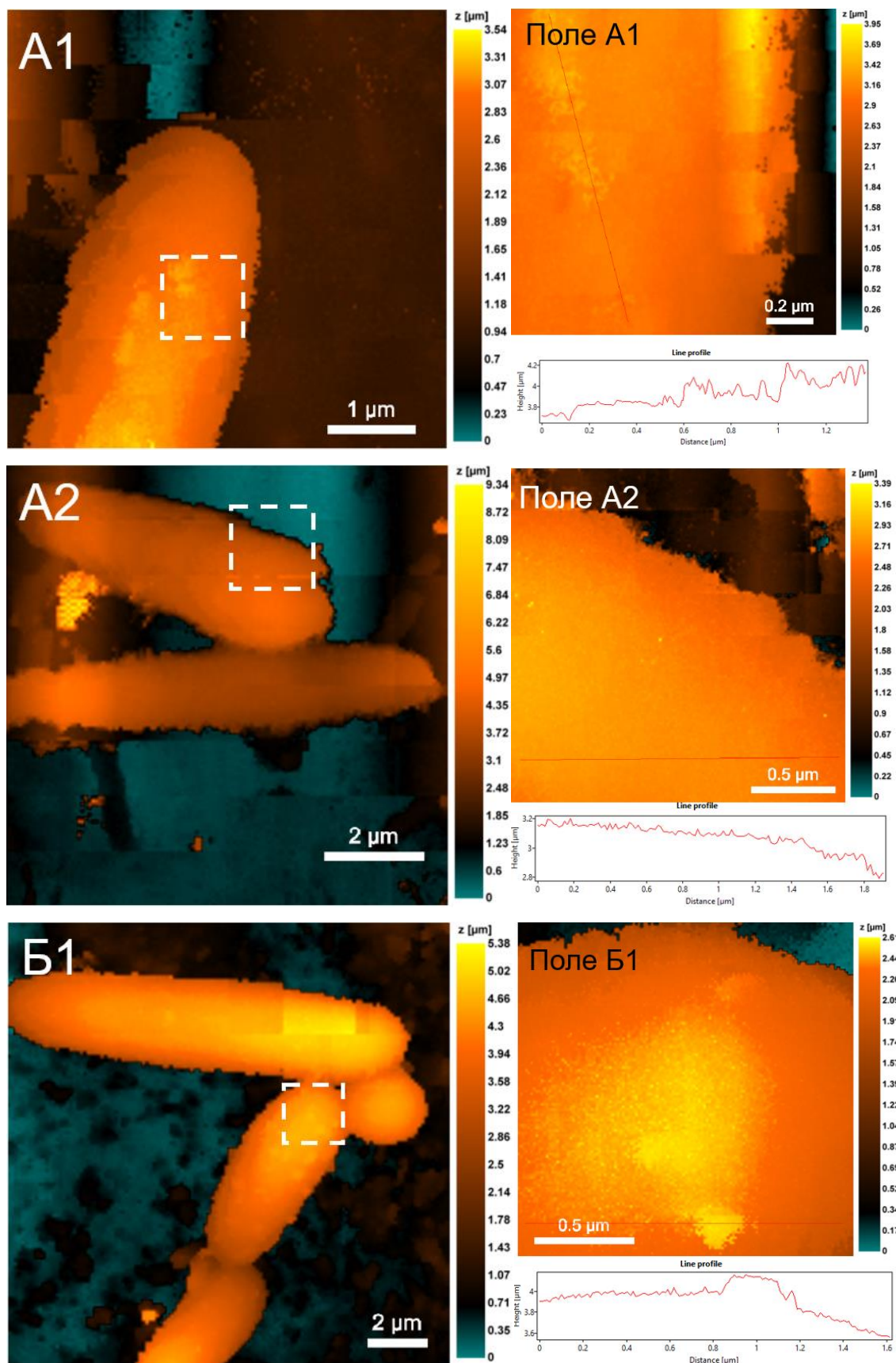
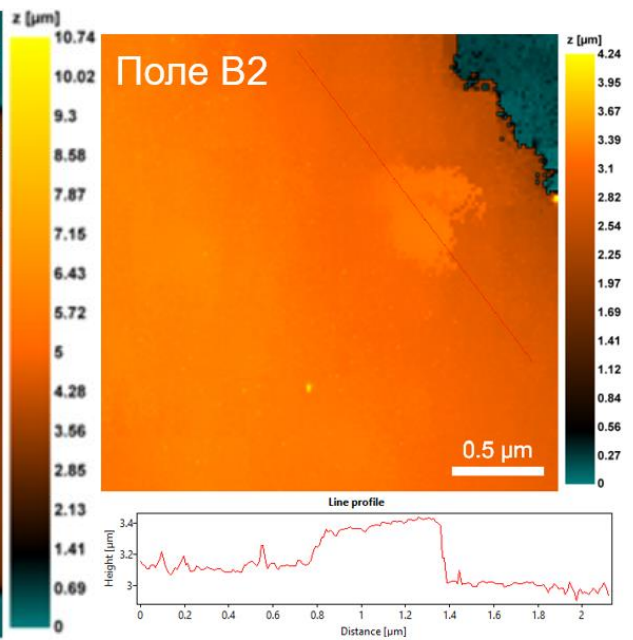
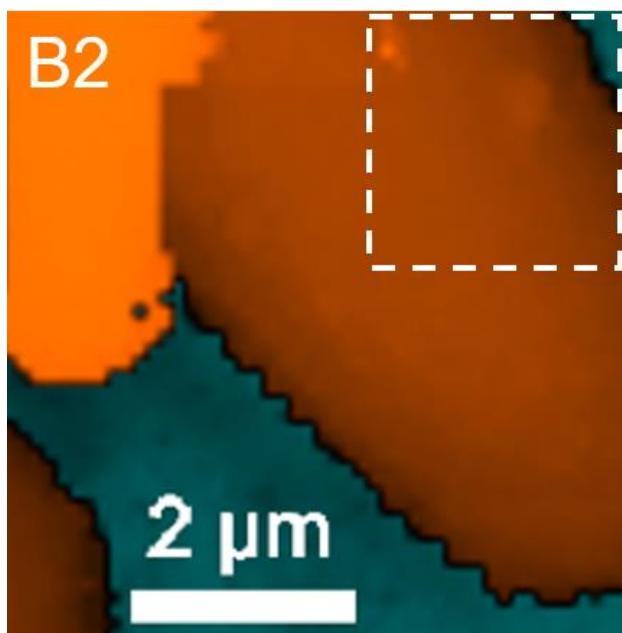
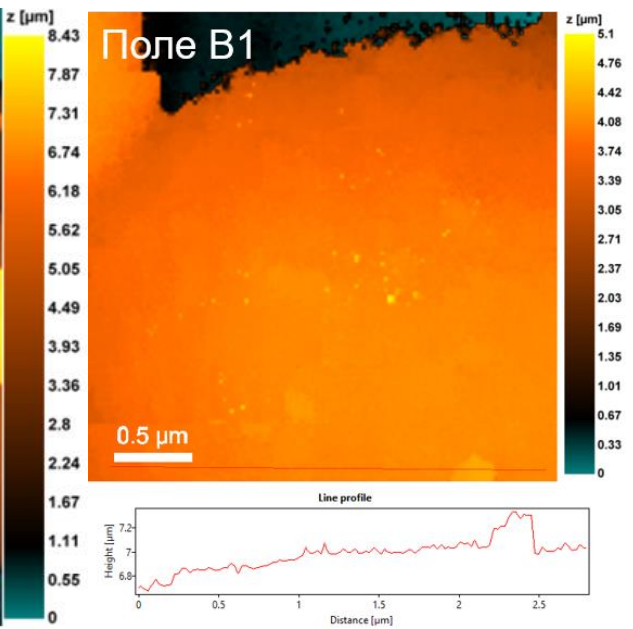
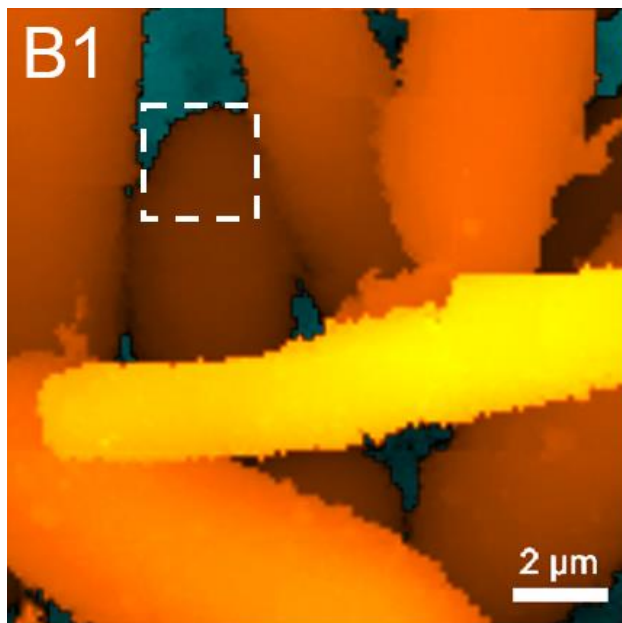
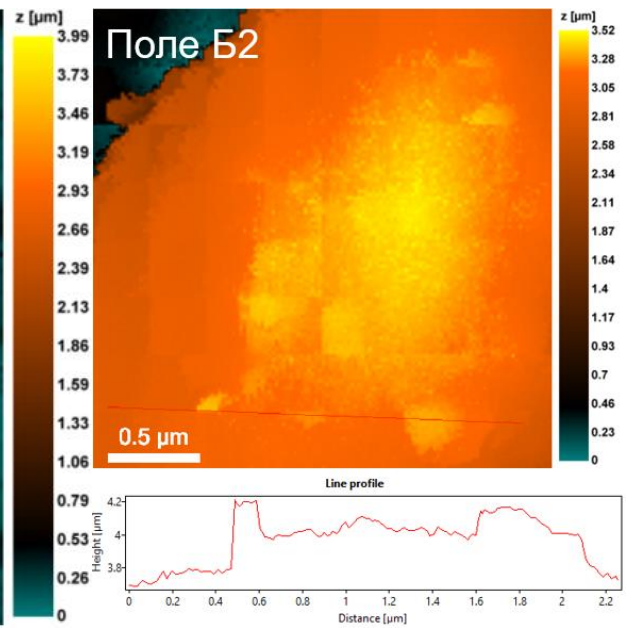
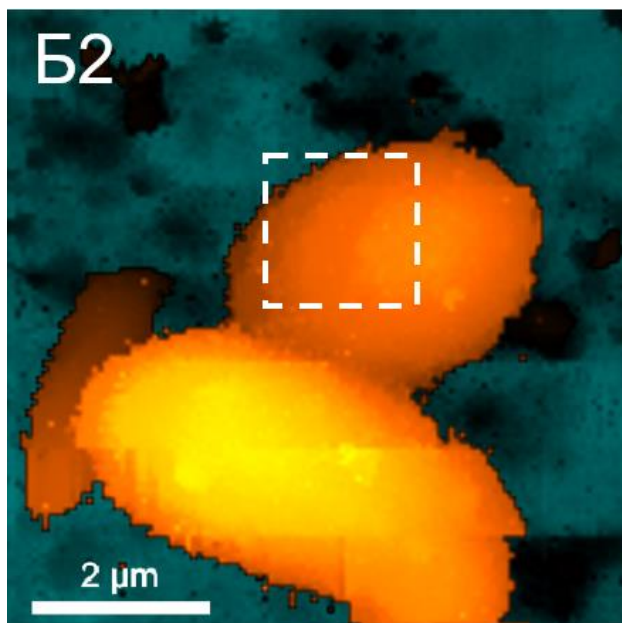
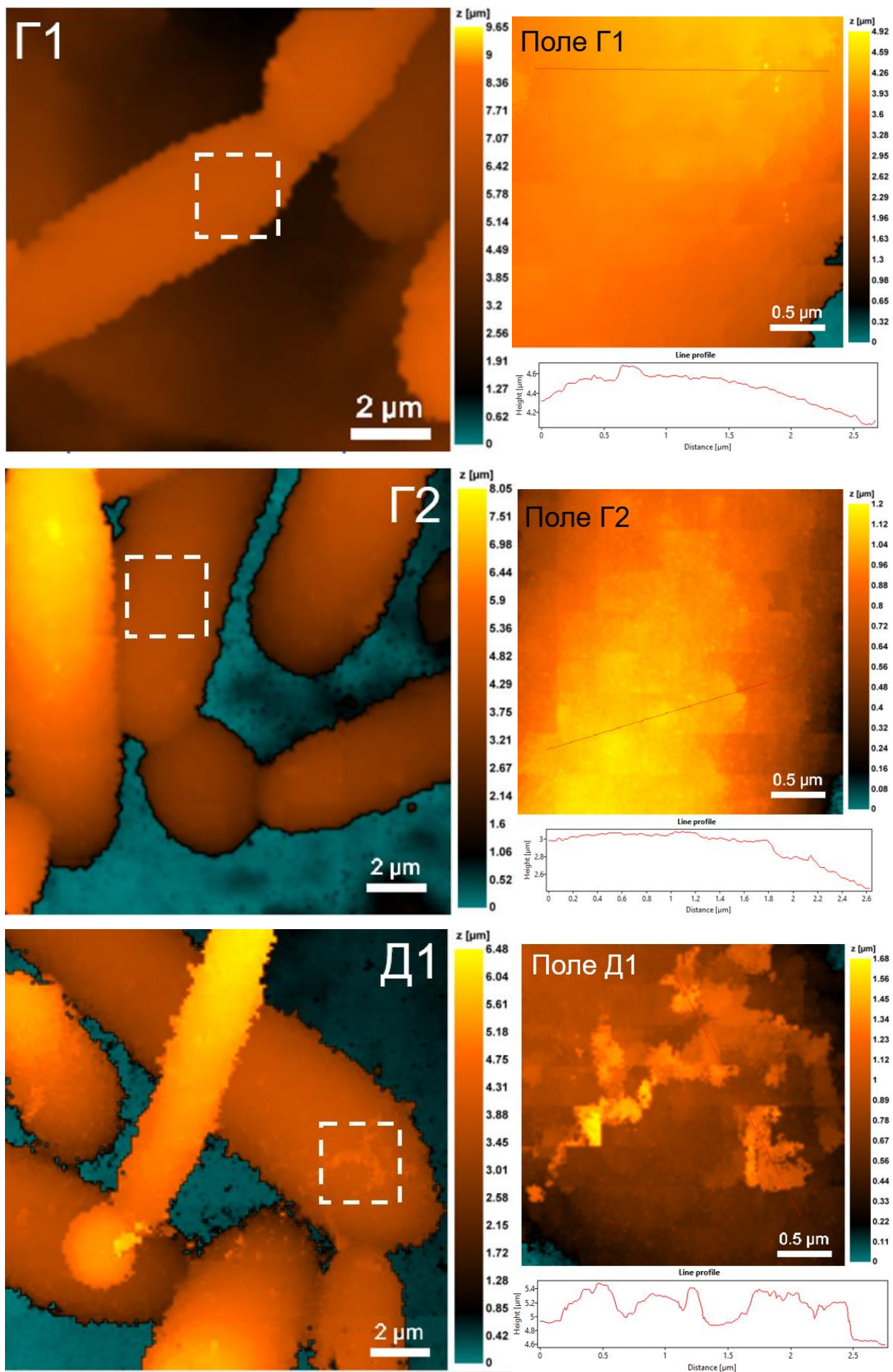


Рисунок Д.1

Приложение Д2. Снимки *C. parapsilosis* ATCC 22019 с добавлением вориконазола при суточной инкубации с концентрацией в (А) 1 мкг/мл; (Б) 5 мкг/мл; (В) 10 мкг/мл (Б) 20 мкг/мл; (Б) 40 мкг/мл на рисунке Д.2.







