

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

Савин Никита Александрович

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

1.5.2 – «Биофизика»

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-
математических наук

Научный руководитель
к.ф.-м.н.
Петр Владимирович Горелкин

Москва, 2024

Работа выполнена на кафедре физического материаловедения Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национального исследовательского технологического университета «МИСИС».

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Современные методы микроскопии позволяют изучать наноразмерные структуры микроорганизмов и широко используются при проверке эффективности антимикробных препаратов [1 – 9]. Однако, на данный момент данных об использовании методов, позволяющих одновременно оценивать топографию и механические свойства микроорганизмов неинвазивно. Сканирующая ион-проводящая микроскопия (СИПМ) позволяет изучать рельеф поверхности клеток и воздействие на них противогрибковых препаратов без фиксации образца и в нативной среде, а также визуализировать бактерии и дрожжи [10 – 11]. 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 [12 – 13]. Данные, полученные методом СИПМ, расширят понимание механизмов, протекающих на поверхности клеточной стенки дрожжей при разрушении клеточной стенки, цитоплазматической мембраны и других структур клетки.

В 2022 г. ВОЗ представила обновленный список приоритетных грибковых патогенов, против которых рекомендуется разработка новых противогрибковых препаратов [14]. 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).

Наблюдается рост количества новых патогенных штаммов дрожжей и их резистентности к клиническим противогрибковым препаратам [15 – 18]. 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 подхода в изучении 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 [19]. 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 [20]. Ключевым условием целостности мембран является отсутствие метильных групп у встроенных стерinov. Основной мишенью азолов является гем-белок, который сокатализирует цитохром Р-450-зависимое 14 α -деметилование ланостерола [21]. Ингибирование 14 α -деметилазы 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 [22, 23]. 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 [24].

Противогрибковые препараты (например, итраконазол, эконазол и кетоконазол) также способны проявлять противораковую активность [25, 26]. 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 [27].

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»

– 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».

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы основные цели и задачи исследования, описана научная новизна, представлена практическая значимость работы, составлены положения, выносимые на защиту, указана степень достоверности полученных результатов, а также их апробация, в том числе публикации, указан личный вклад автора.

В первой главе представлен аналитический обзор литературы, включающий в себя: общую структуру дрожжей, их свойства и методы их изучения, включая зондовую, электронную и конфокальную микроскопии, проведено сравнение преимуществ и недостатков методов при изучении ими наноразмерных структур клеточной стенки; описаны основные механизмы воздействия противогрибковых препаратов на дрожжи и их биологический эффект воздействия.

Во второй главе описаны материалы и методы, применяемые в данной работе, математическая модель измерения механических свойств клеточной стенки методом сканирующей ион-проводящей микроскопии.

Объектом исследования служили дрожжевые грибки *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-дионов: 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 1).

Для определения противогрибковой активности рассматриваемых веществ использовали микрометод серийных разведений [28]. 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 1). 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.

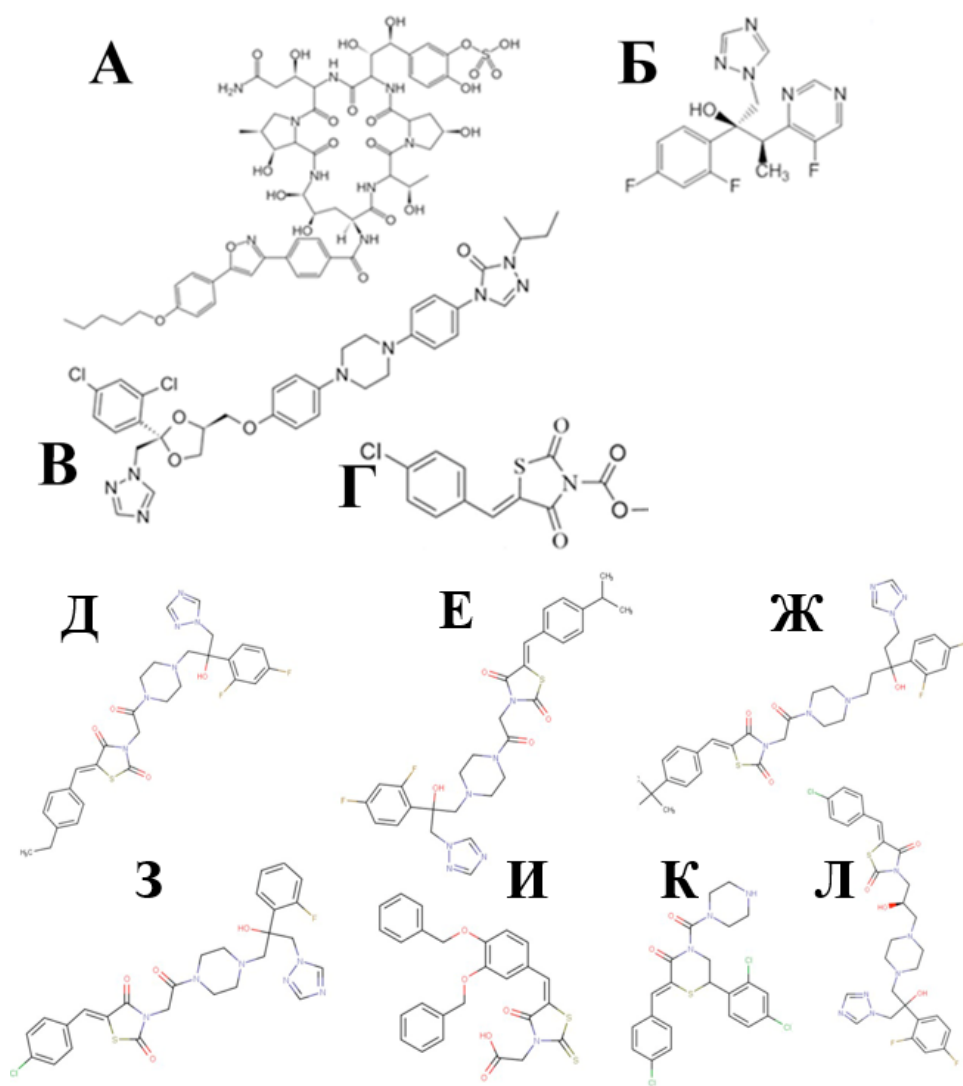


Рисунок 1 – Химические формулы коммерческих препаратов: (А) микафунгин, (Б) вориконазол, (В) итраконазол, (Г) микозидин; разрабатываемых препаратов: (Д) L-272; (Е) L-273; (Ж) L-274; (З) L-98R; (И) 17b; (К) L-170; (Л) L-173

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).

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 [29]. Анализ MTS показал, что флуконазол не вызывал цитотоксических эффектов ни в одной из тестируемых концентраций (рис. 2 (А)). Напротив, L-173 приводил к активации гибели клеток (рис. 2 (В)): IC₅₀ для клеточной линии PC-3 составлял $34,9 \pm 0,26$ мкМ; для культуры HEK293 – $16,6 \pm 0,2$ мкМ.

Клетки PC-3 (клетки рака простаты человека) и HEK293 (эмбриональные почки человека) были приобретены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния, США). Клетки PC-3 культивировали в среде RPMI-1640 (Gibco), дополненной 10 % FBS (Gibco), 2 мМ L-глутамина (Gibco) и 1 % раствором витамина RPMI (Sigma). Клетки HEK293 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.