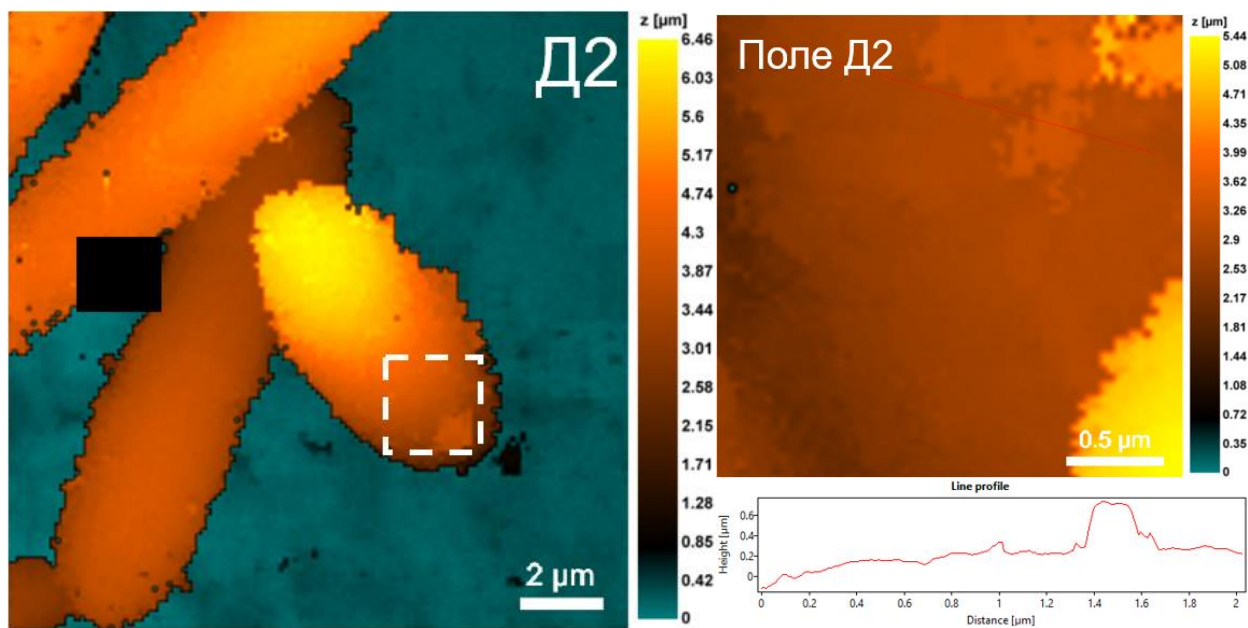
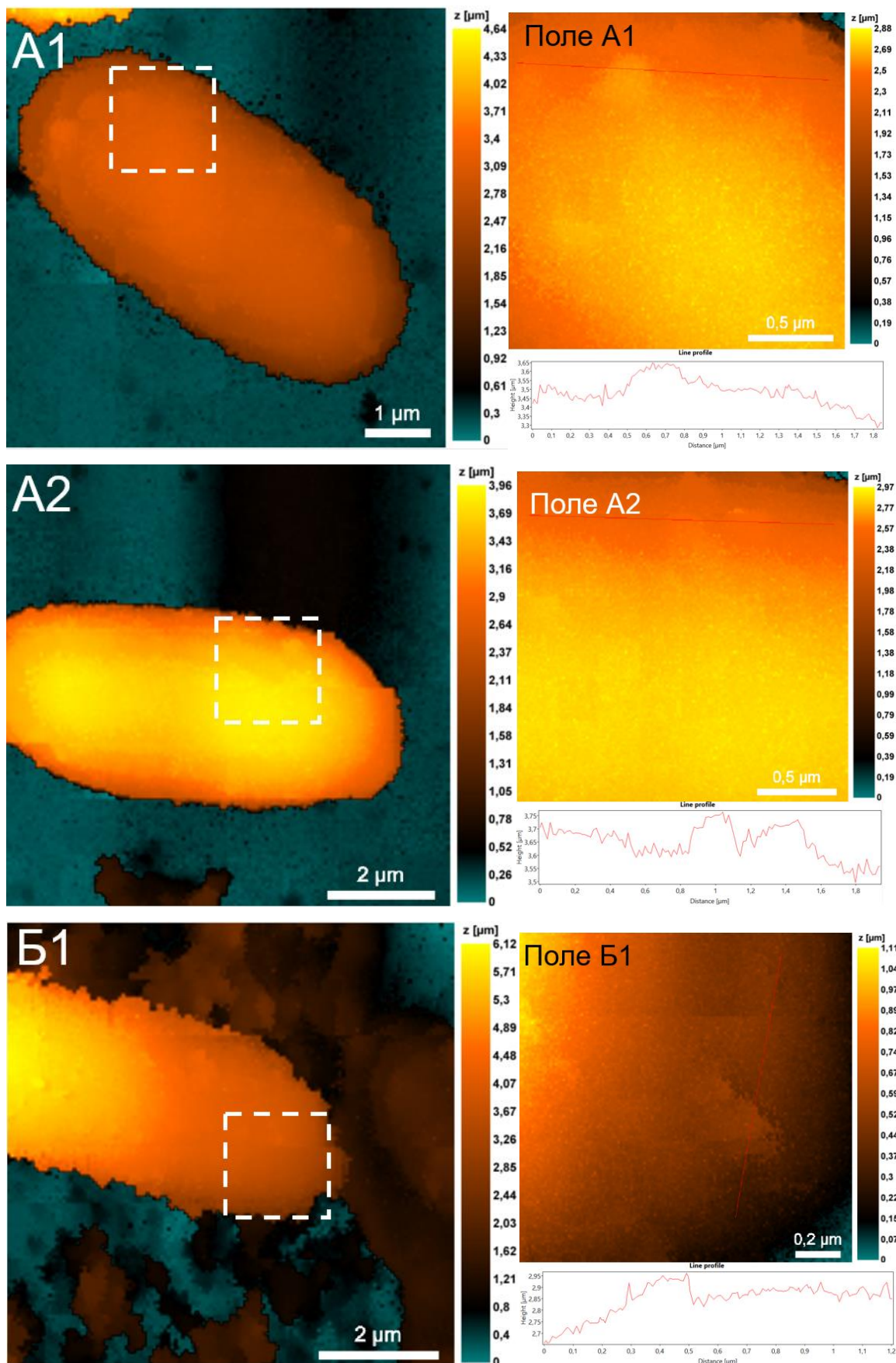
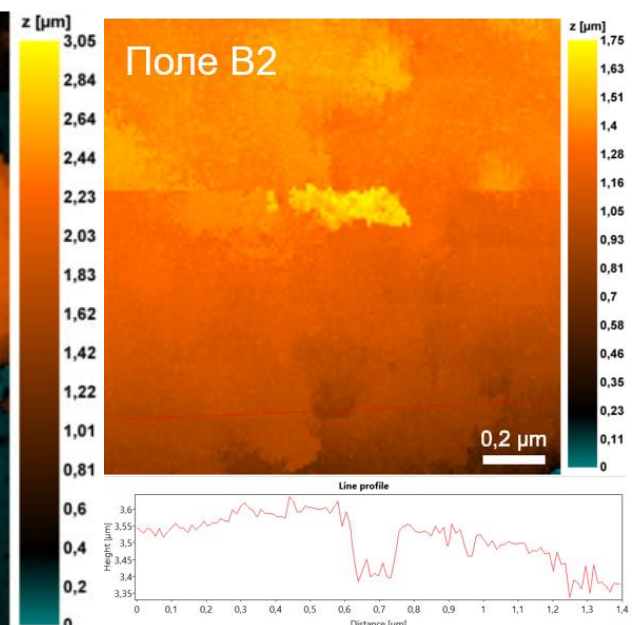
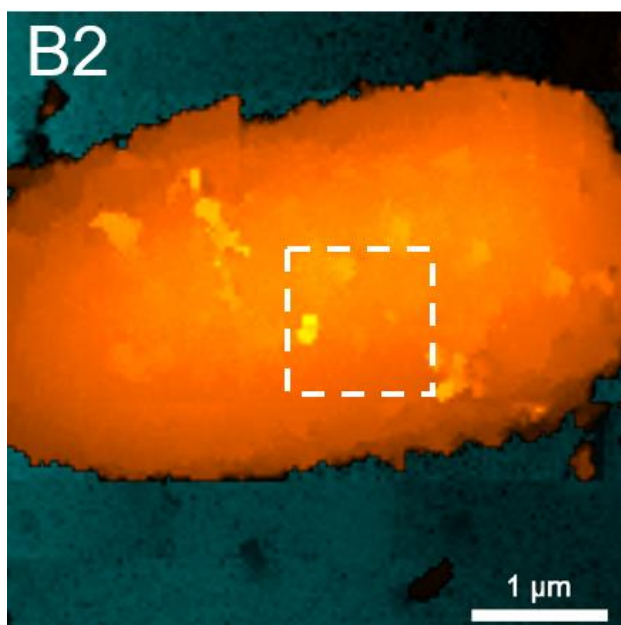
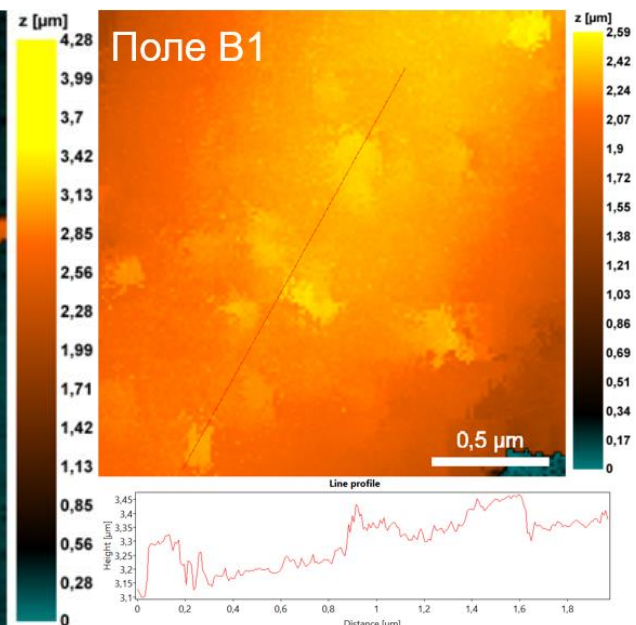
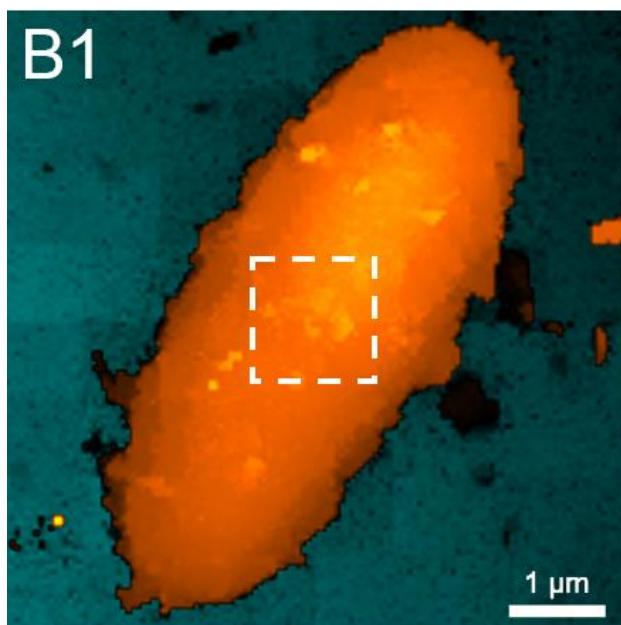
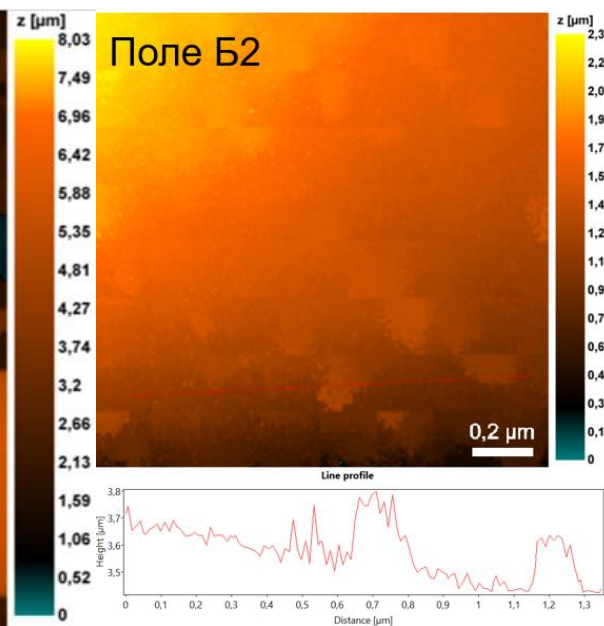
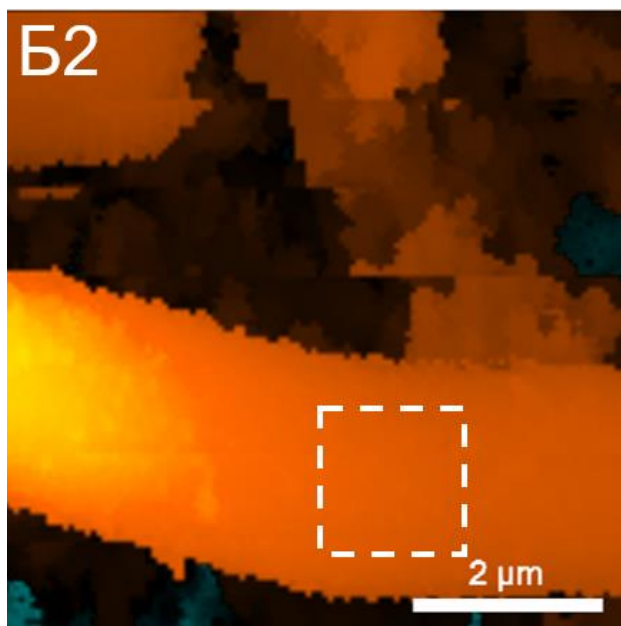
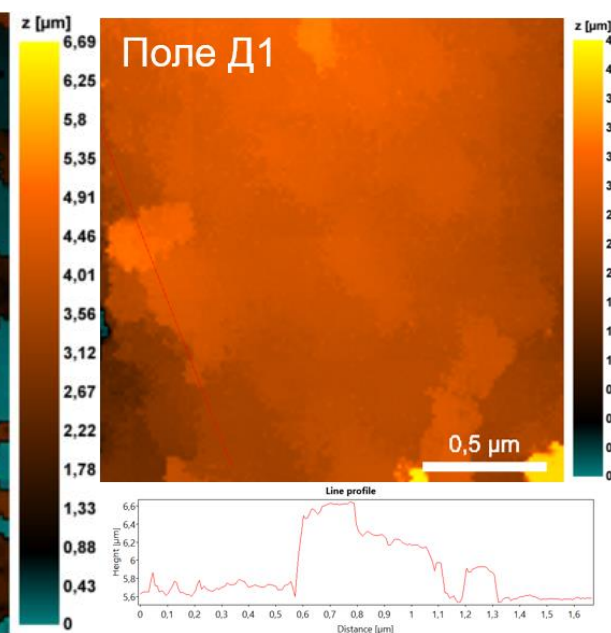
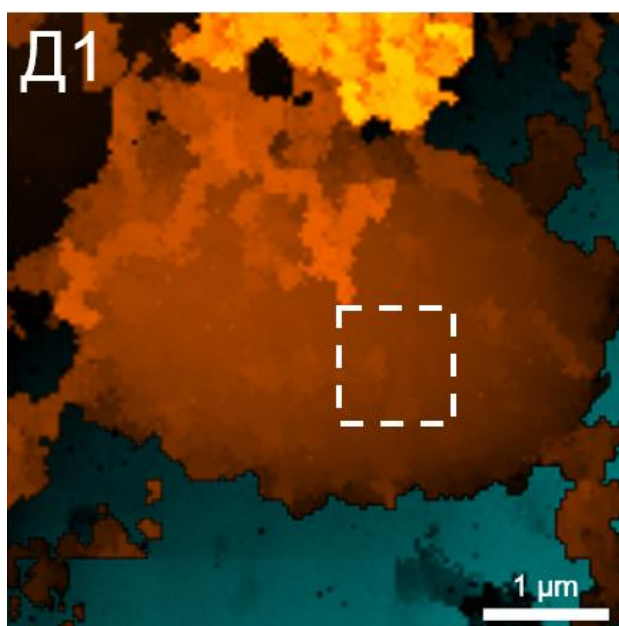
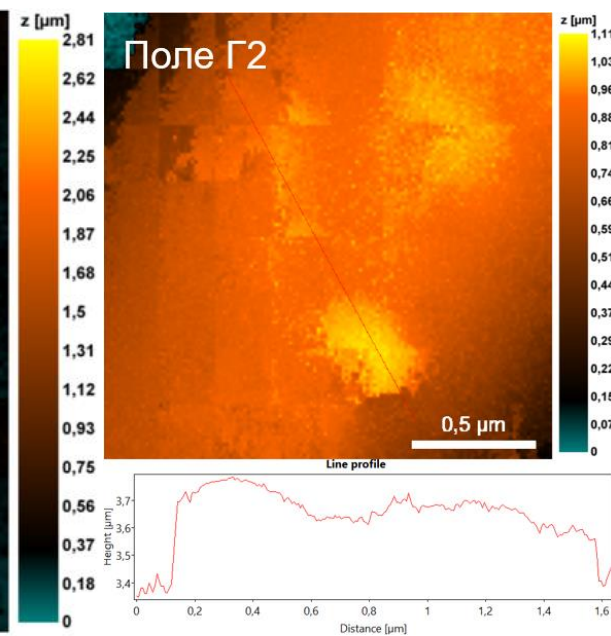
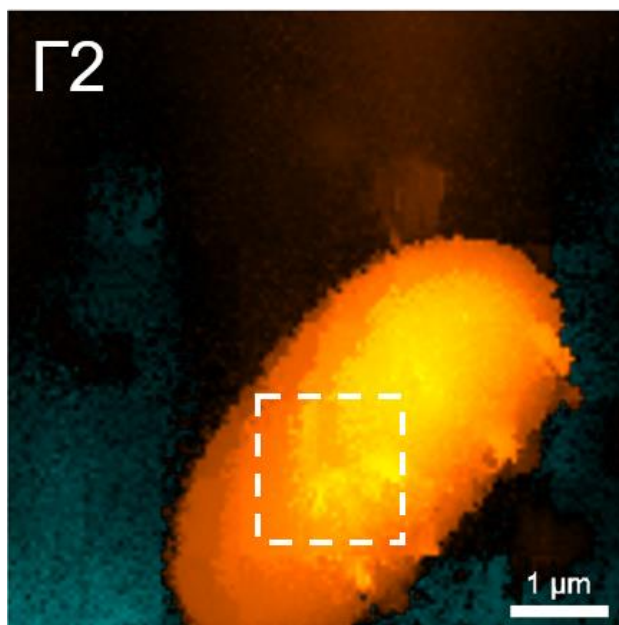
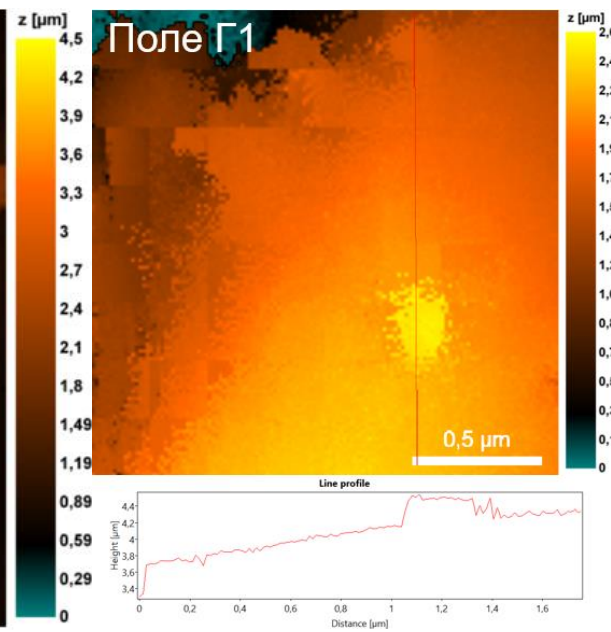
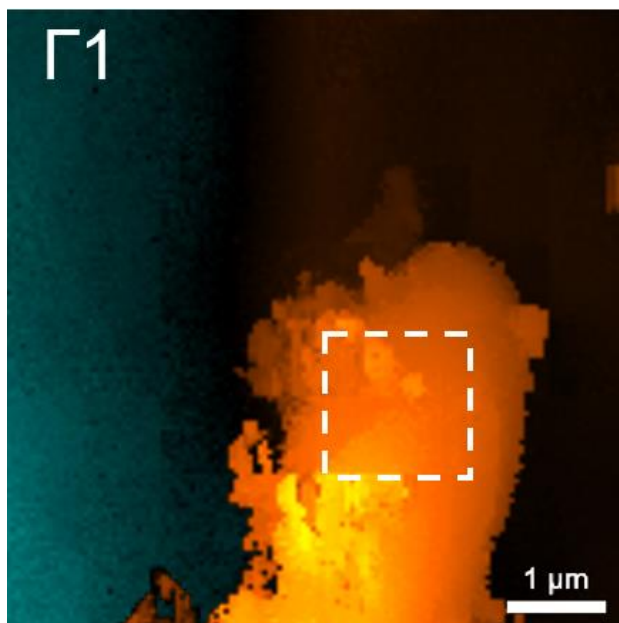


Рисунок Д.2

Приложение Д3. Снимки *C. parapsilosis* ATCC 22019 с добавлением итраконазола при суточной инкубации с концентрацией в (А) 1 мкг/мл; (Б) 5 мкг/мл; (В) 10 мкг/мл (Б) 20 мкг/мл; (Б) 40 мкг/мл на рисунке Д.3.







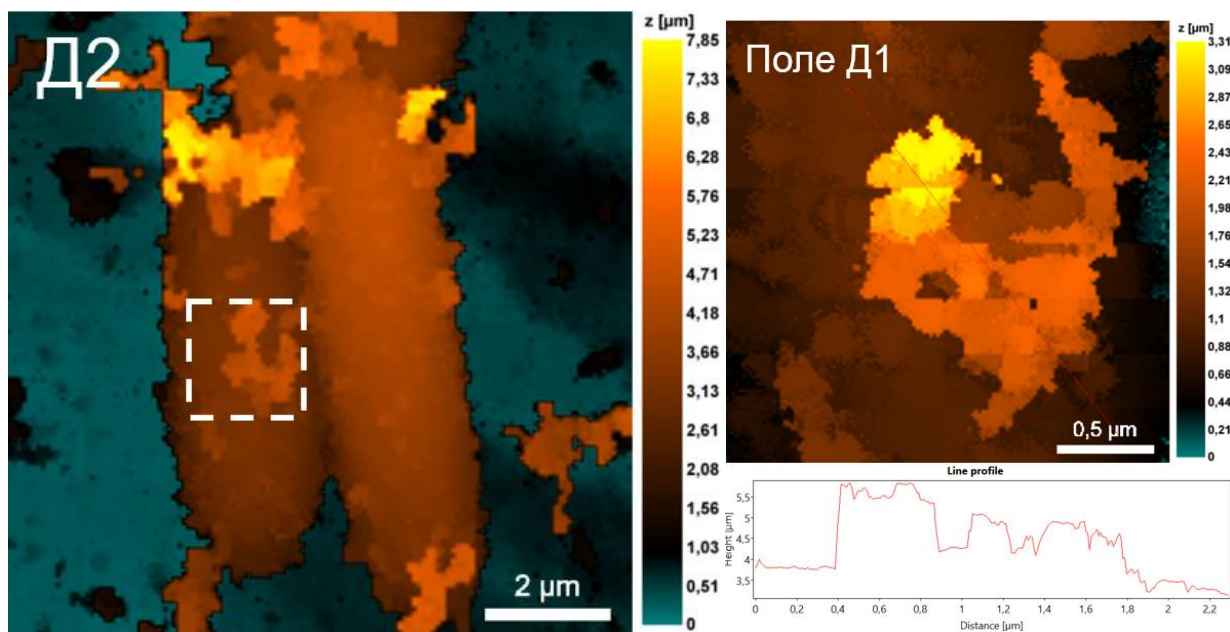
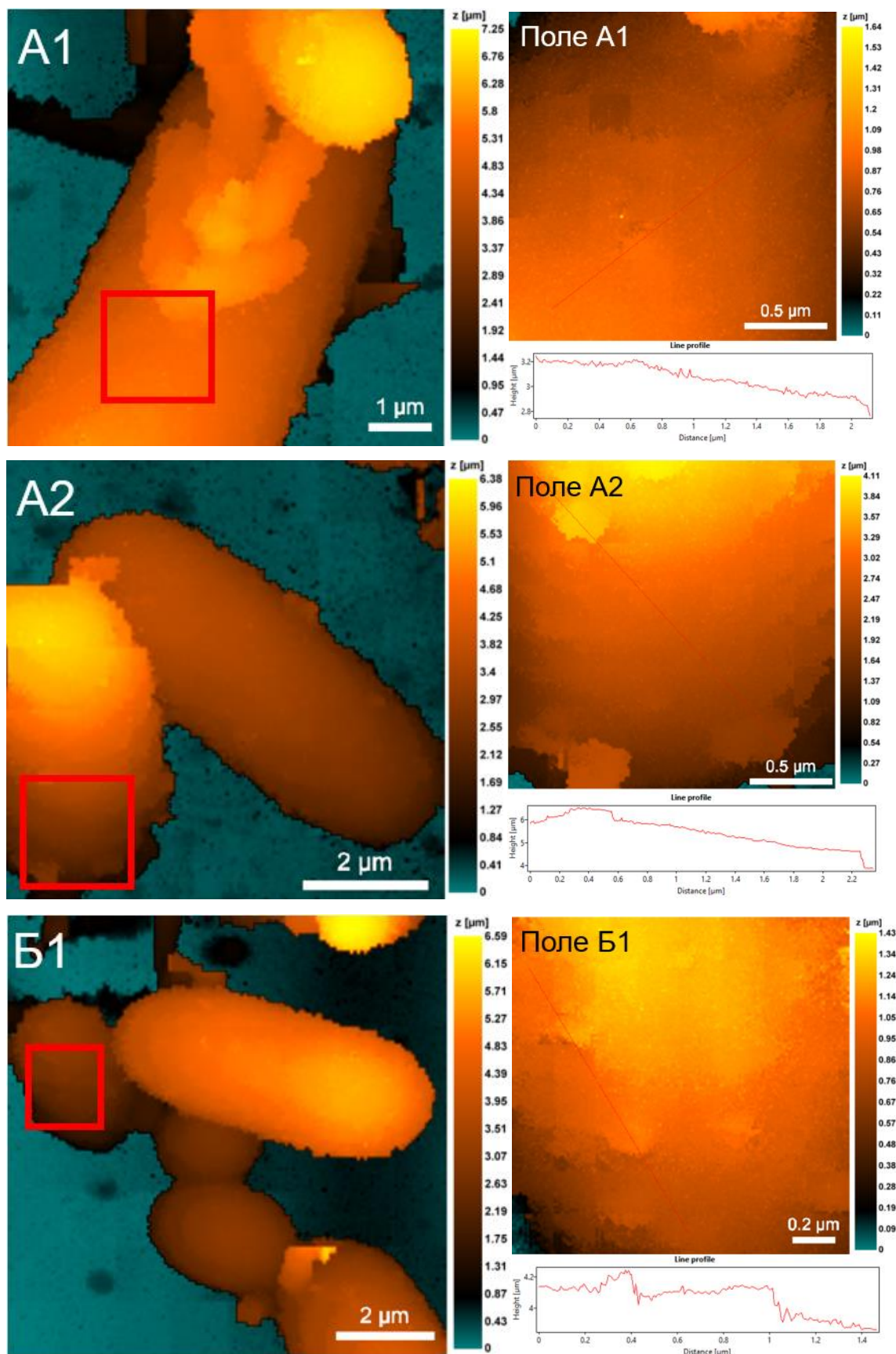
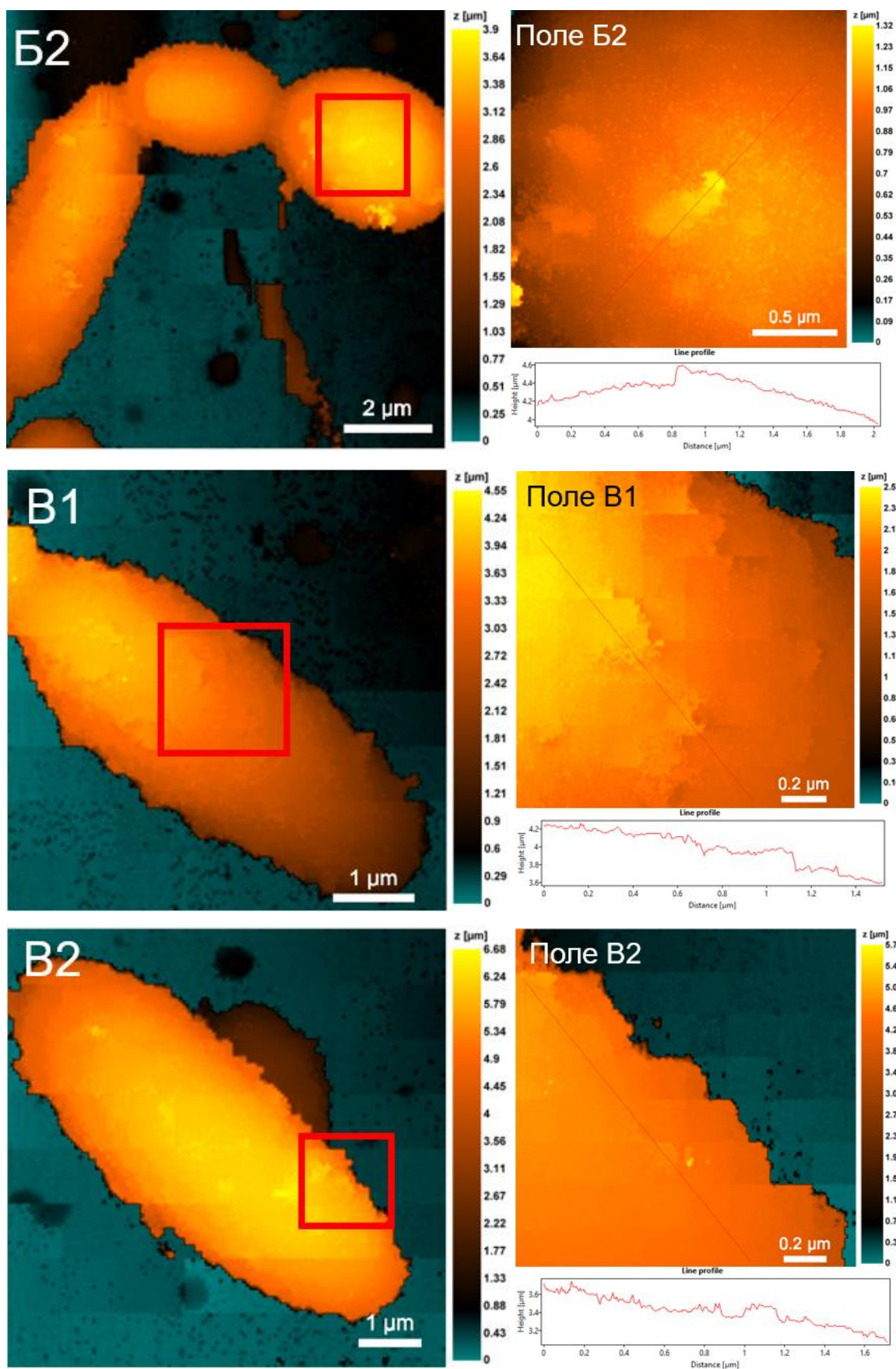
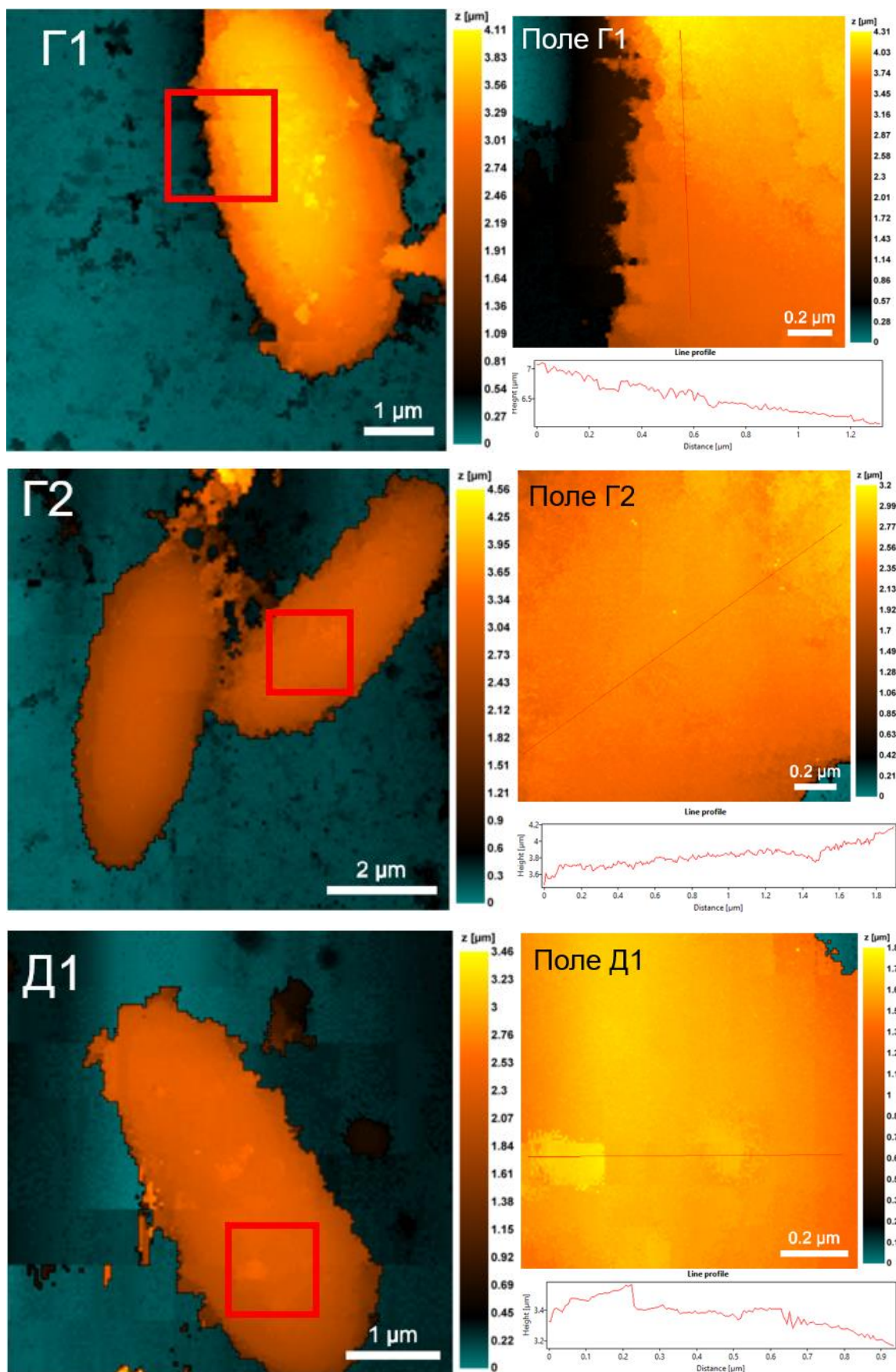


Рисунок Д.3

Приложение Д4. Снимки *C. parapsilosis* ATCC 22019 с добавлением L-272 при суточной инкубации с концентрацией в (А) 1 мкг/мл; (Б) 5 мкг/мл; (В) 10 мкг/мл (Б) 20 мкг/мл; (Б) 40 мкг/мл на рисунке Д.4.







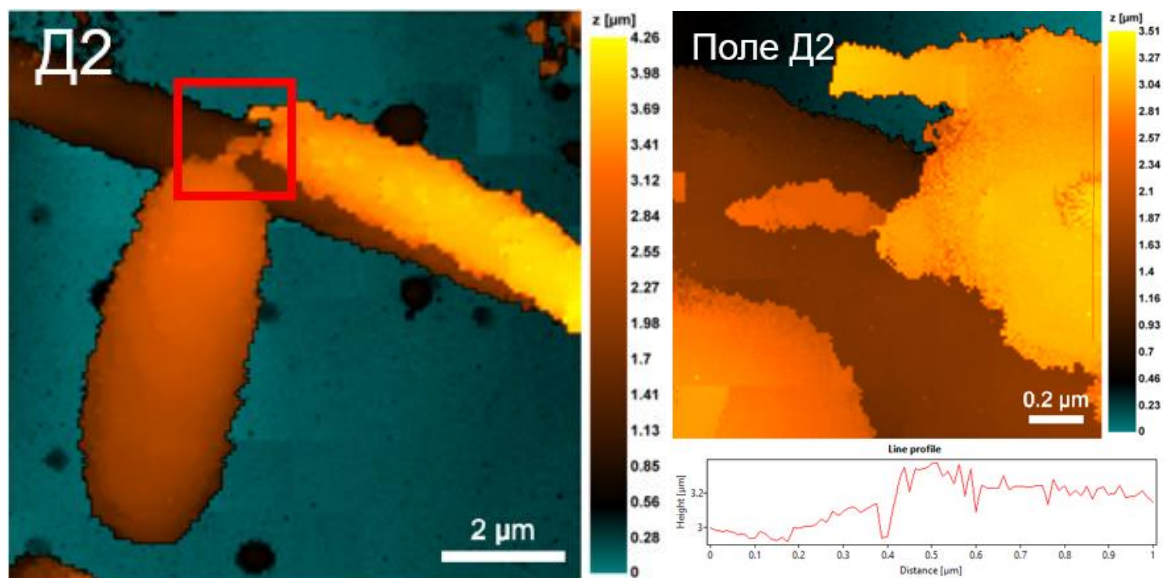
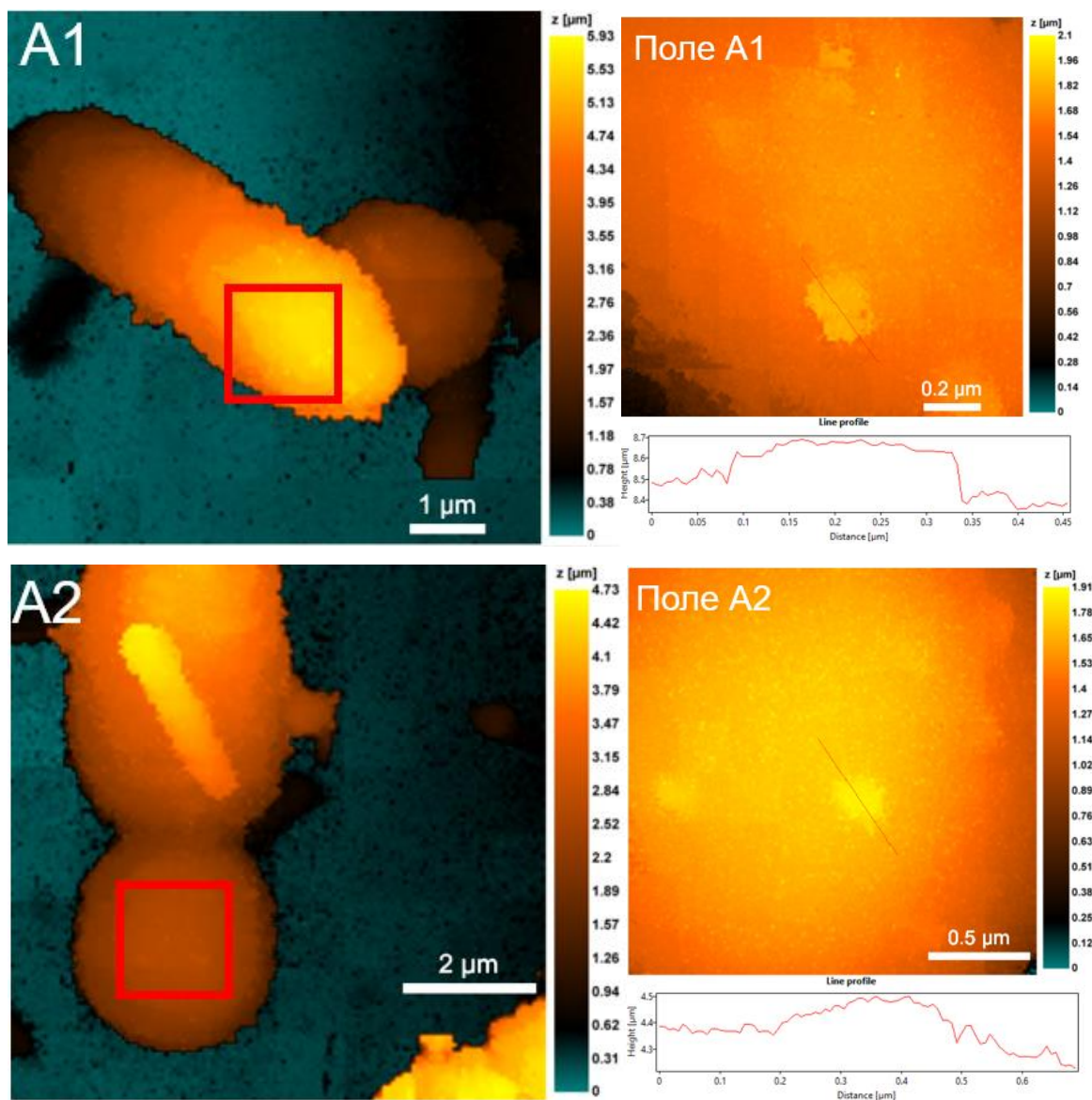
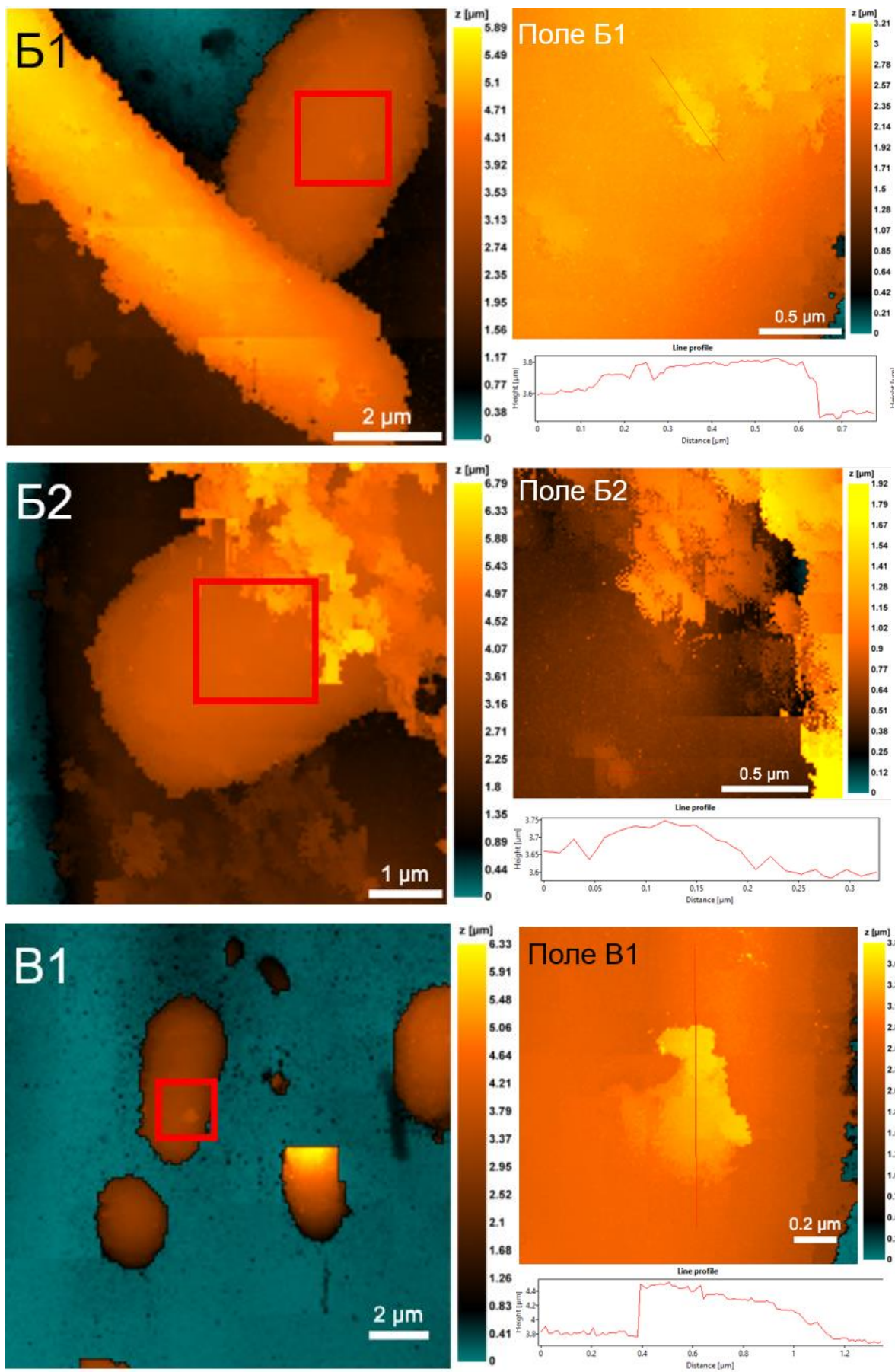
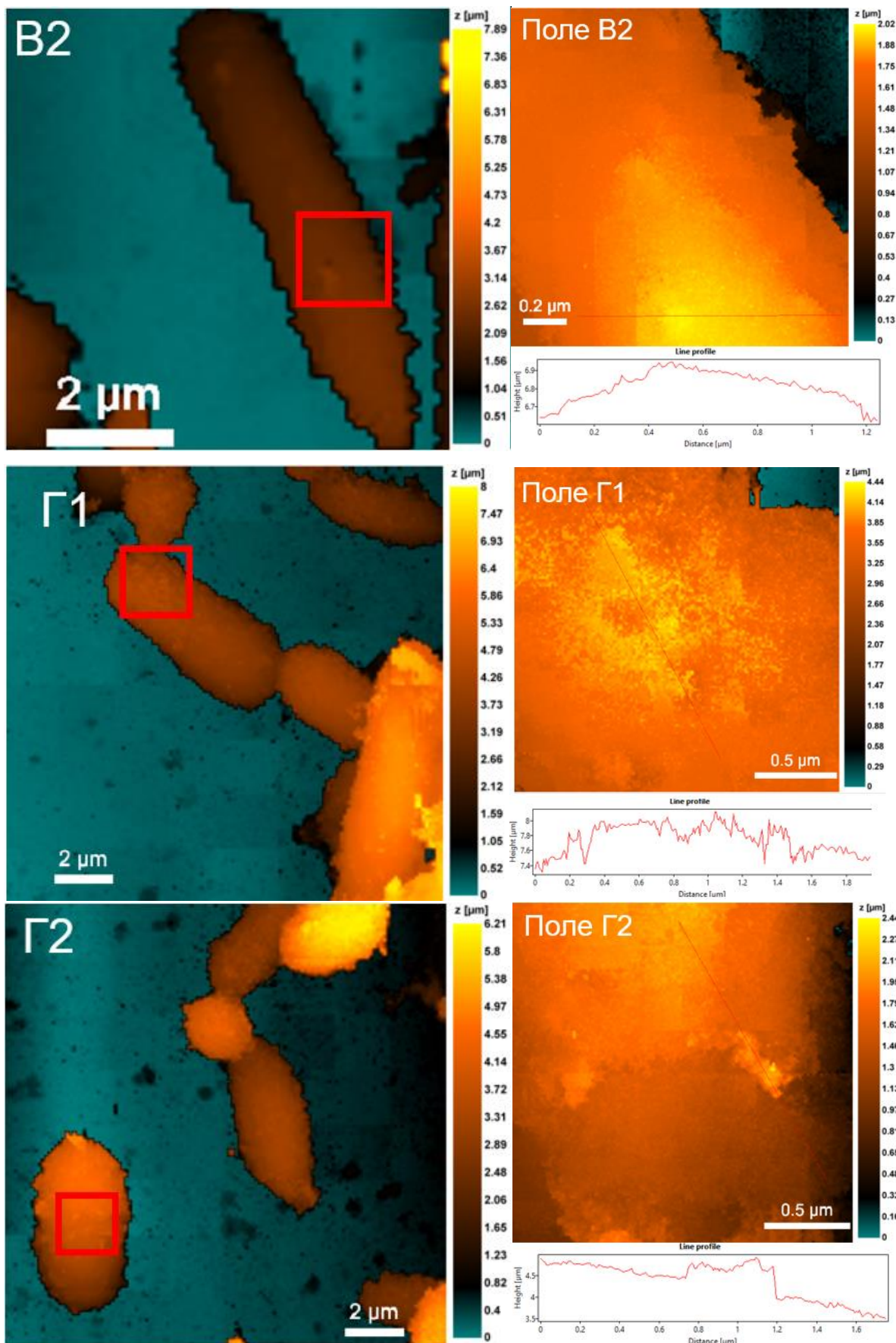


Рисунок Д.4

Приложение Д5. Снимки *C. parapsilosis* ATCC 22019 с добавлением L-273 при суточной инкубации с концентрацией в (А) 1 мкг/мл; (Б) 5 мкг/мл; (В) 10 мкг/мл (Б) 20 мкг/мл; (Б) 40 мкг/мл на рисунке А.5.







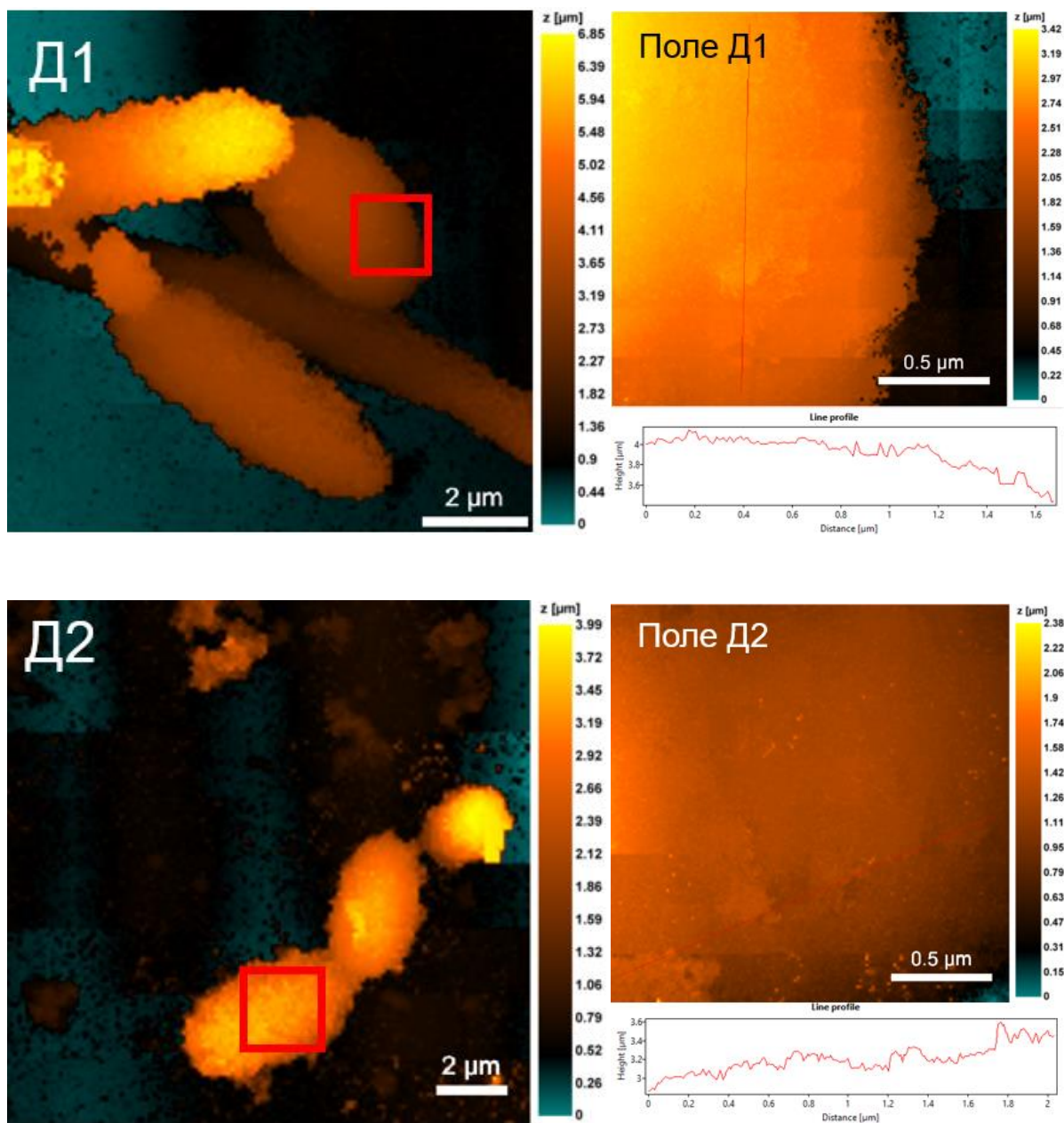
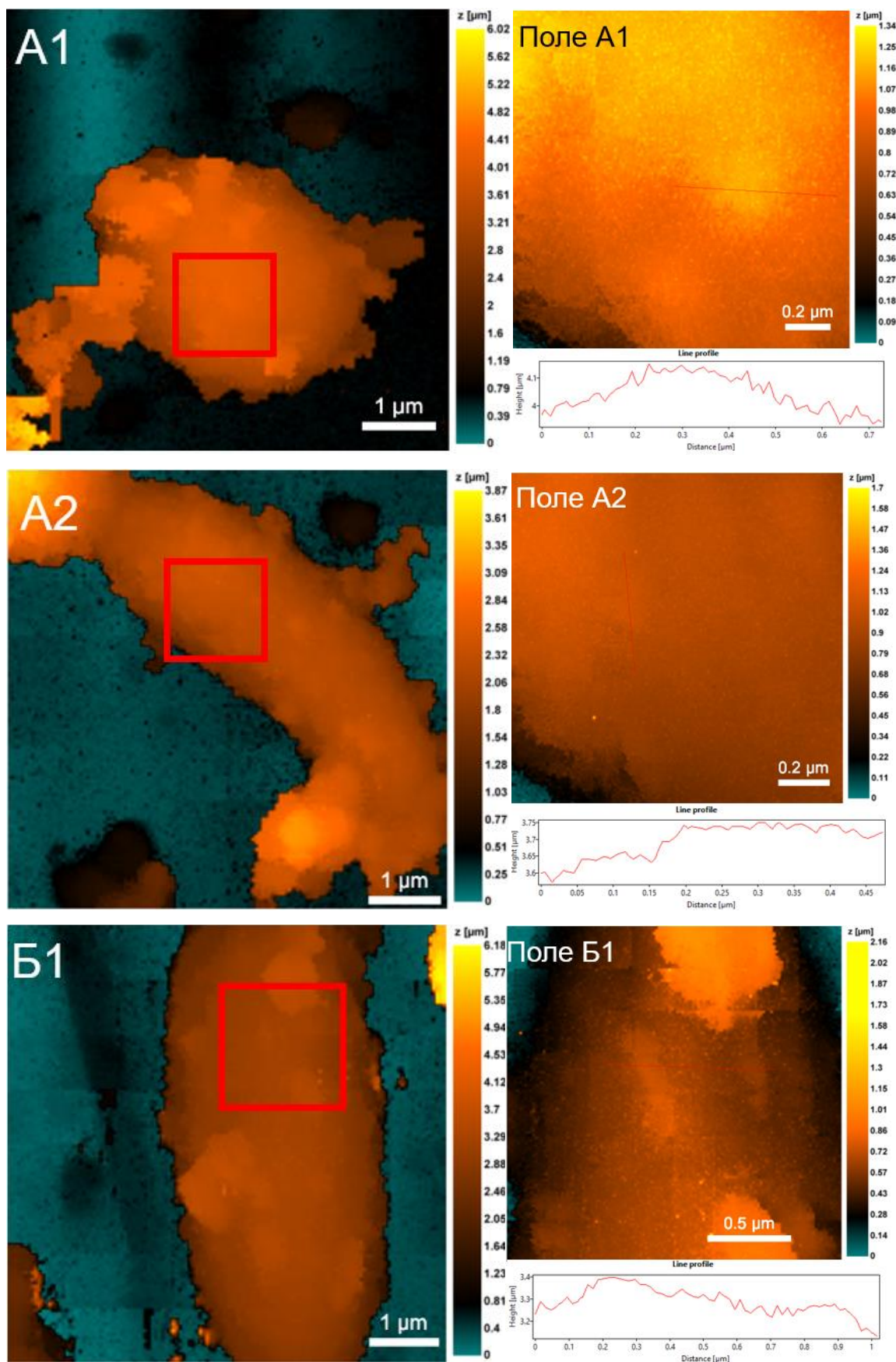
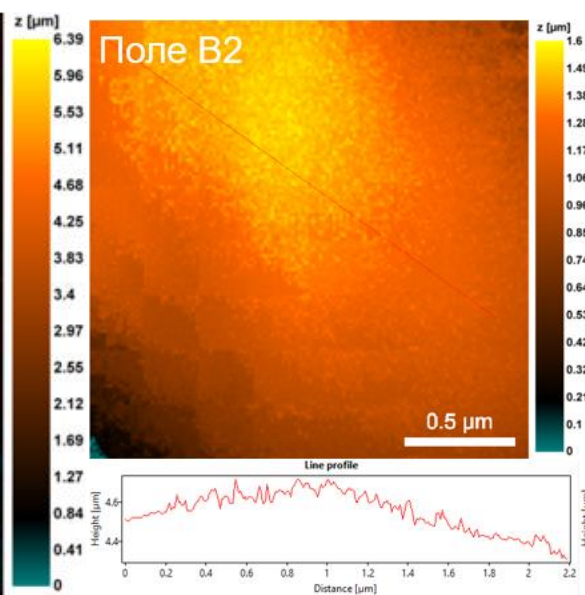
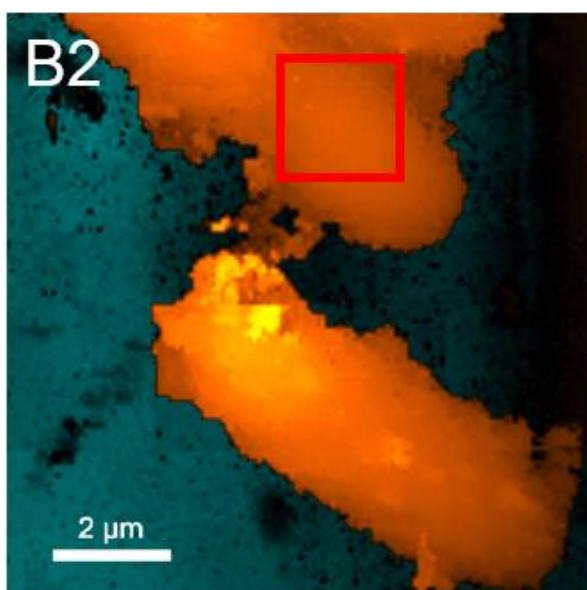
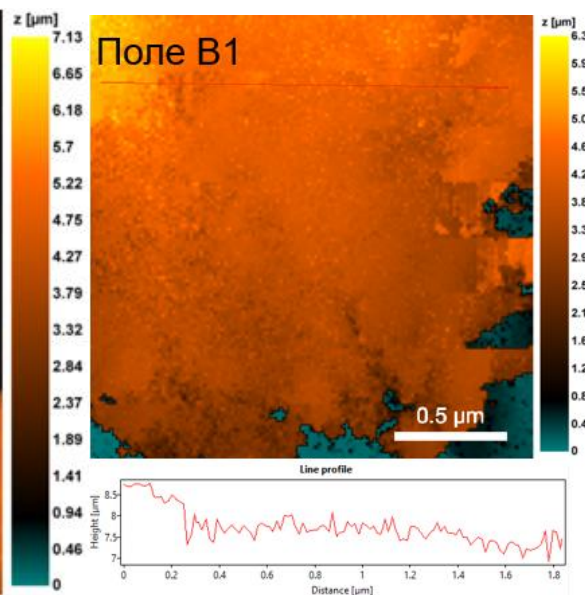
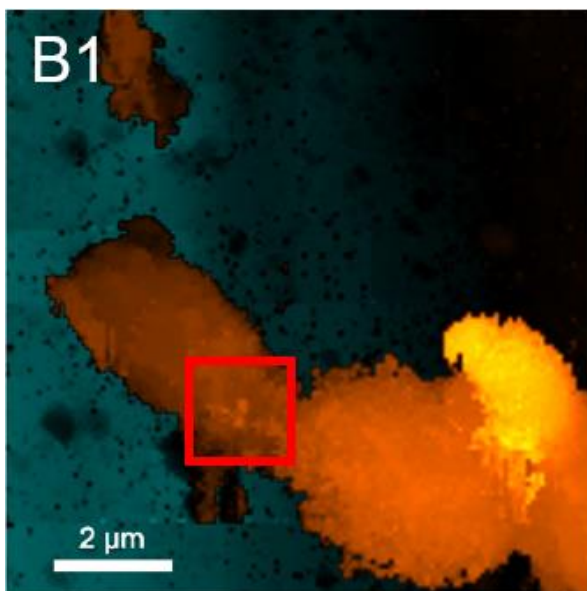
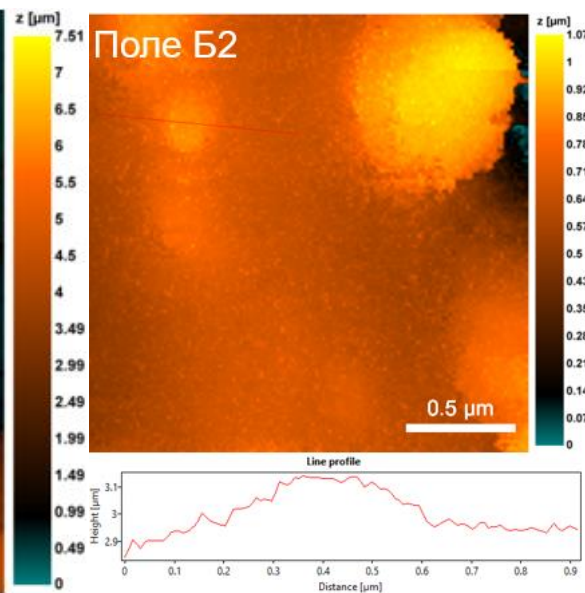
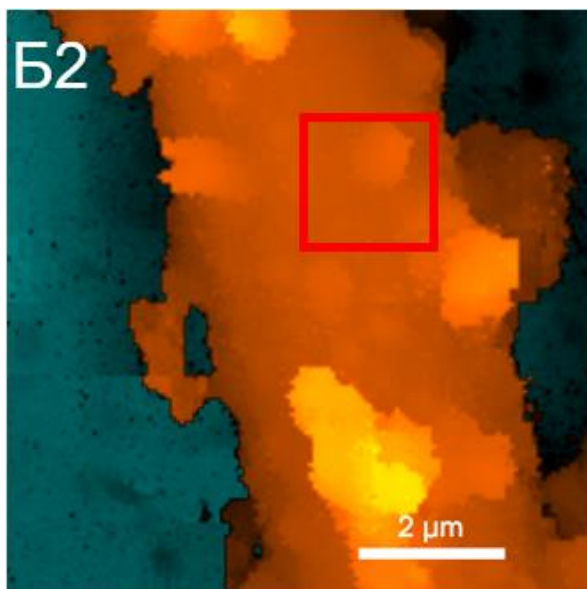
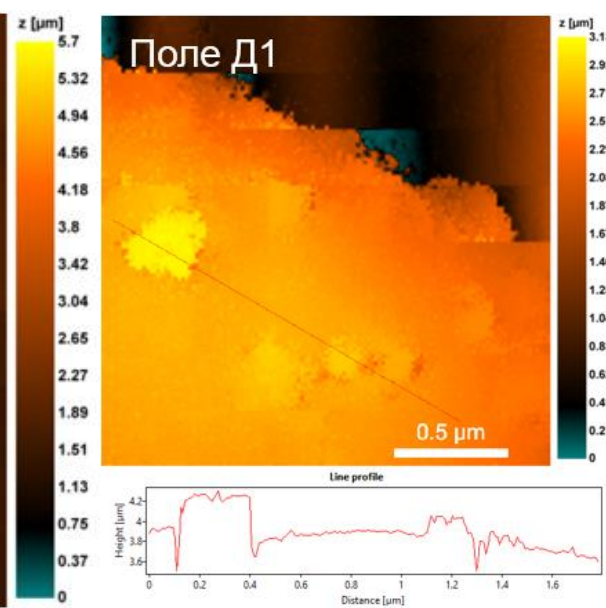
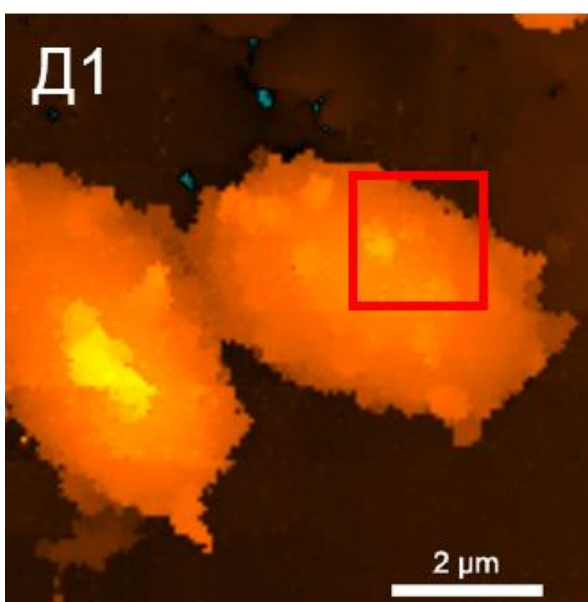
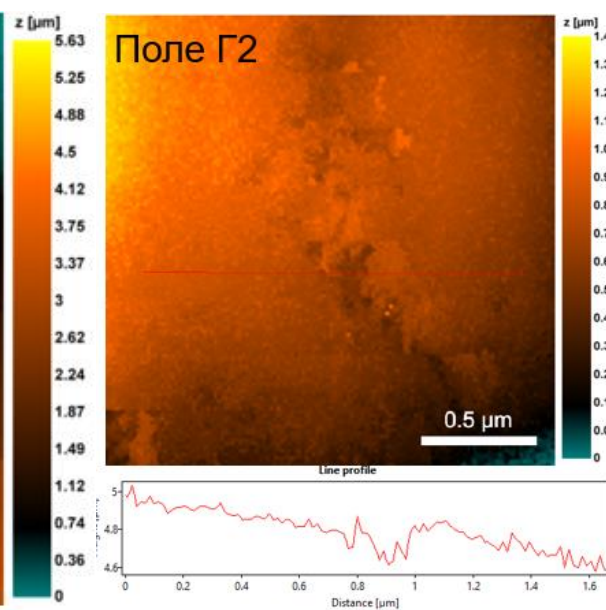
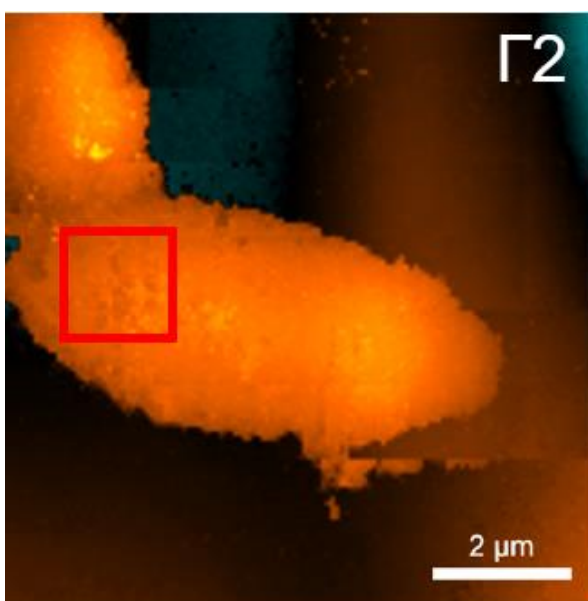
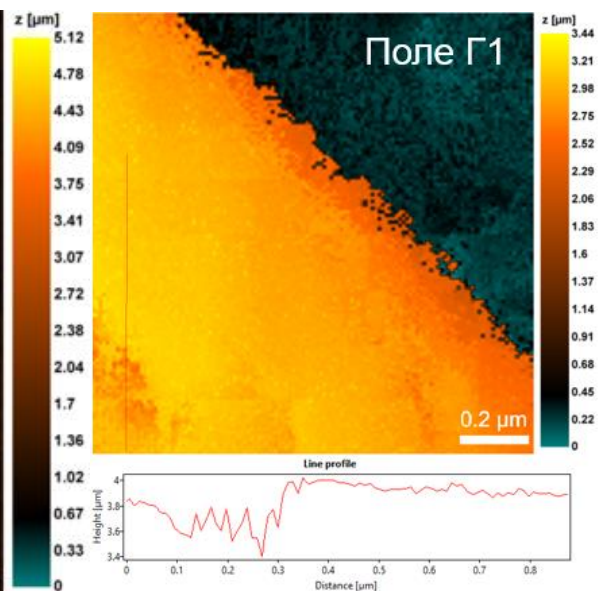
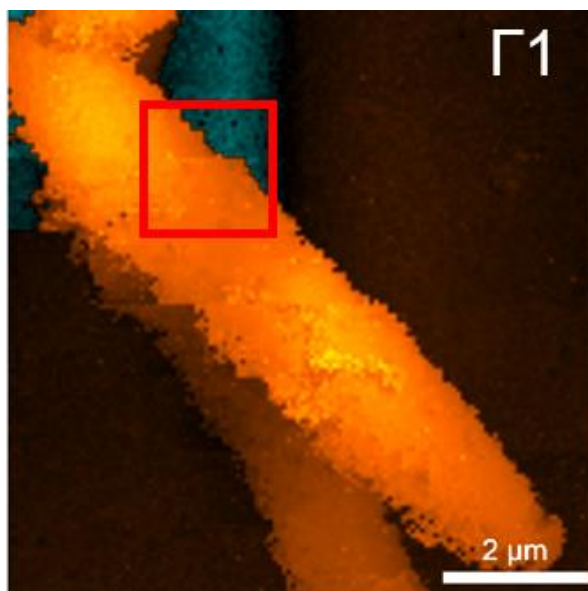


Рисунок Д.5

Приложение Д6. Снимки *C. parapsilosis* ATCC 22019 с добавлением L-274 при суточной инкубации с концентрацией в (А) 1 мкг/мл; (Б) 5 мкг/мл; (В) 10 мкг/мл (Б) 20 мкг/мл; (Б) 40 мкг/мл на рисунке Д.6.







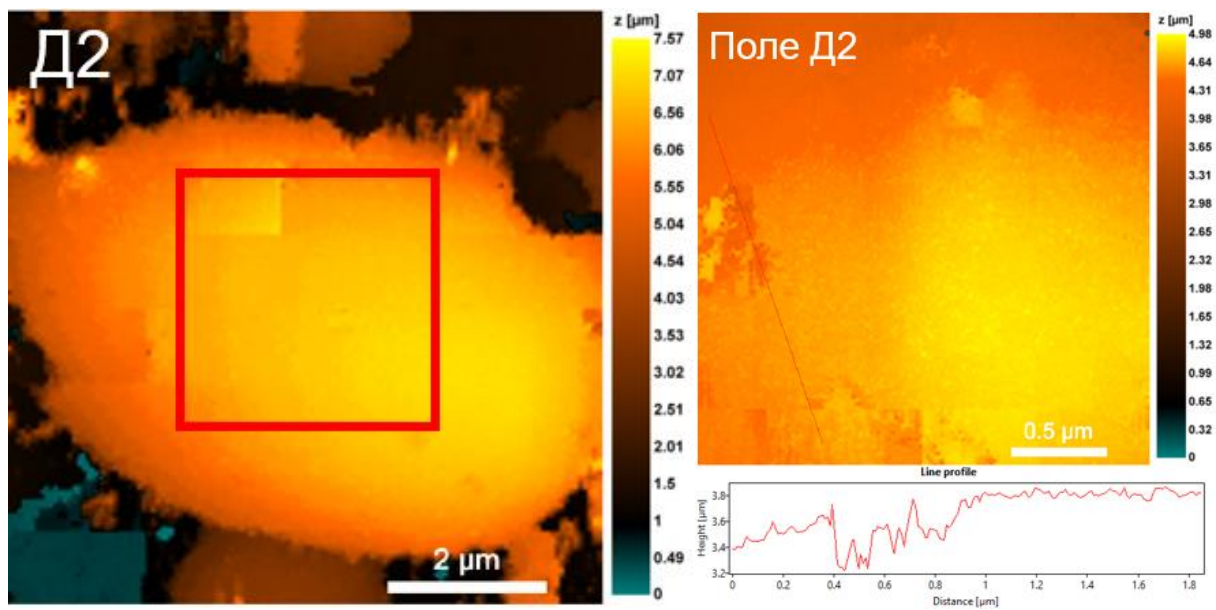
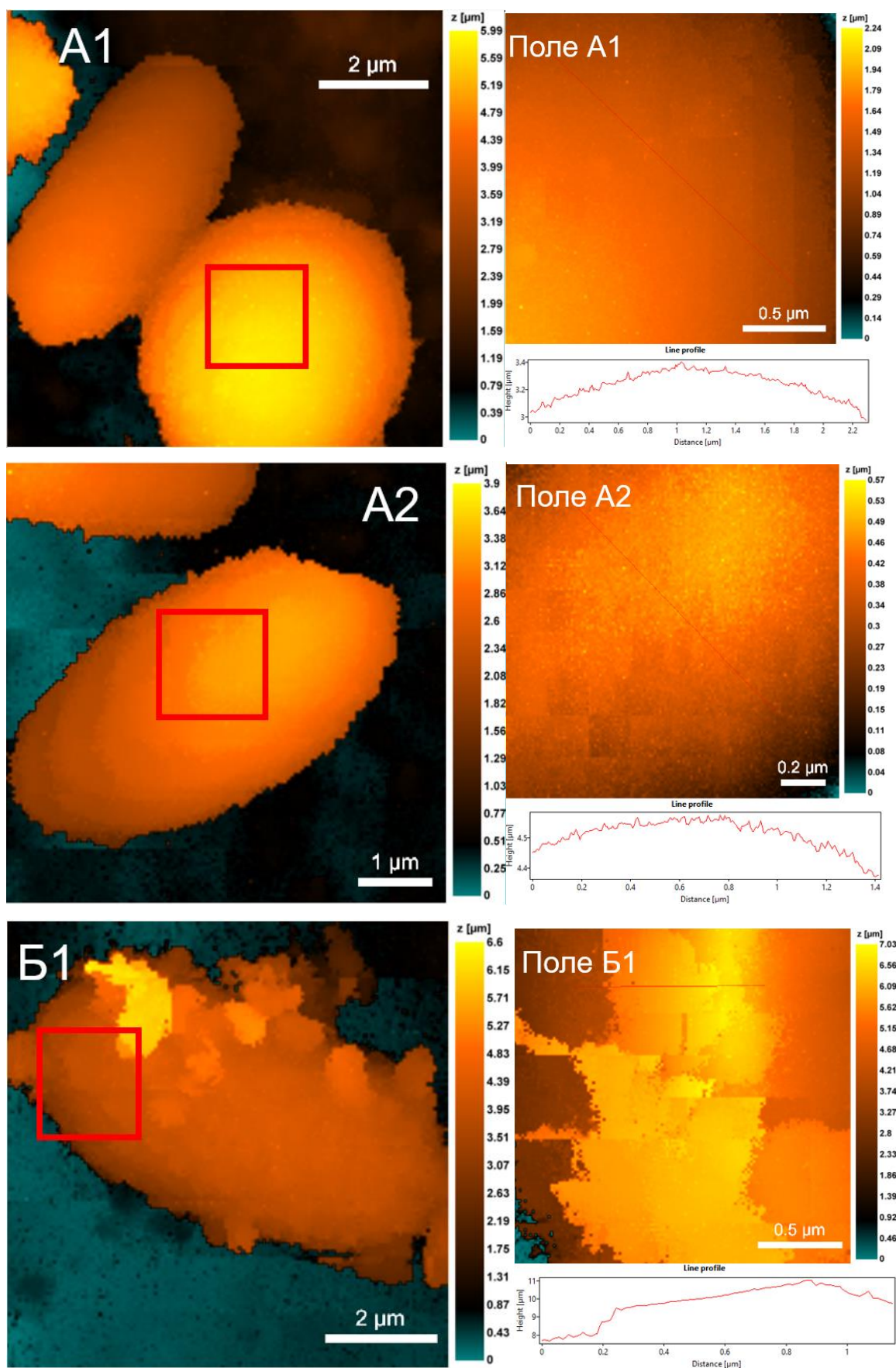
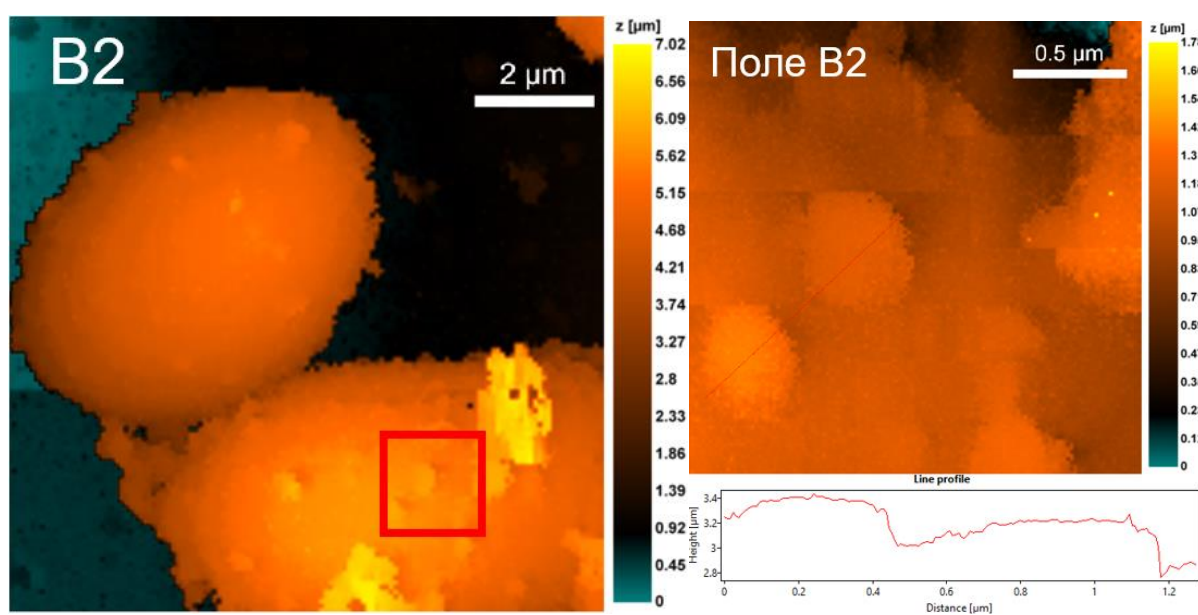
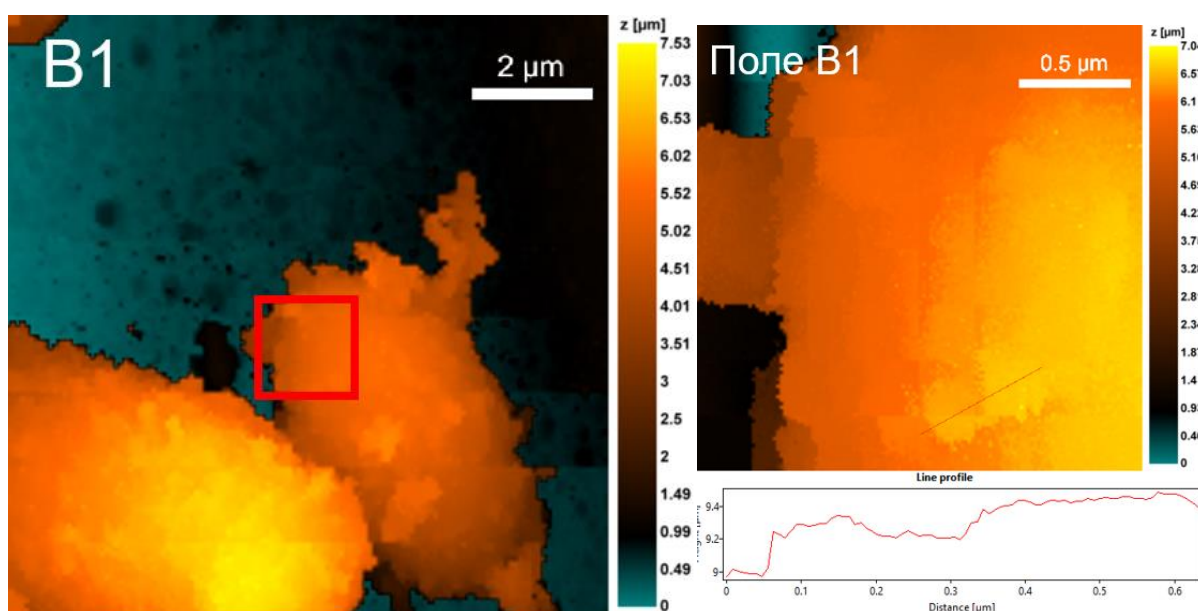
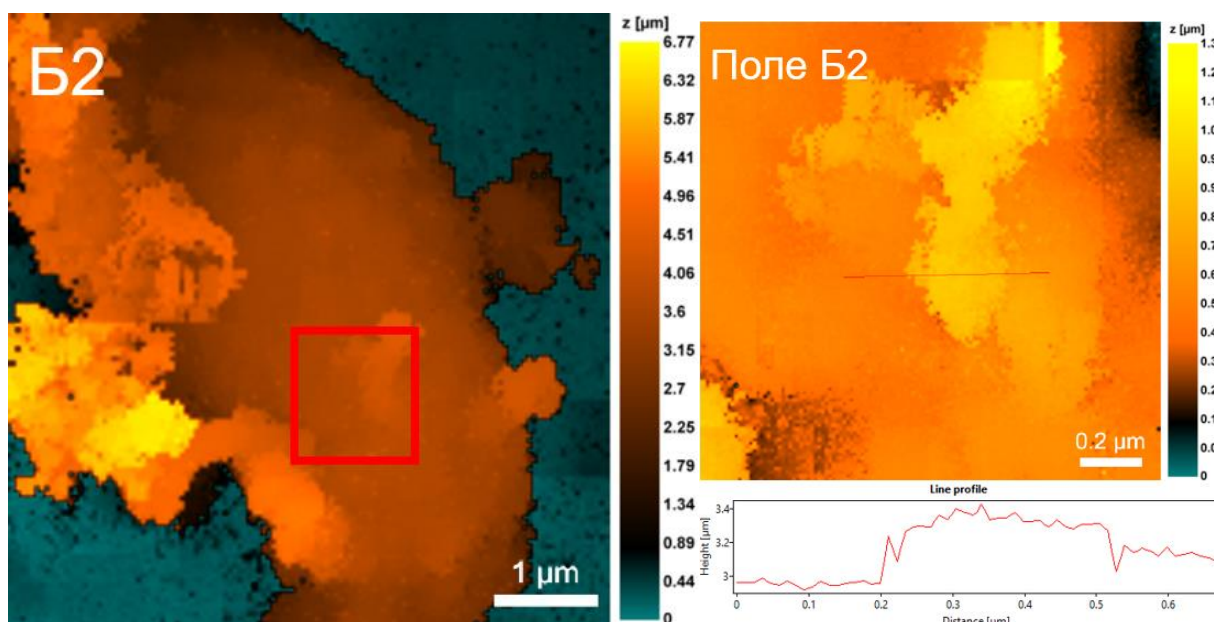
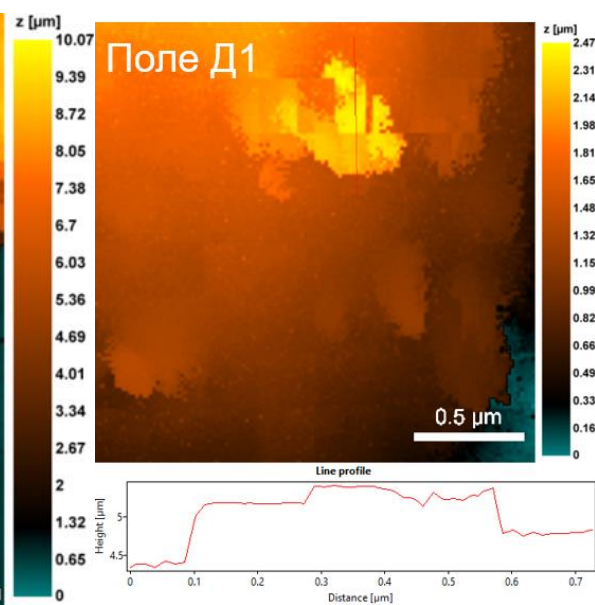
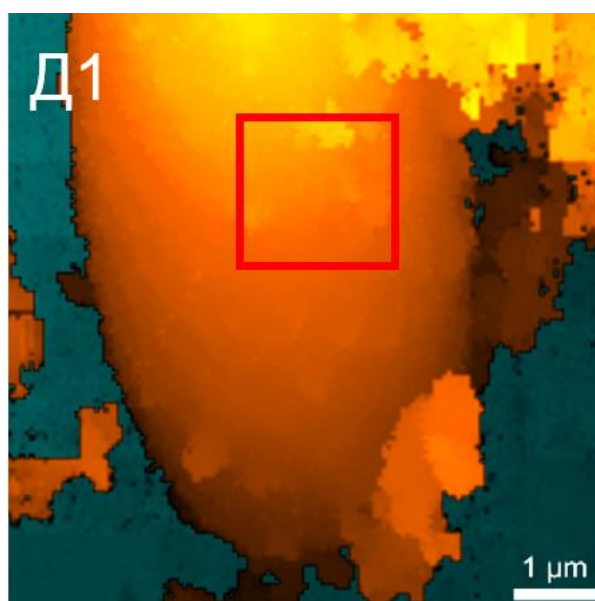
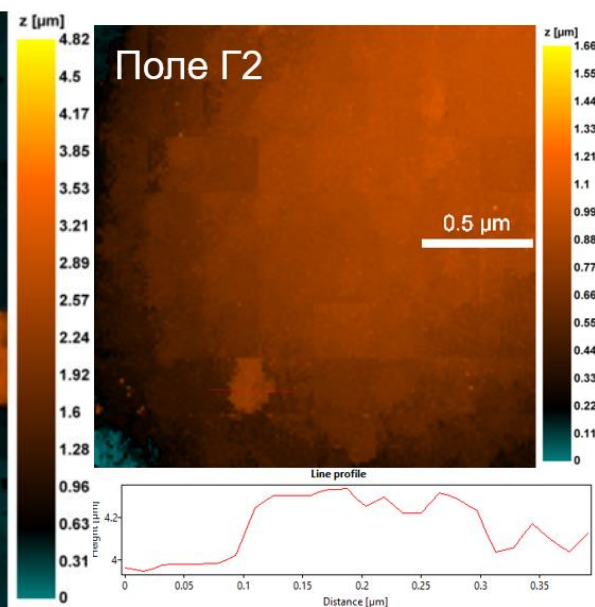
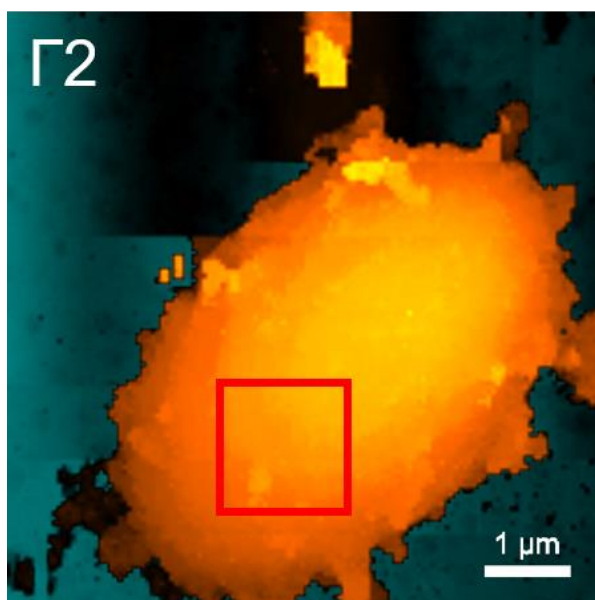
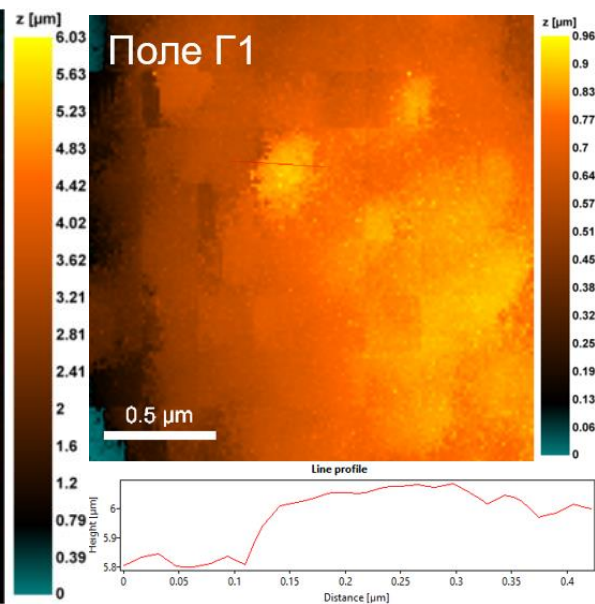
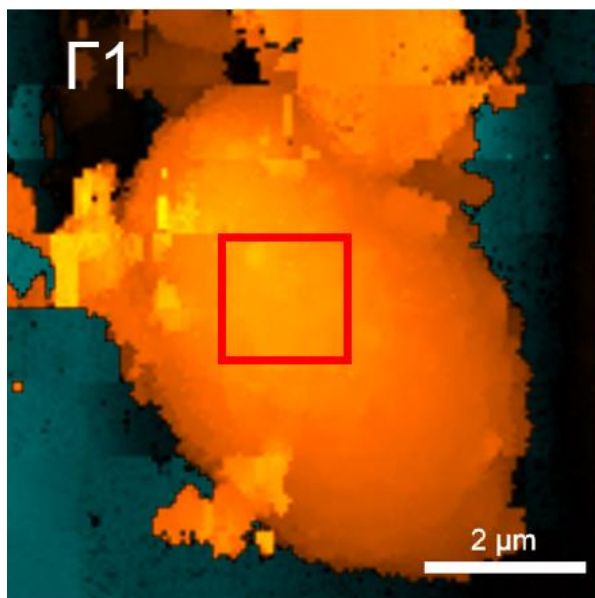


Рисунок Д.6

Приложение Д7. Снимки *C. krusei* 432М с добавлением L-274 при суточной инкубации с концентрацией в (А) 1 мкг/мл; (Б) 5 мкг/мл; (В) 10 мкг/мл (Б) 20 мкг/мл; (Б) 40 мкг/мл на рисунке Д.7.







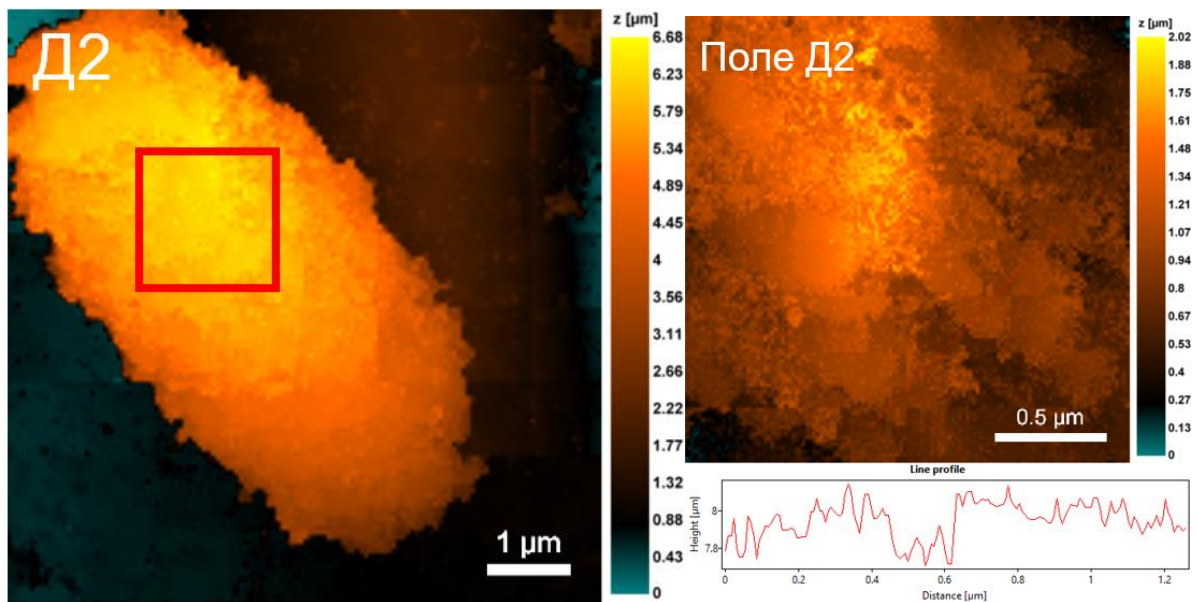
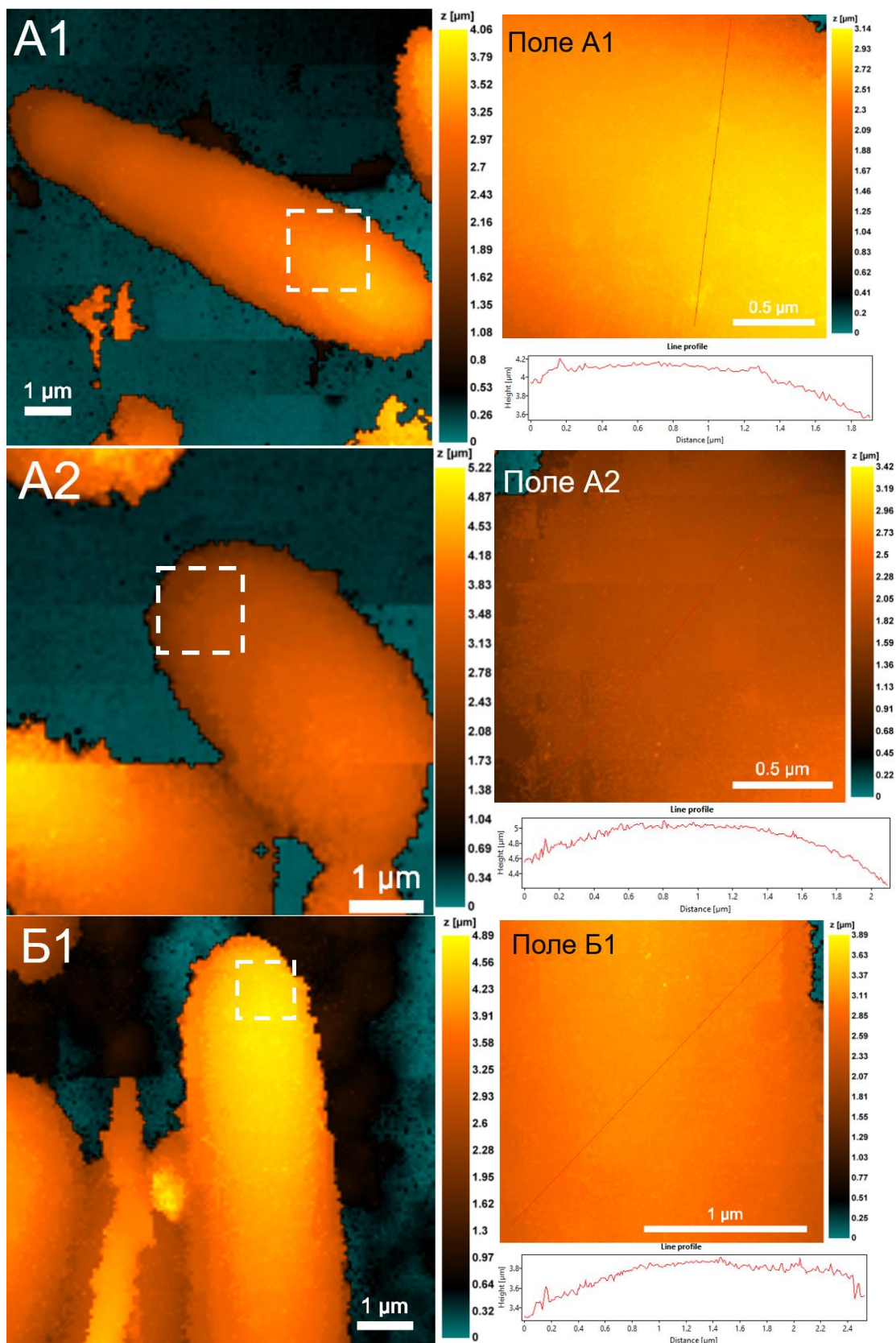
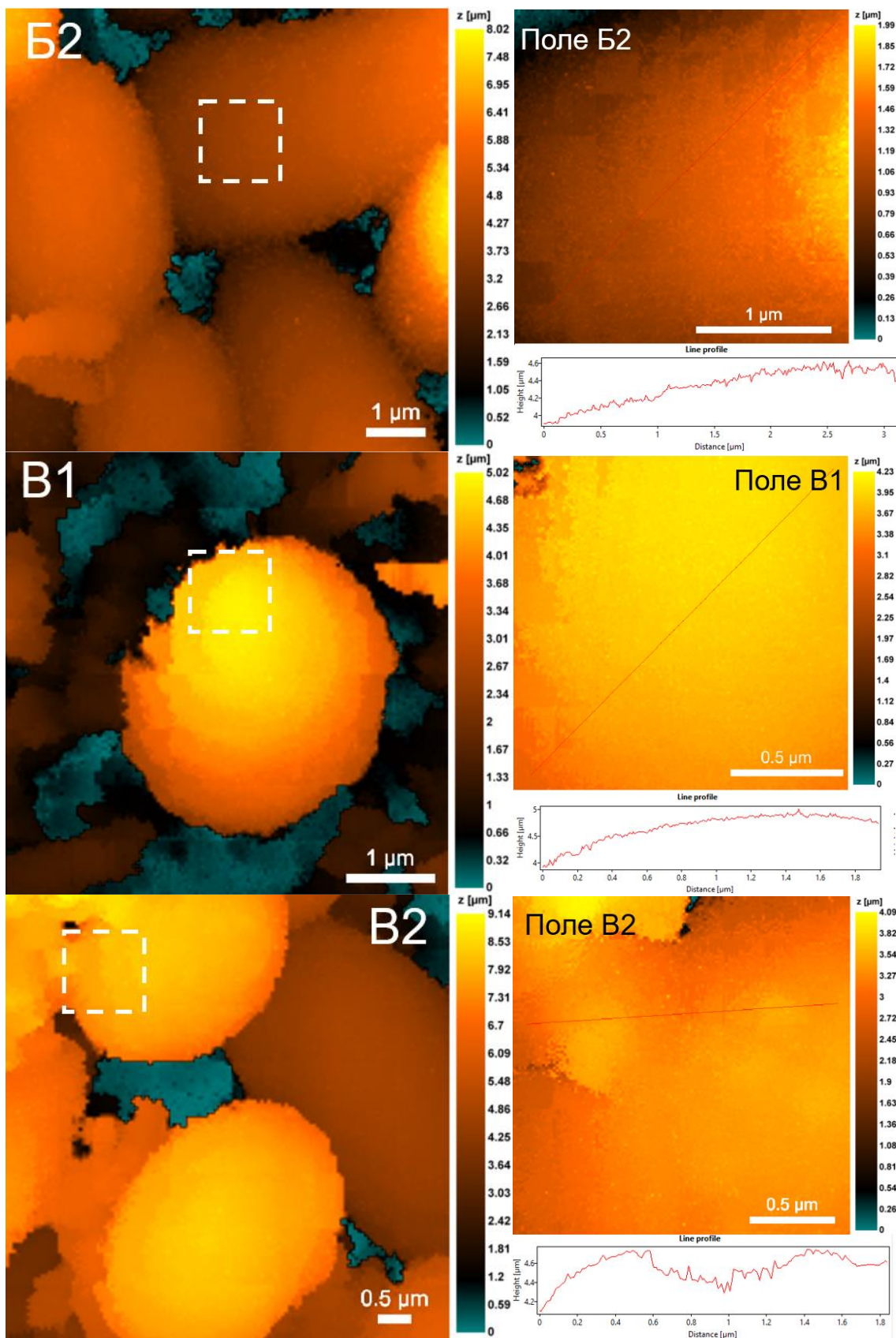
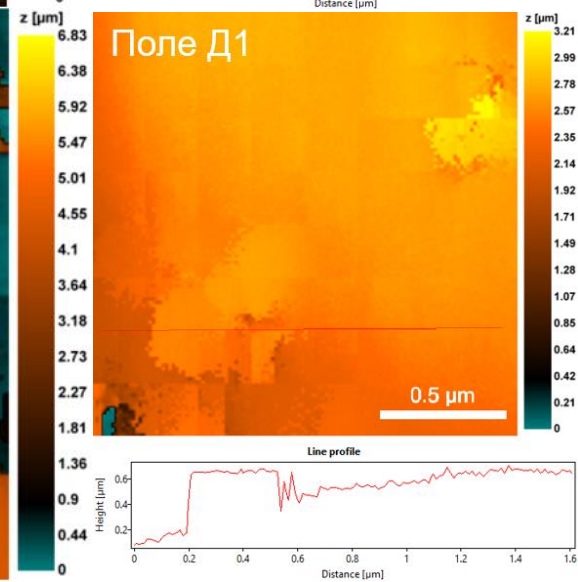
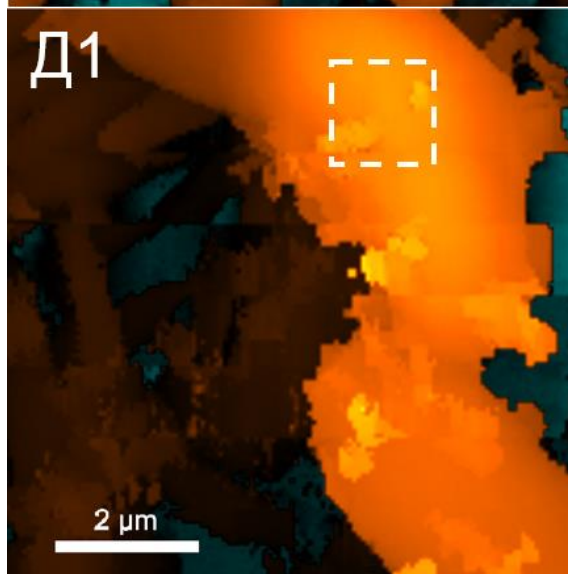
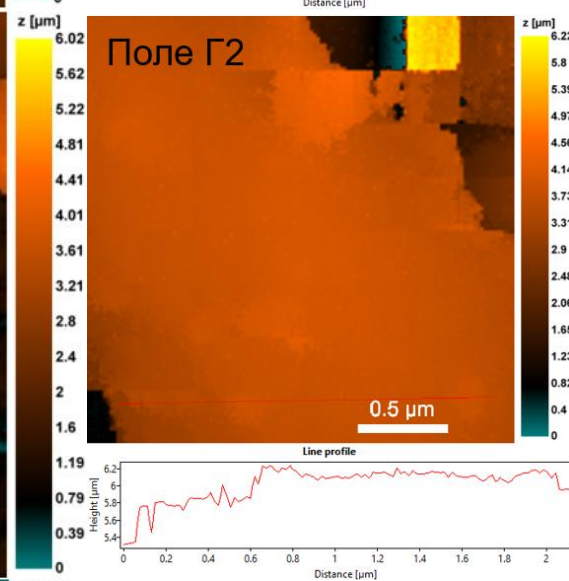
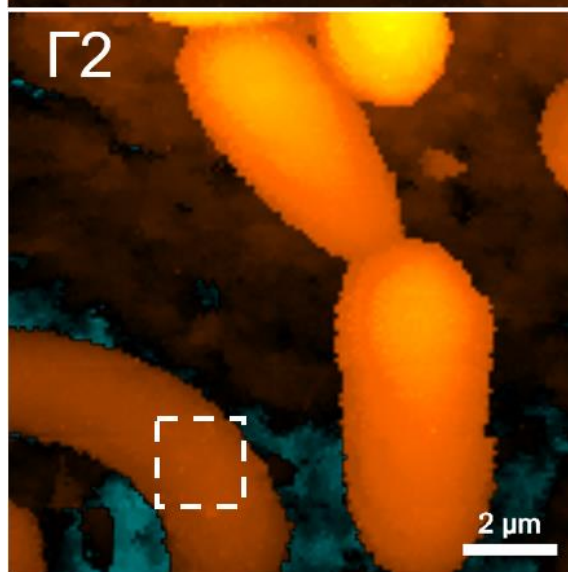
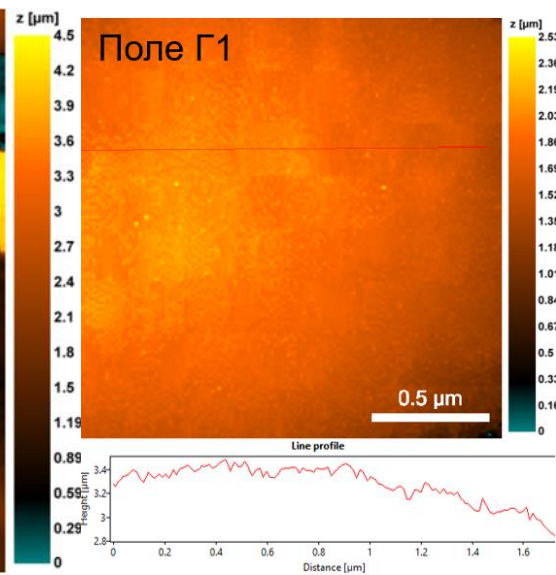
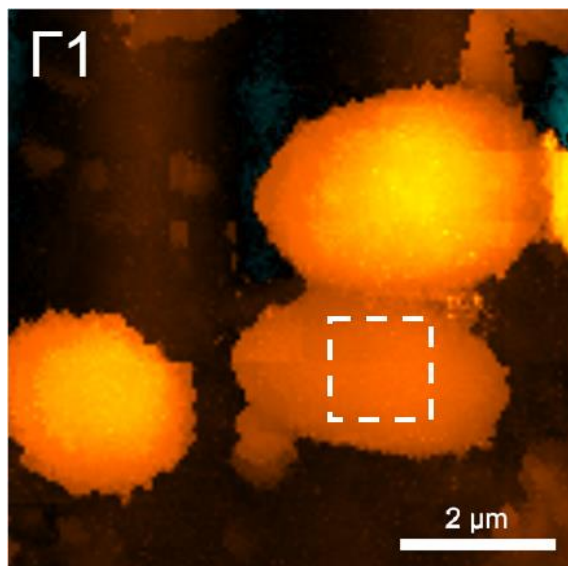


Рисунок Д.7

Приложение Д8. Снимки *C. parapsilosis* ATCC 22019 с добавлением L-98R при суточной инкубации с концентрацией в (А) 1 мкг/мл; (Б) 5 мкг/мл; (В) 10 мкг/мл (Б) 20 мкг/мл; (Б) 40 мкг/мл на рисунке Д.8.







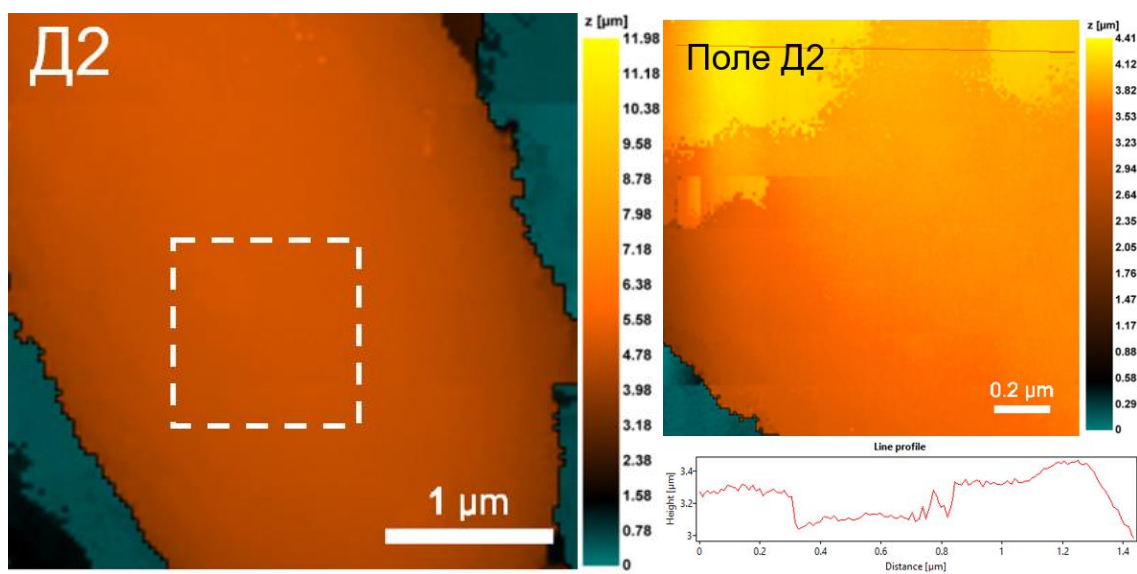
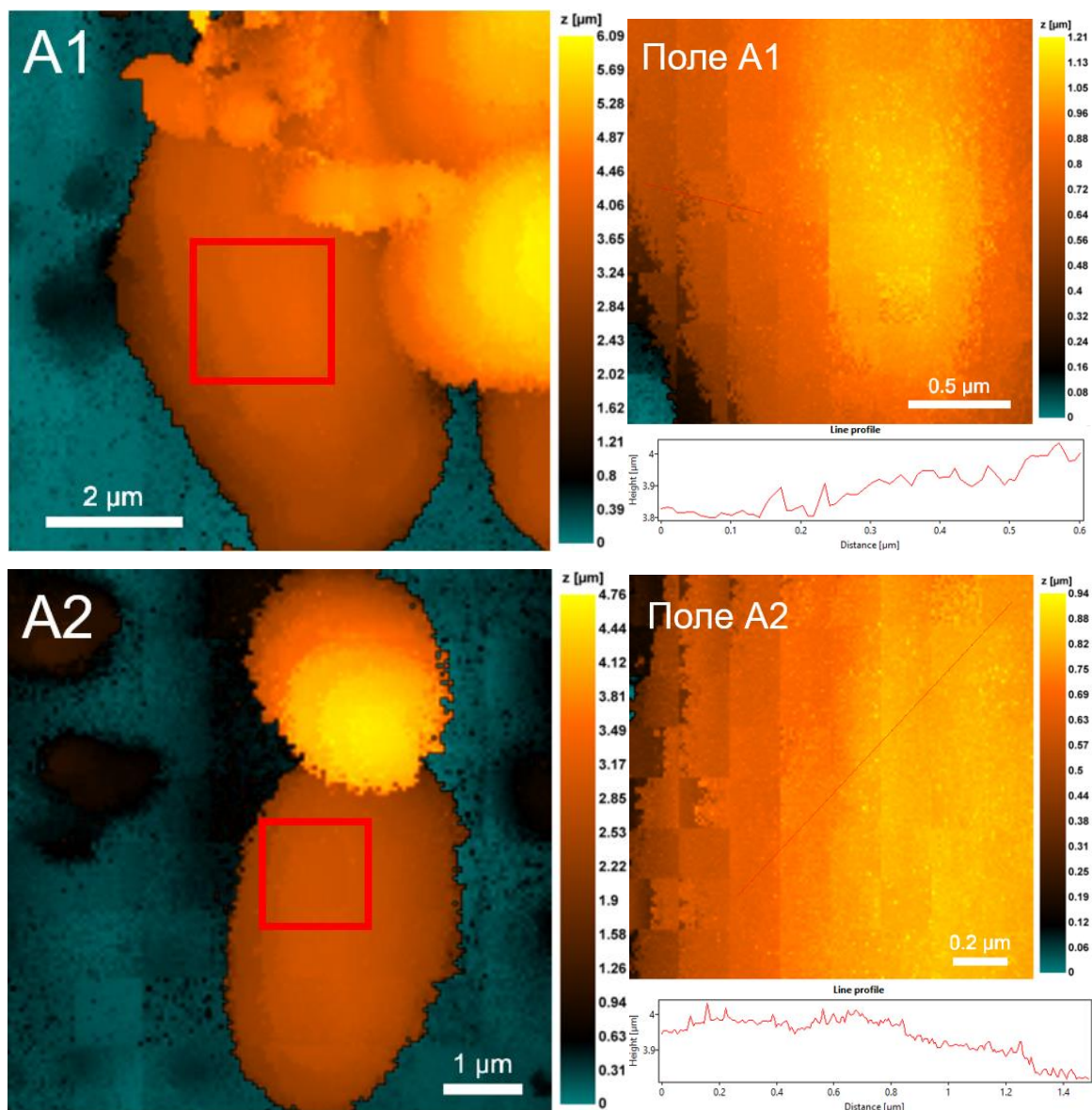
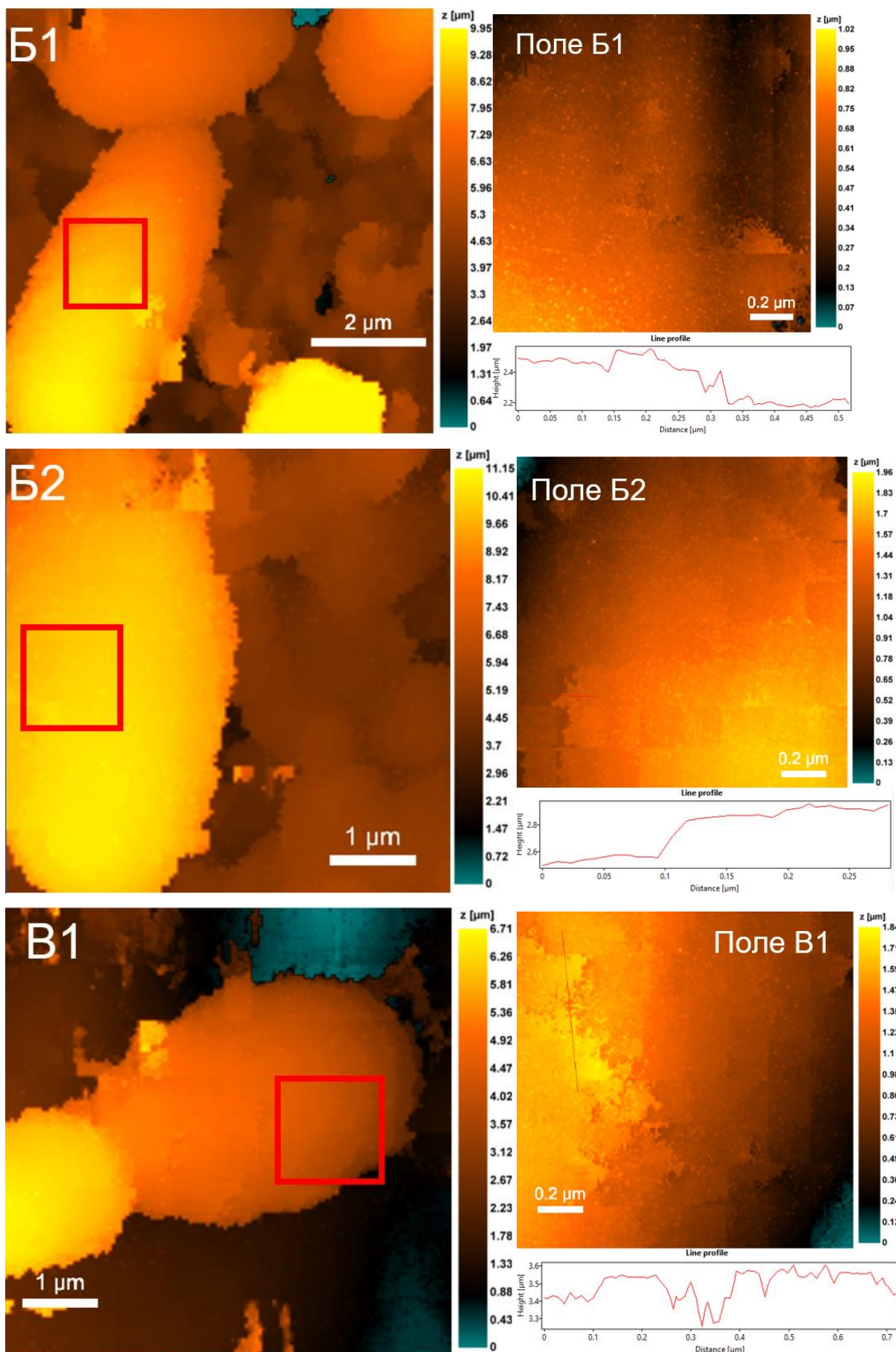
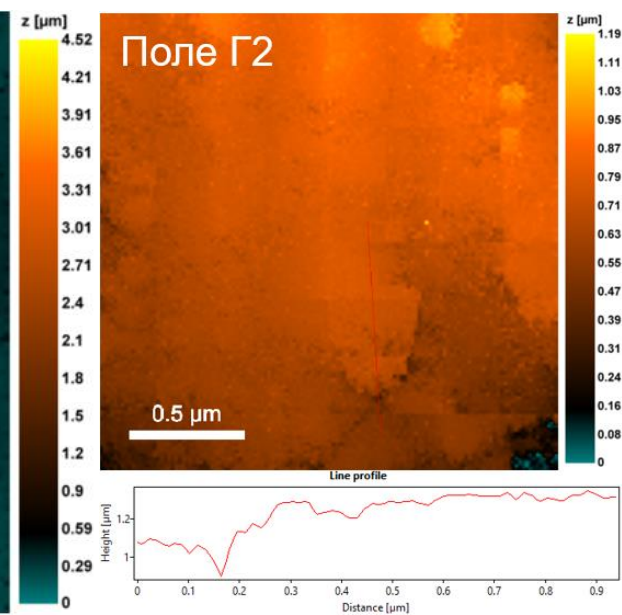
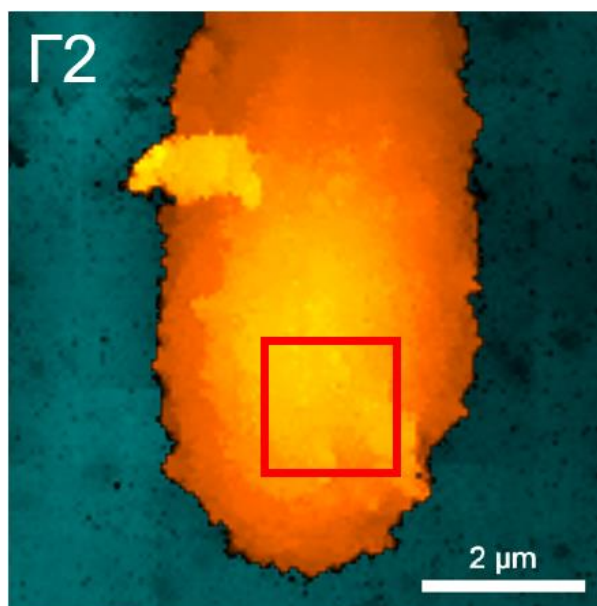
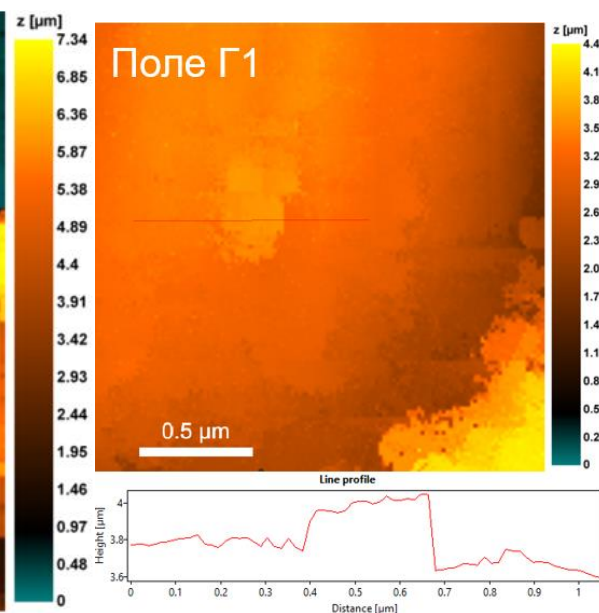
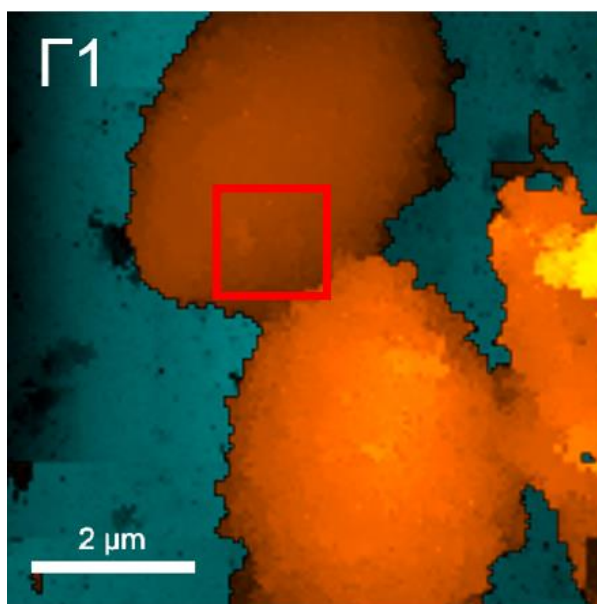
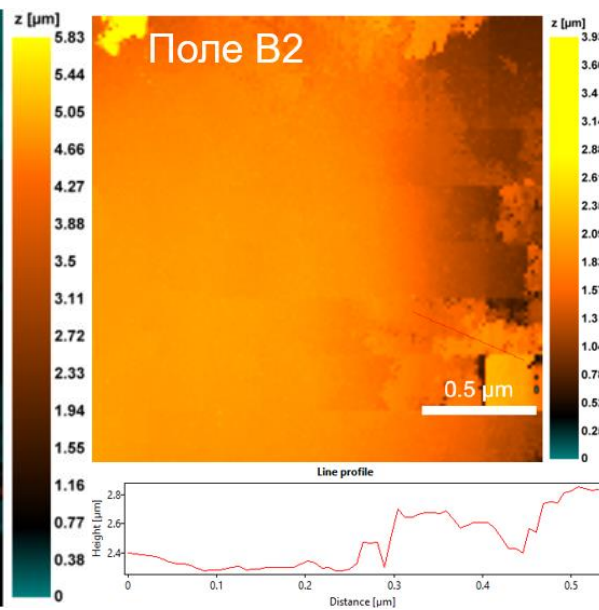
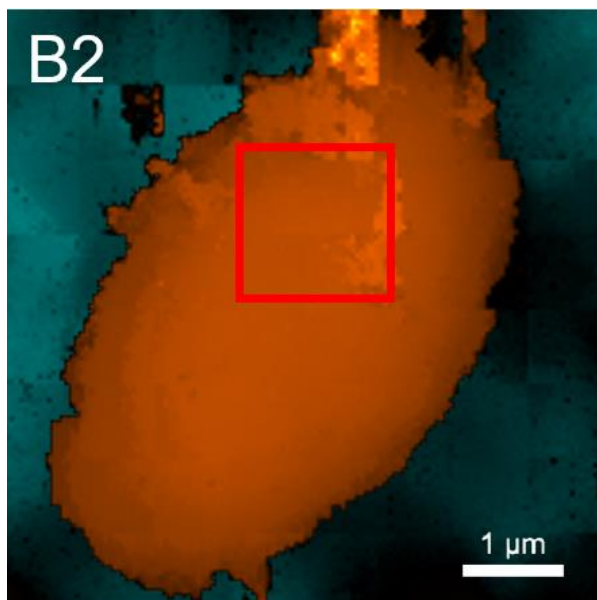


Рисунок Д.8

Приложение Д9. Снимки *C. krusei* 432М с добавлением L-98R при суточной инкубации с концентрацией в (А) 1 мкг/мл; (Б) 5 мкг/мл; (В) 10 мкг/мл (Б) 20 мкг/мл; (Б) 40 мкг/мл на рисунке Д.9.







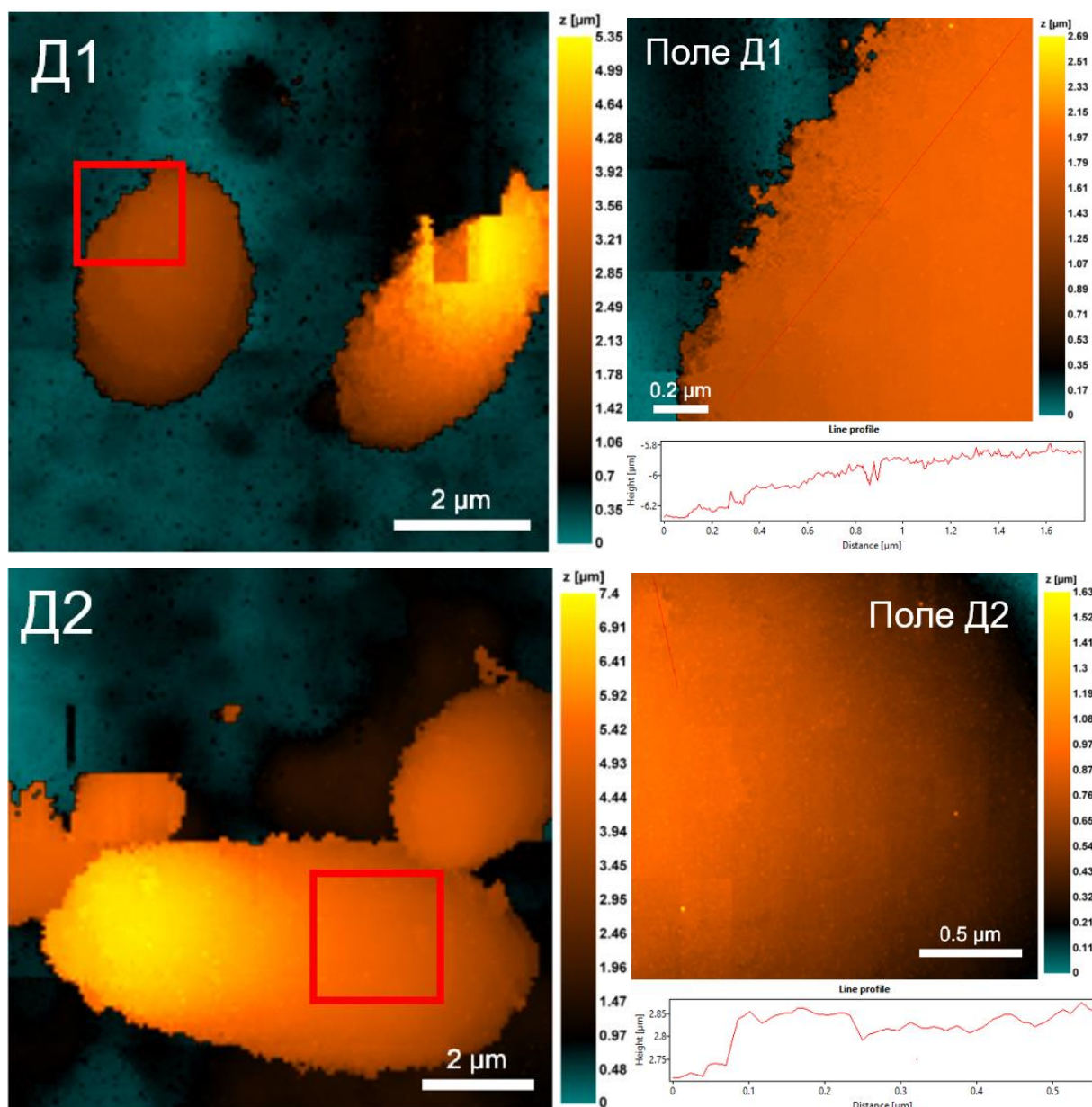
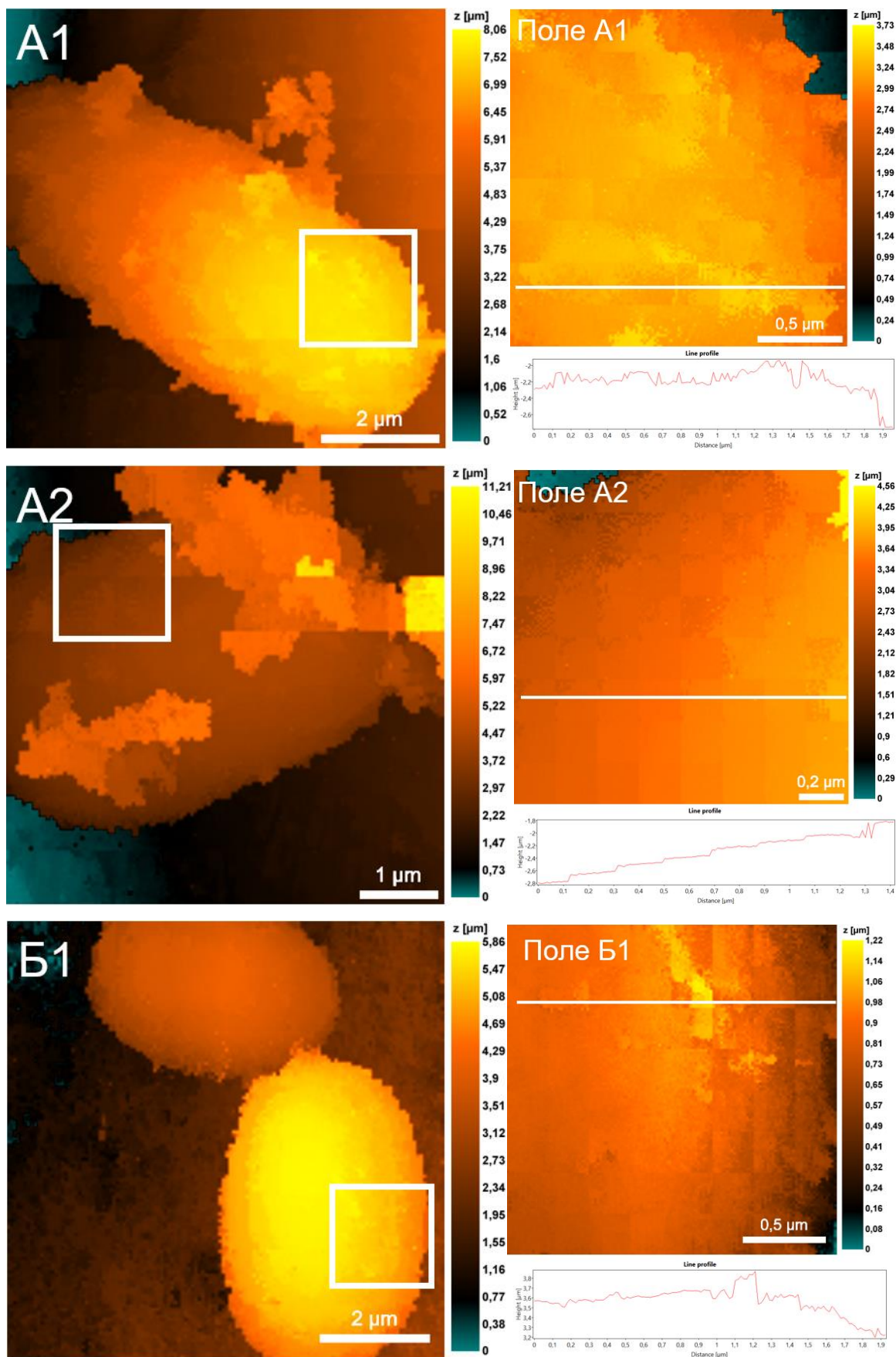
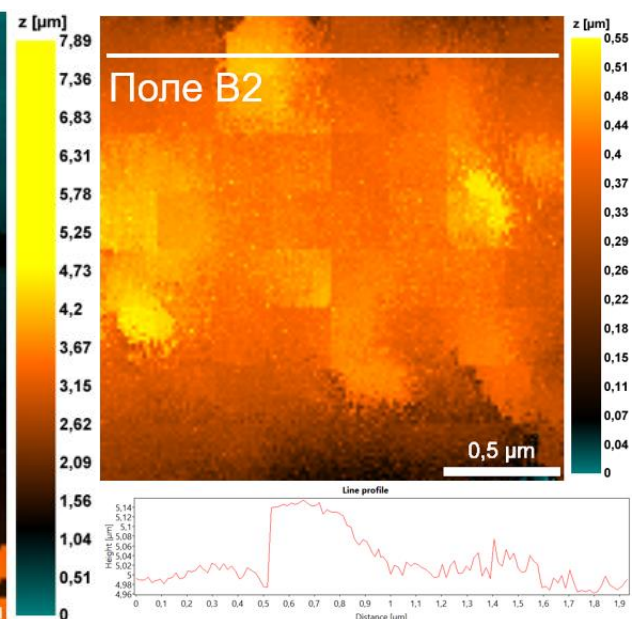
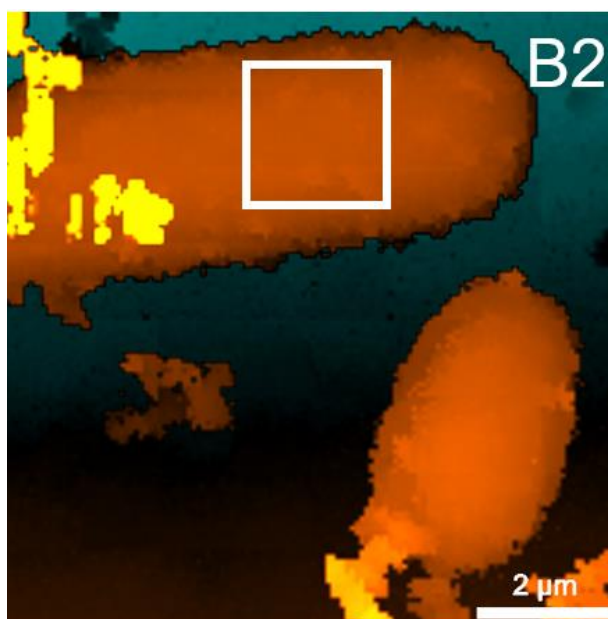
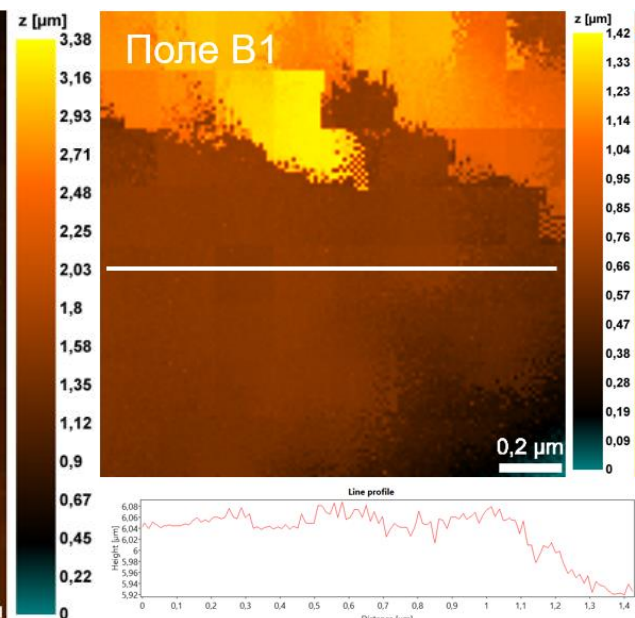
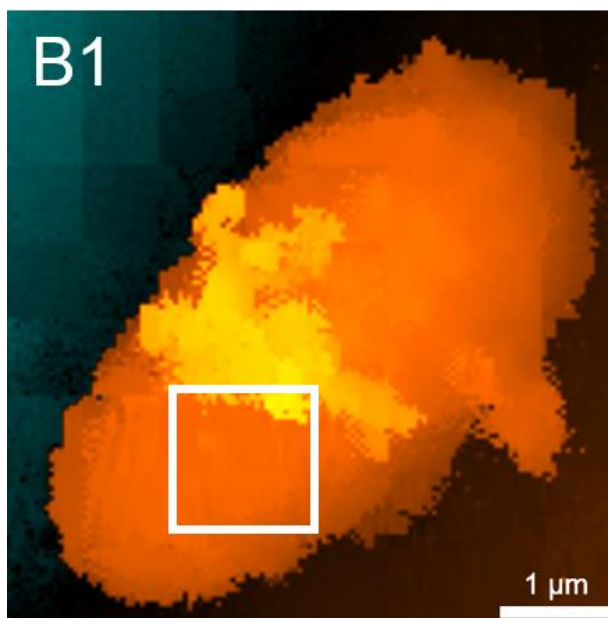
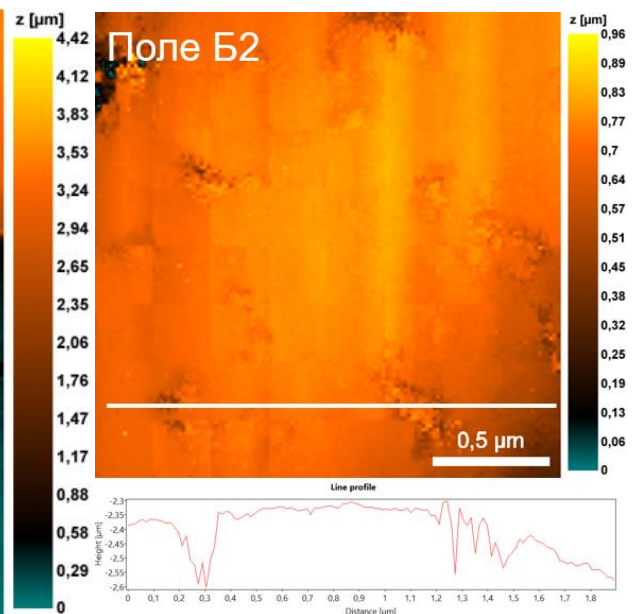
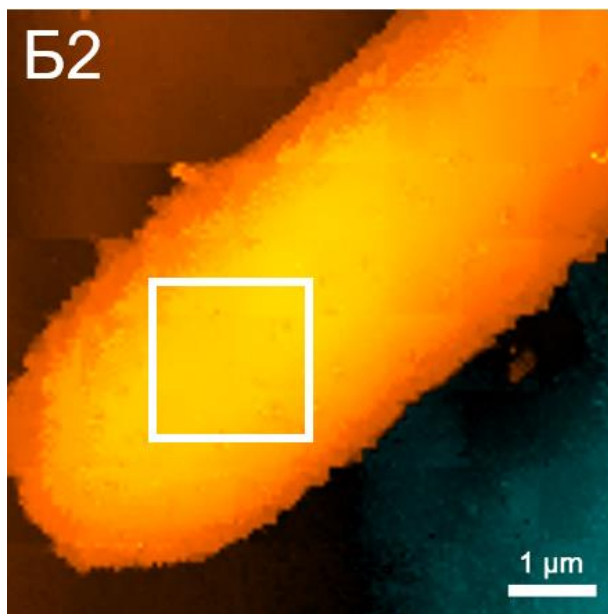
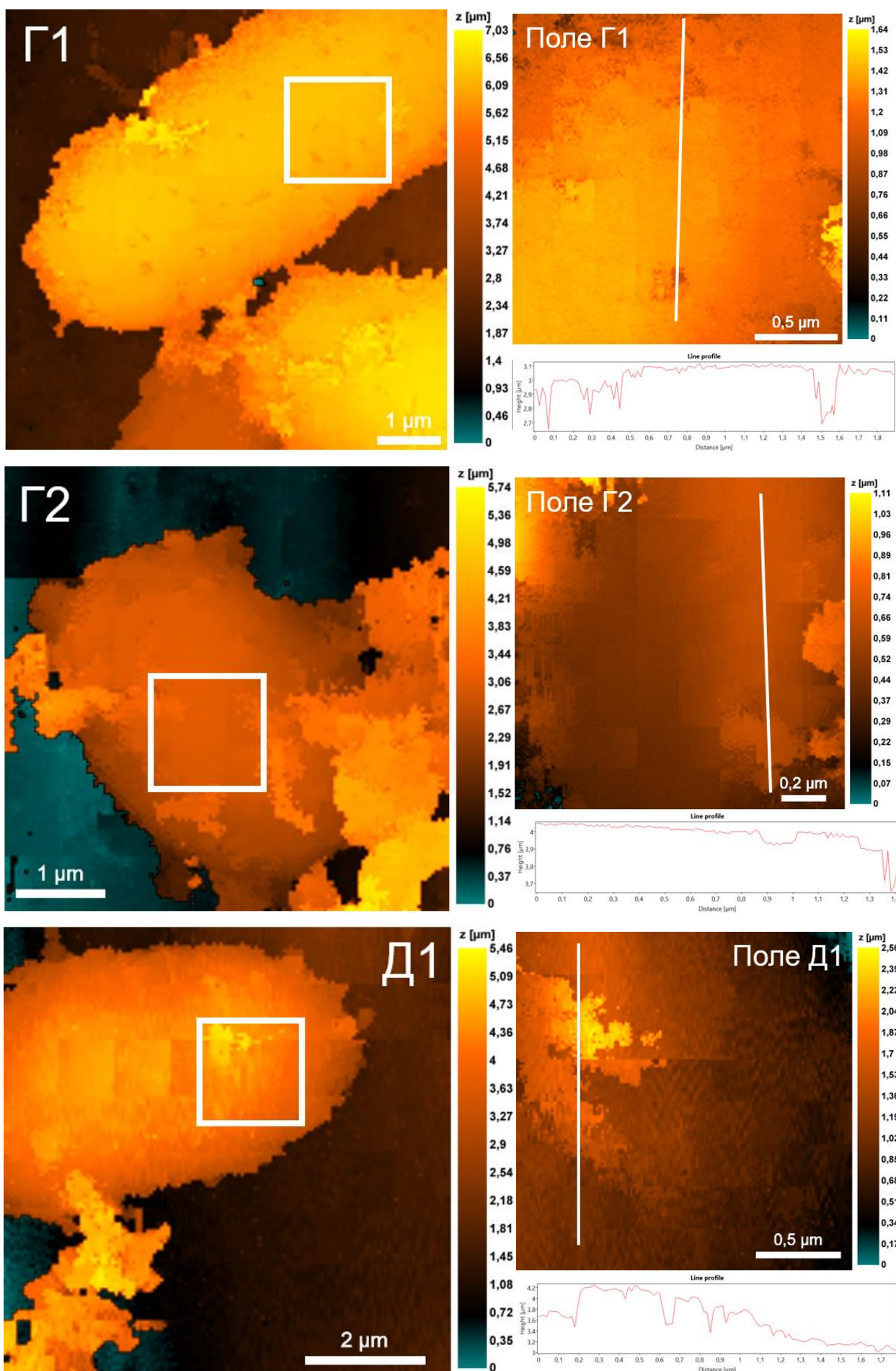


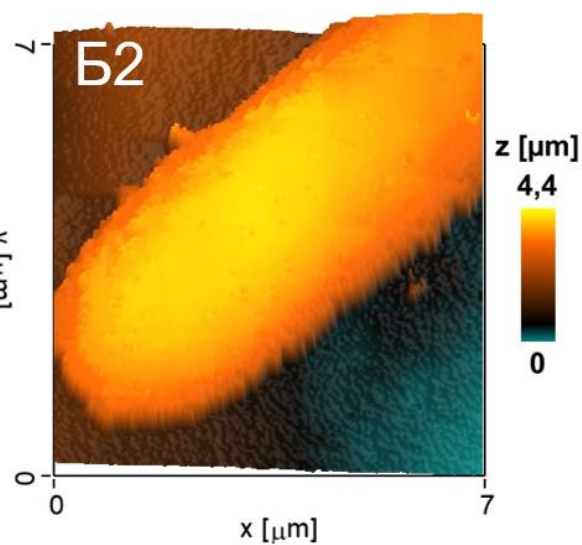
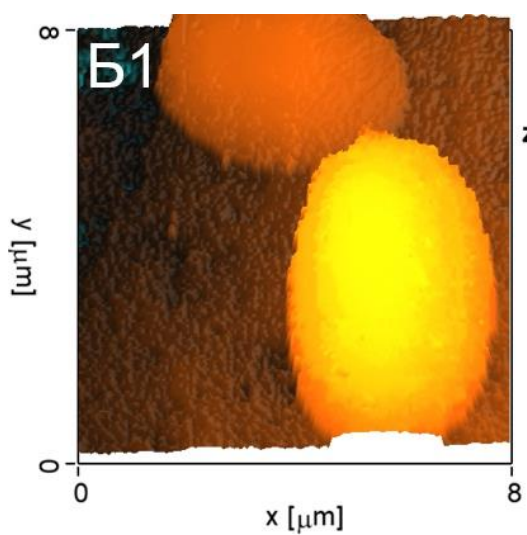
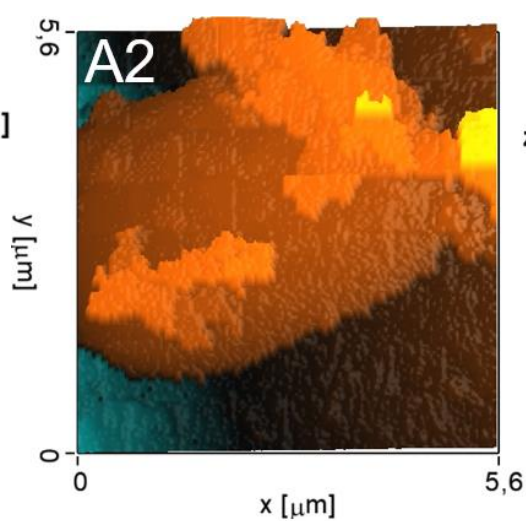
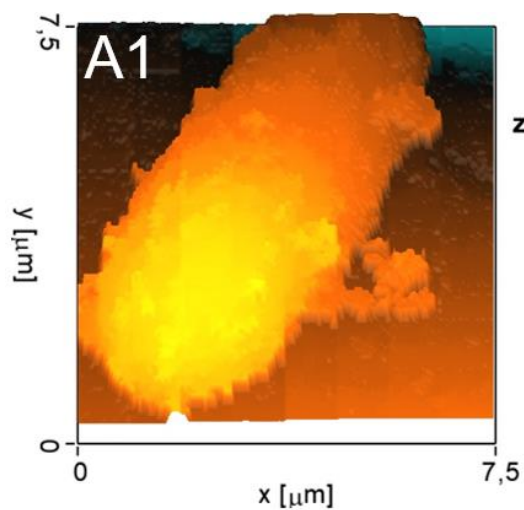
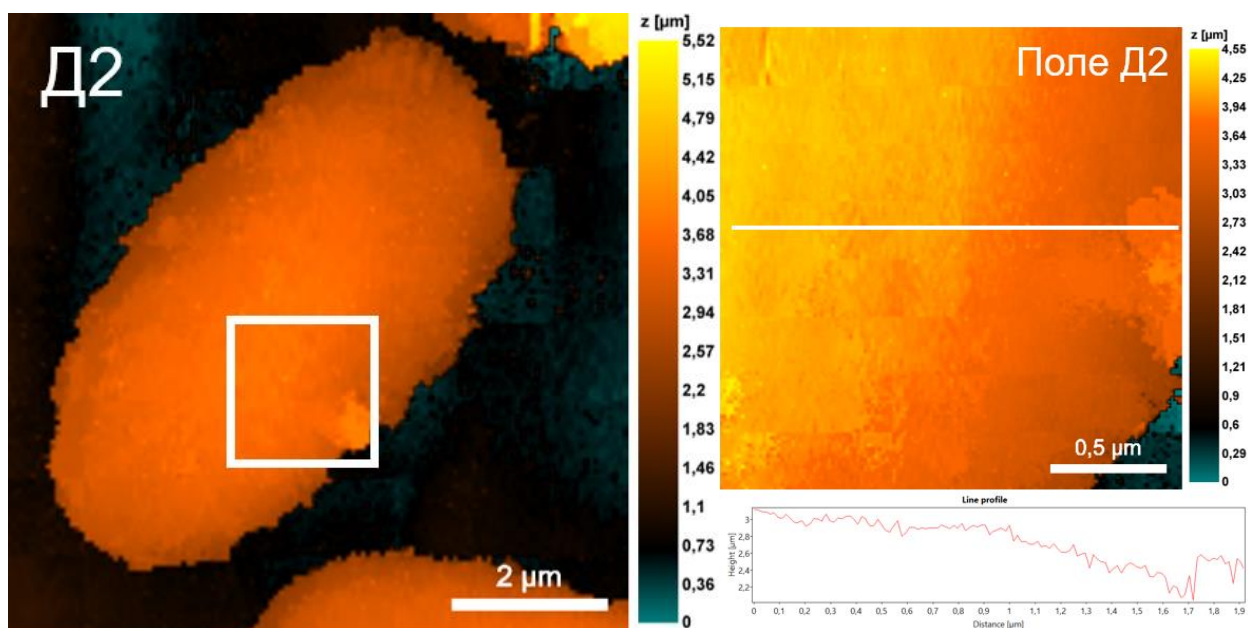
Рисунок Д.9

Приложение Д10. Снимки *C. parapsilosis* ATCC 22019 с добавлением дифлуконазола при суточной инкубации с концентрацией в (А) 1 мкг/мл; (Б) 5 мкг/мл; (В) 10 мкг/мл (Б) 20 мкг/мл; (Б) 40 мкг/мл на рисунке Д.10.









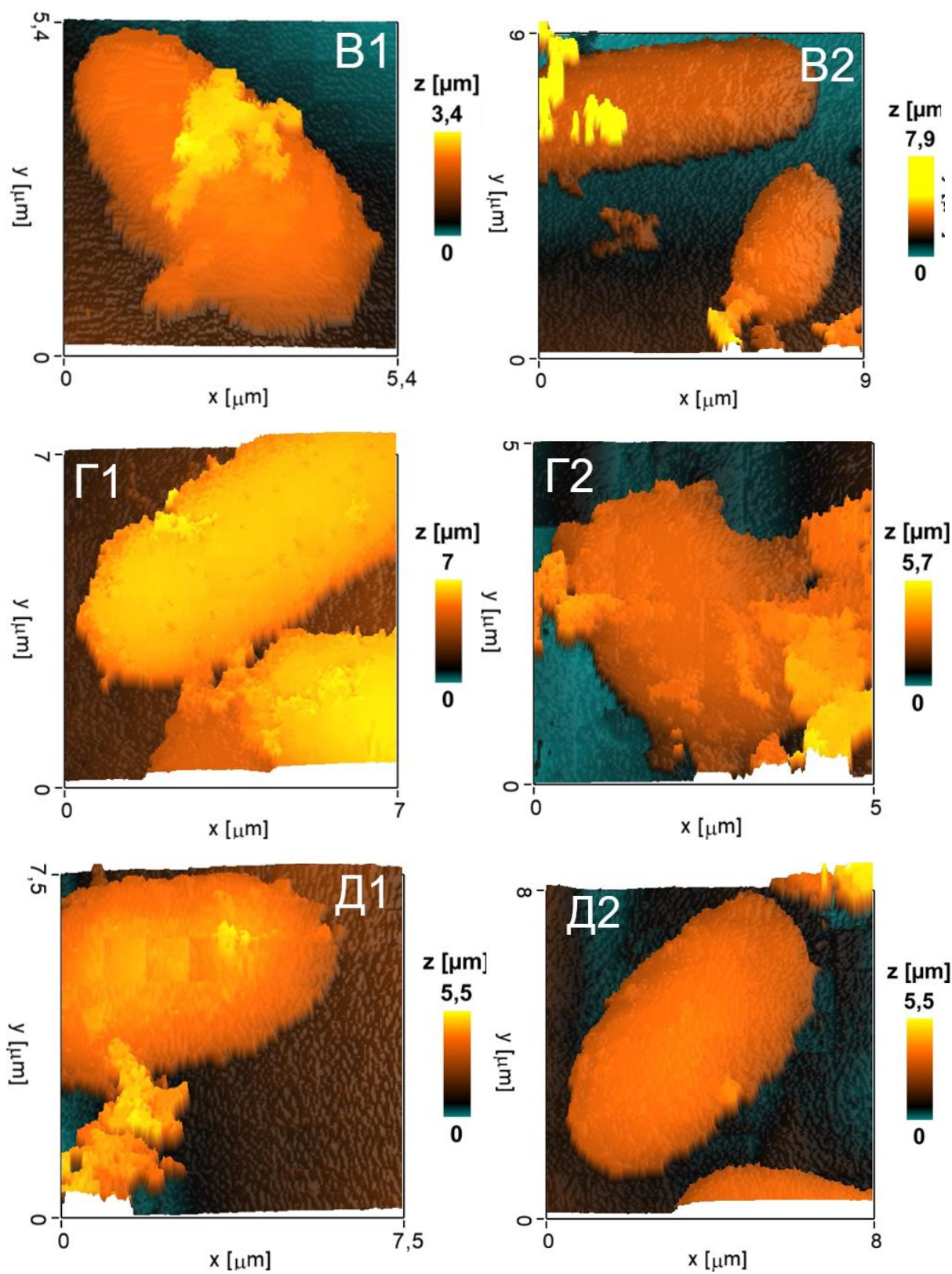
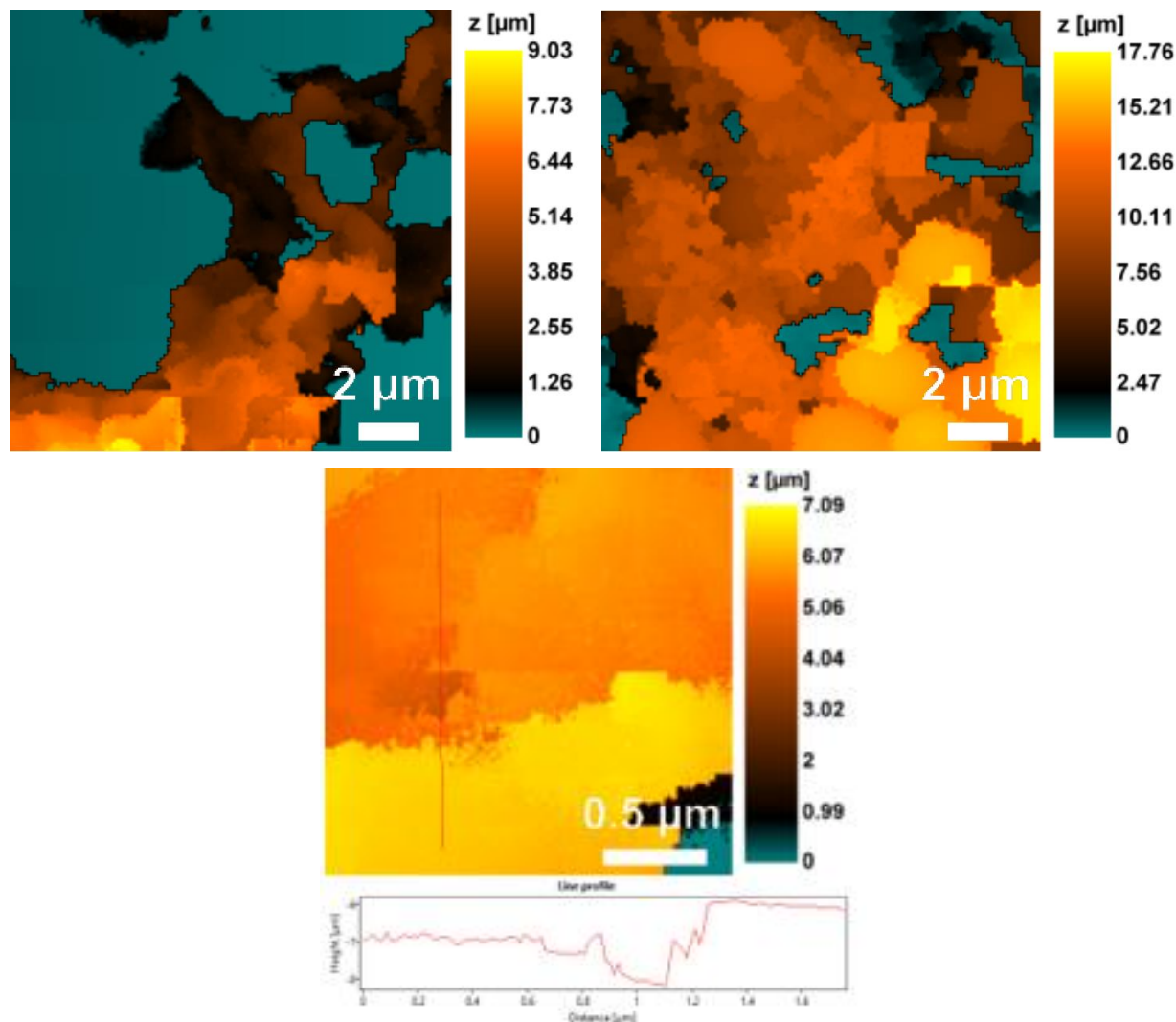


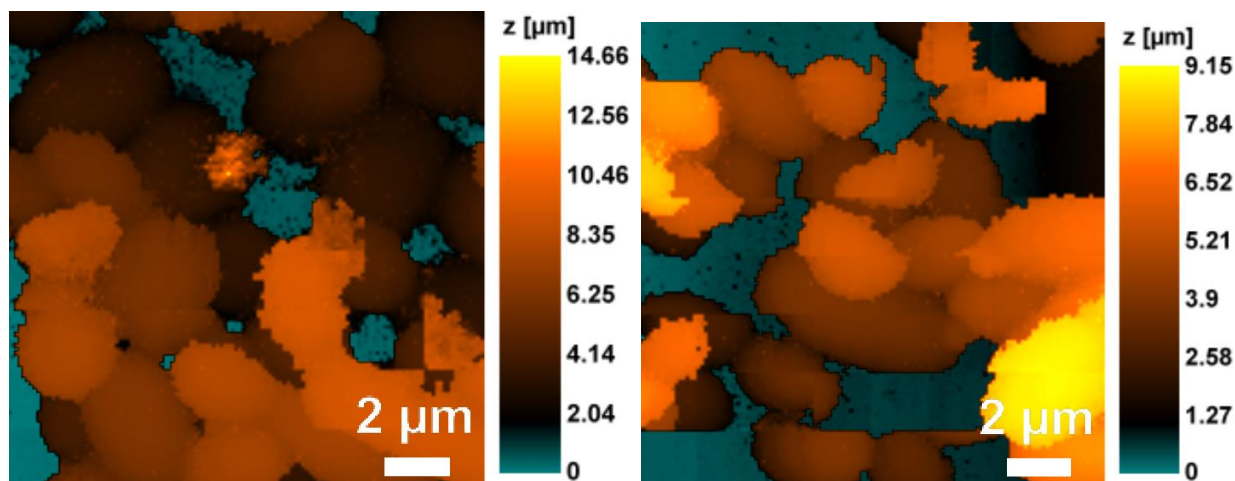
Рисунок Д.10

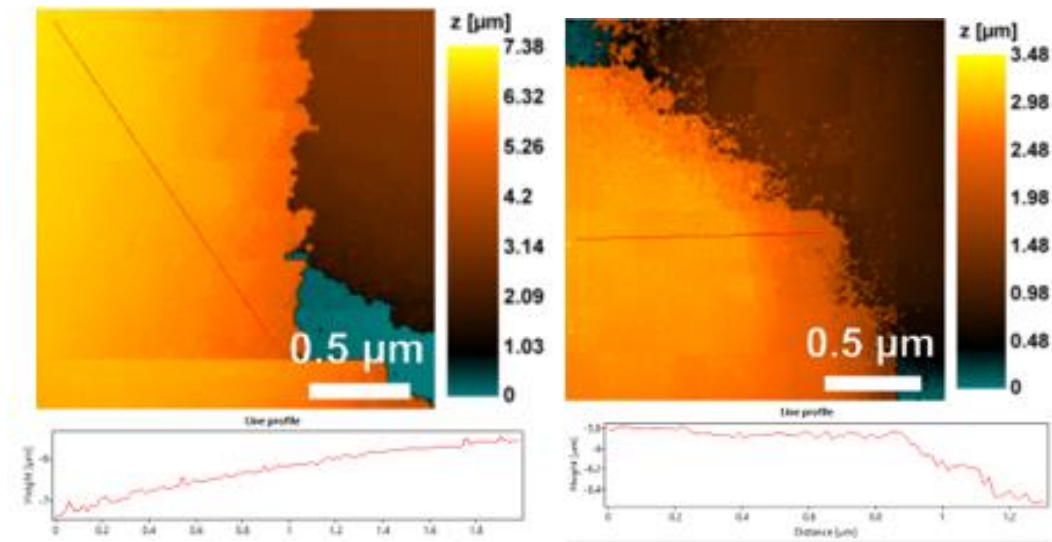
Приложение Д11. Снимки *C. parapsilosis* ATCC 22019 с добавлением L-173 при суточной инкубации с концентрацией в (А) 30 мкг/мл; (Б) 15 мкг/мл; (В) 10 мкг/мл (Г) 5 мкг/мл; (Д) 1 мкг/мл, (Е) 0,03 мкг/мл, (Ж) 0,01 мкг/мл на рисунке Д.11.

(А)

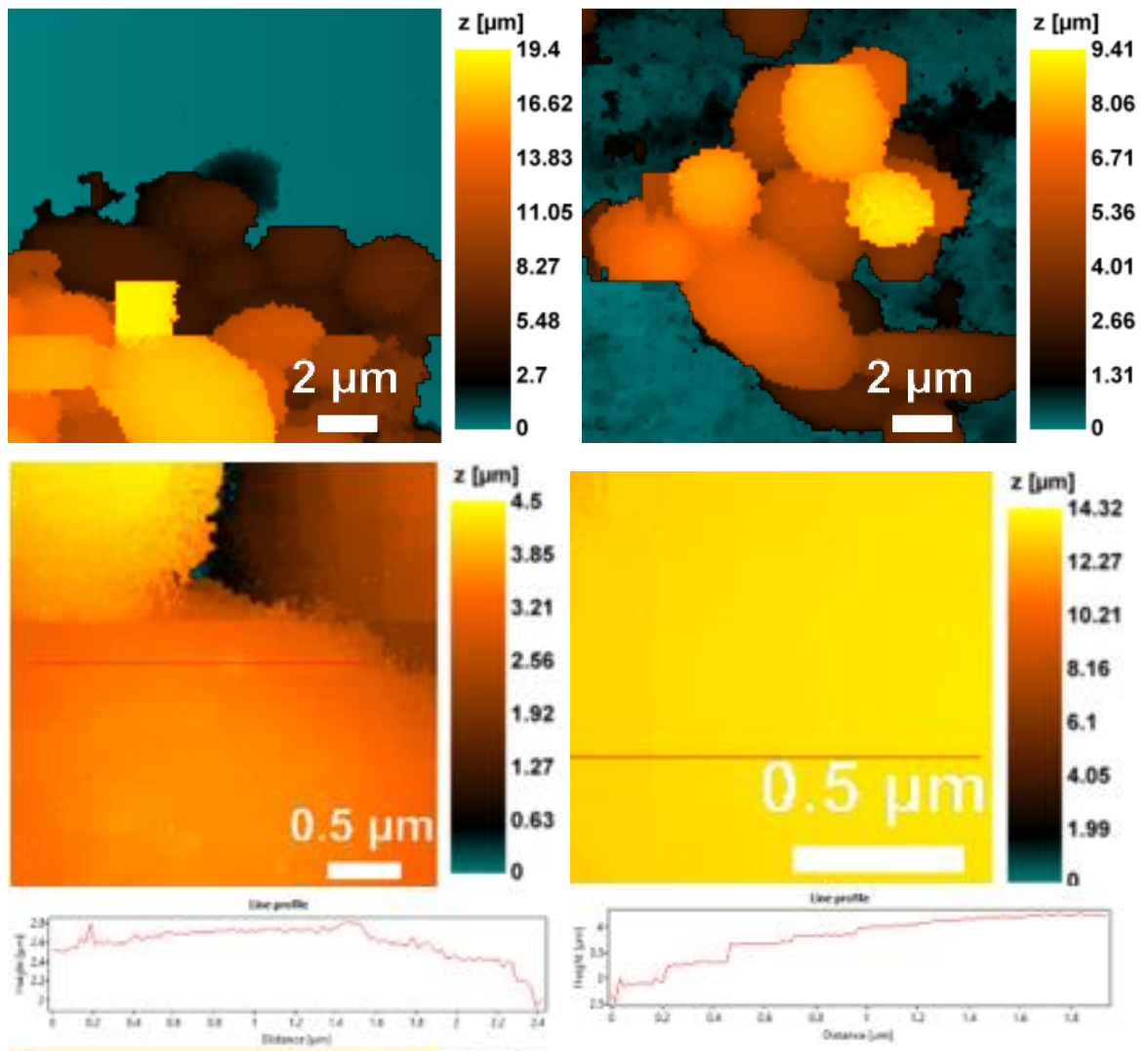


(Б)

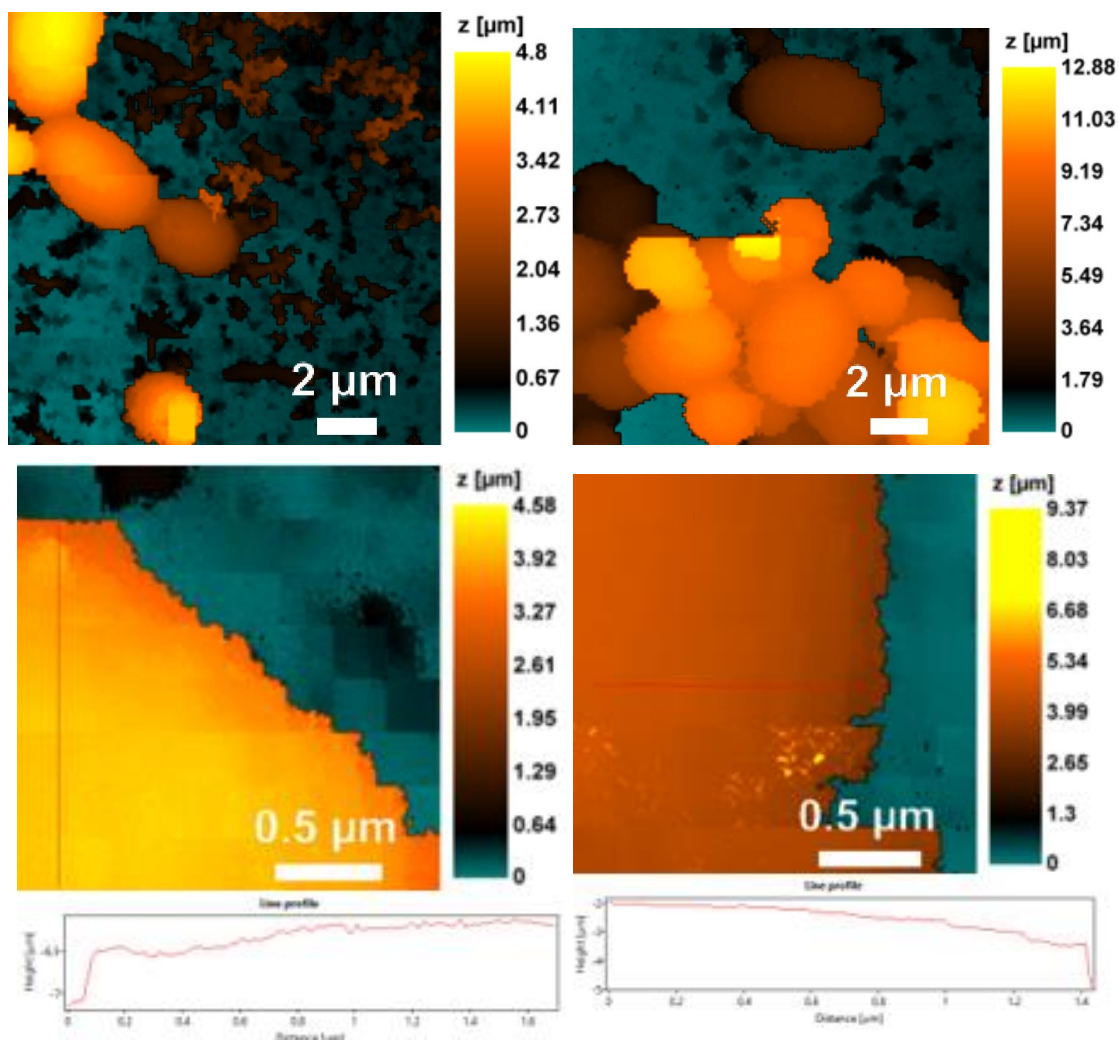




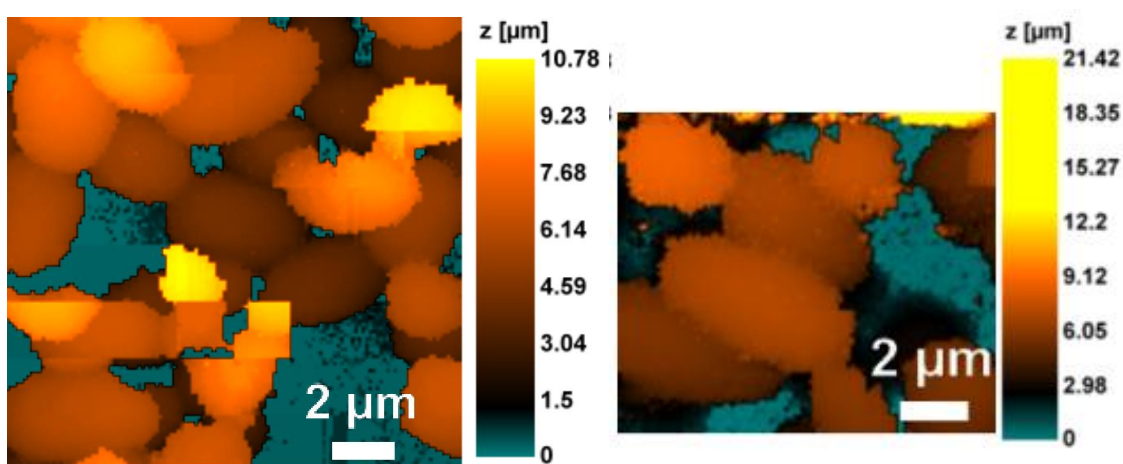
(B)

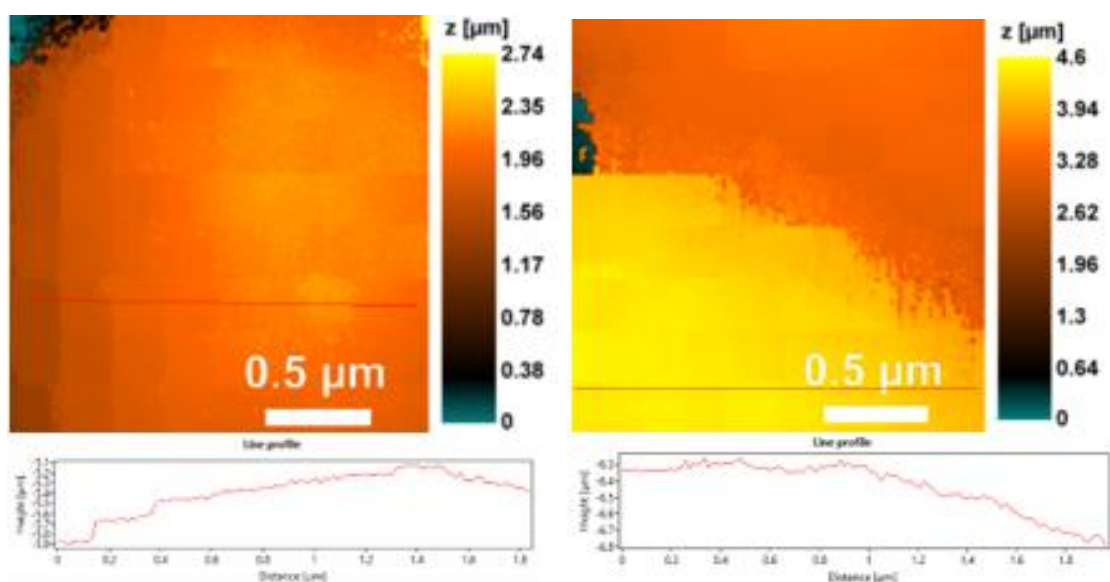


(Г)

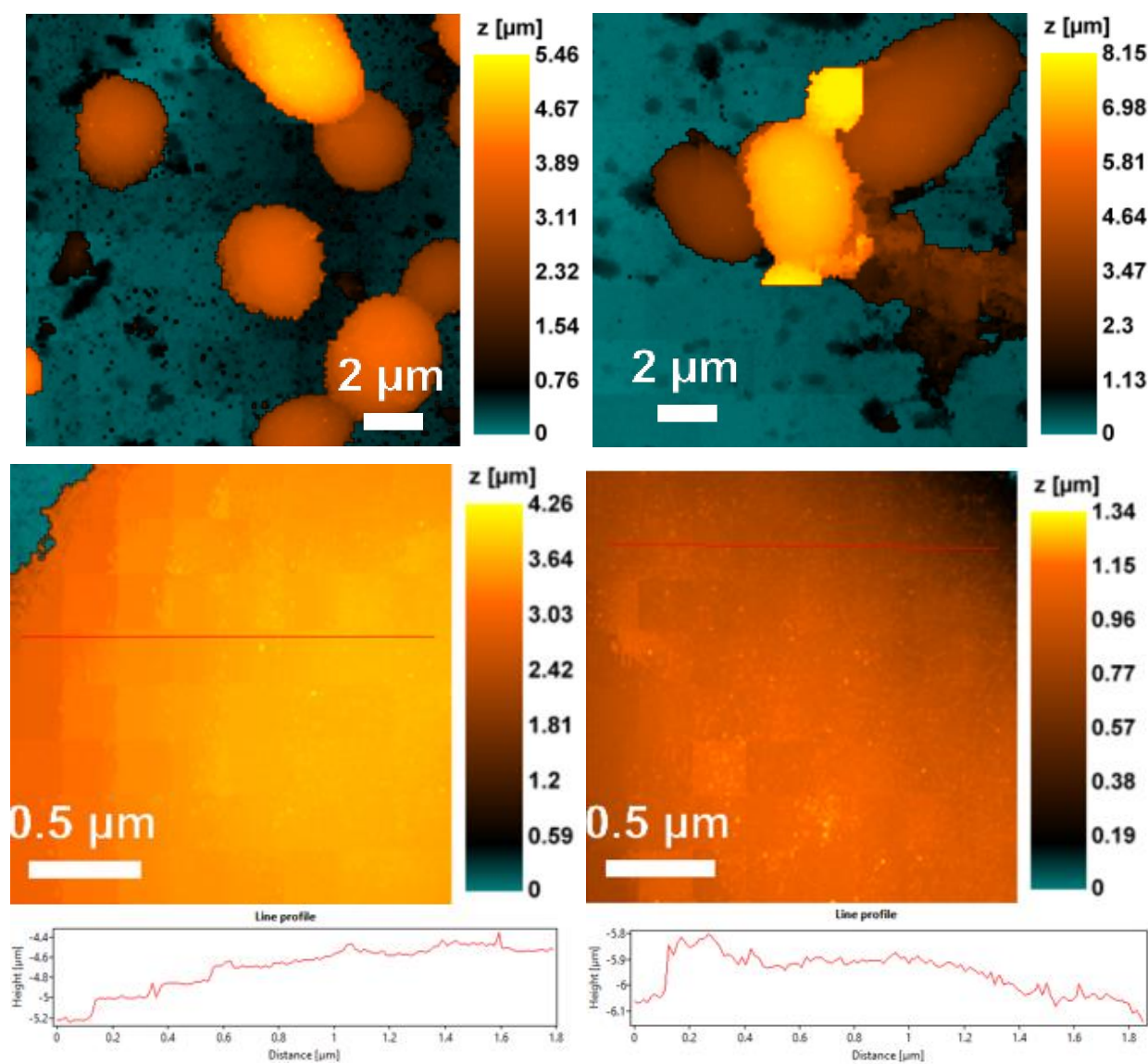


(Д)





(E)



(Ж)

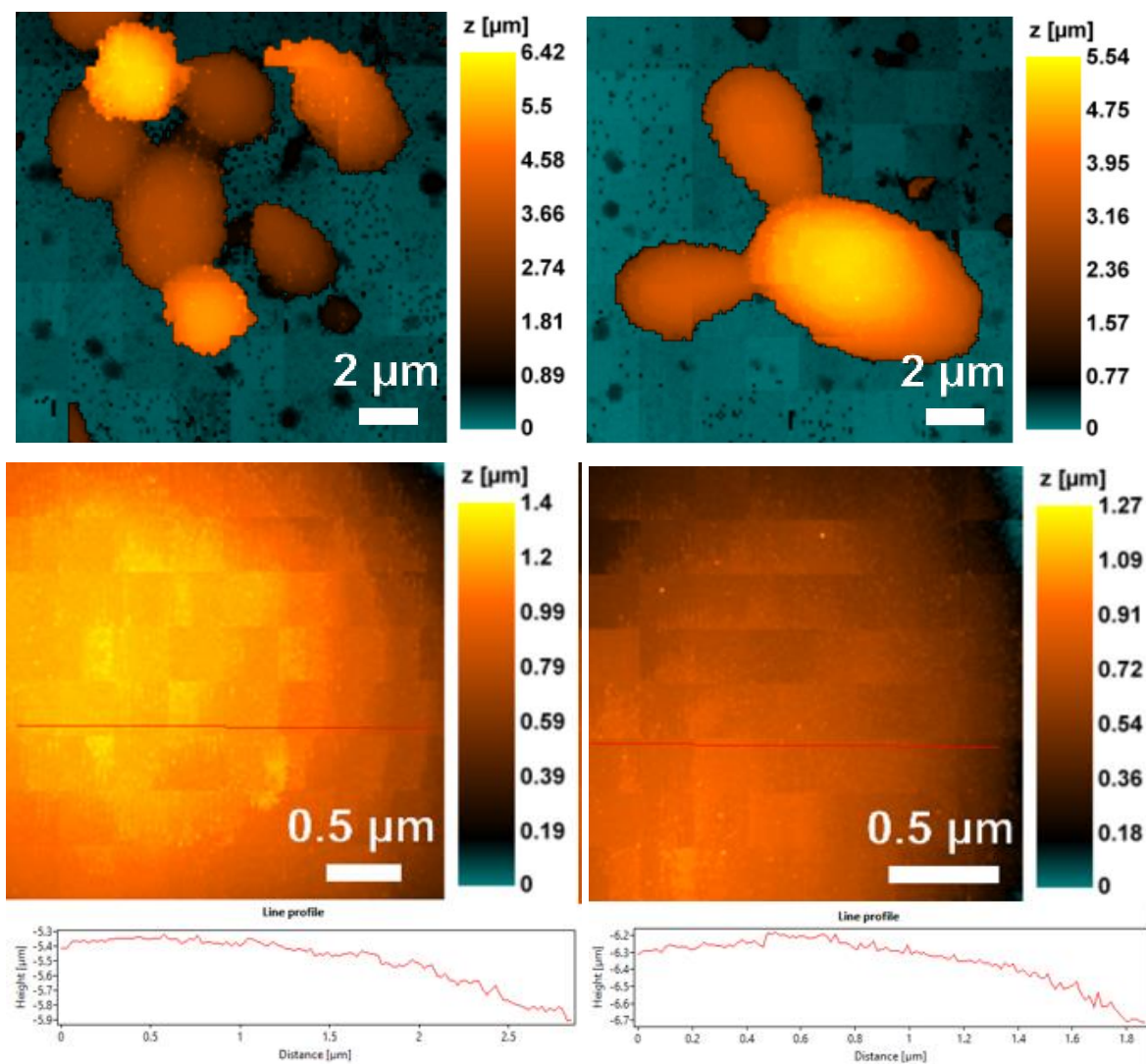


Рисунок Д.11

Приложение Д12. Снимки контрольной группы *C. Albicans* 8R

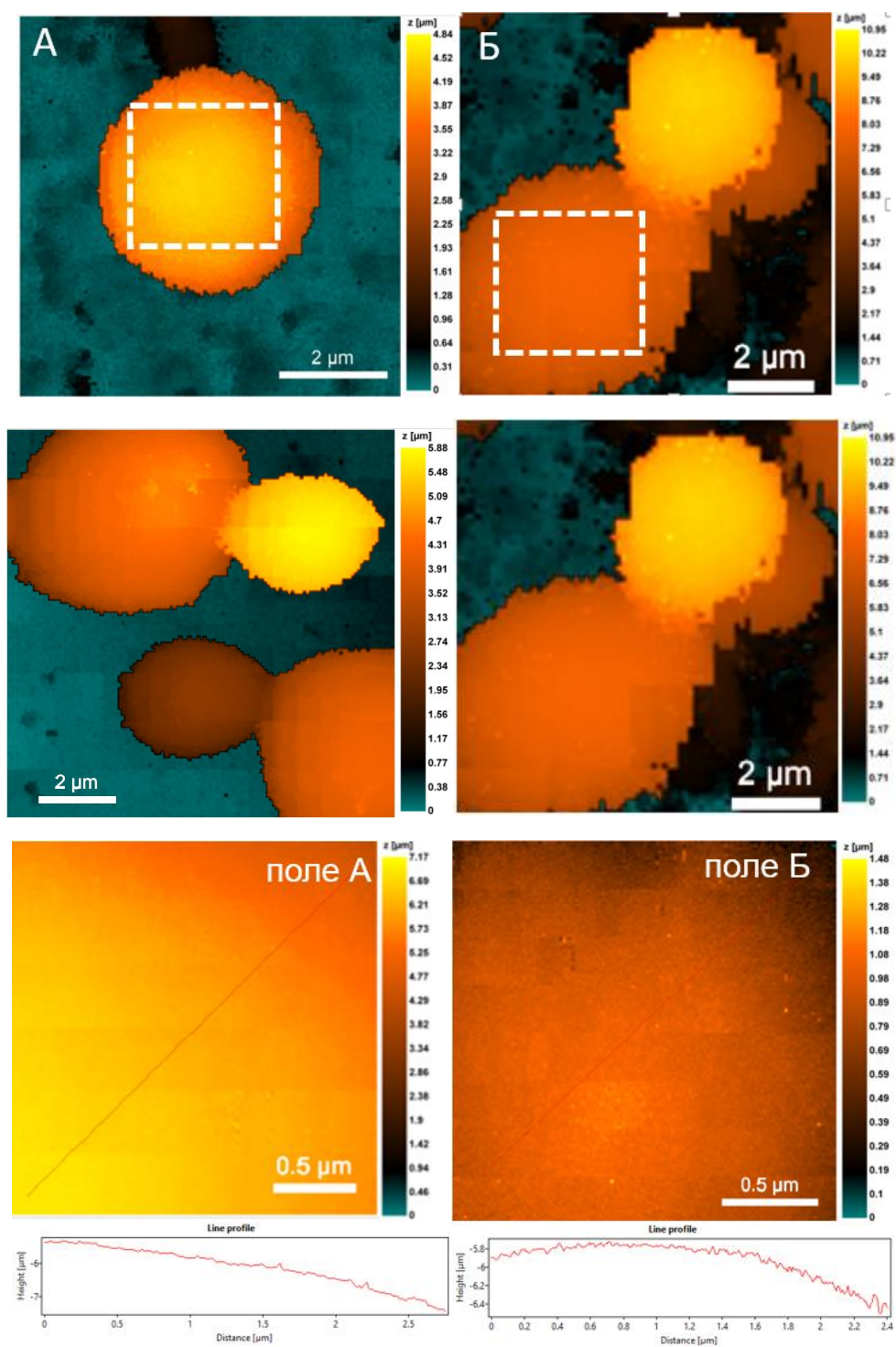


Рисунок Д.12

Приложение Д.13. Снимки контрольной группы *C. krusei* 432M

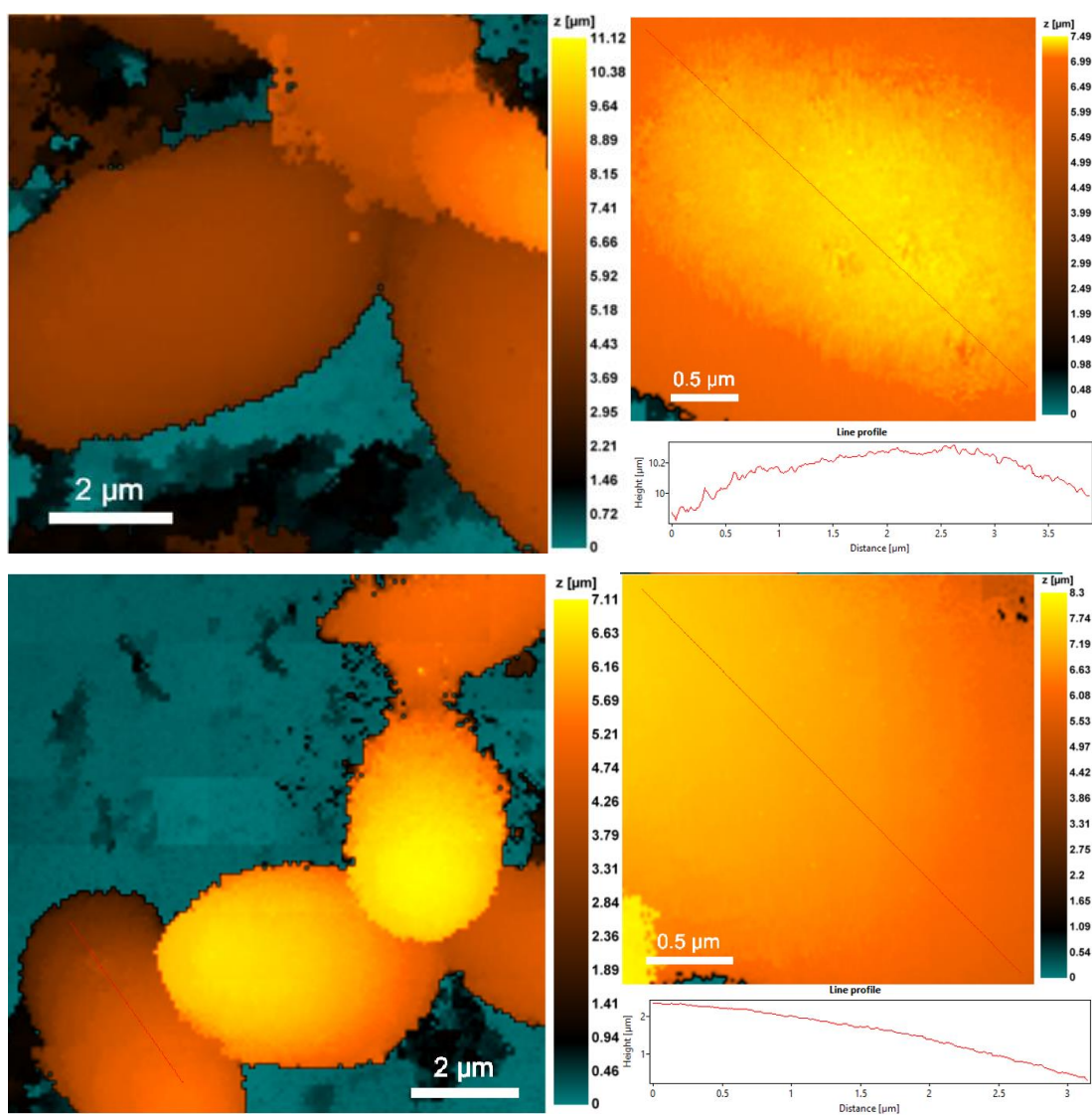


Рисунок Д.13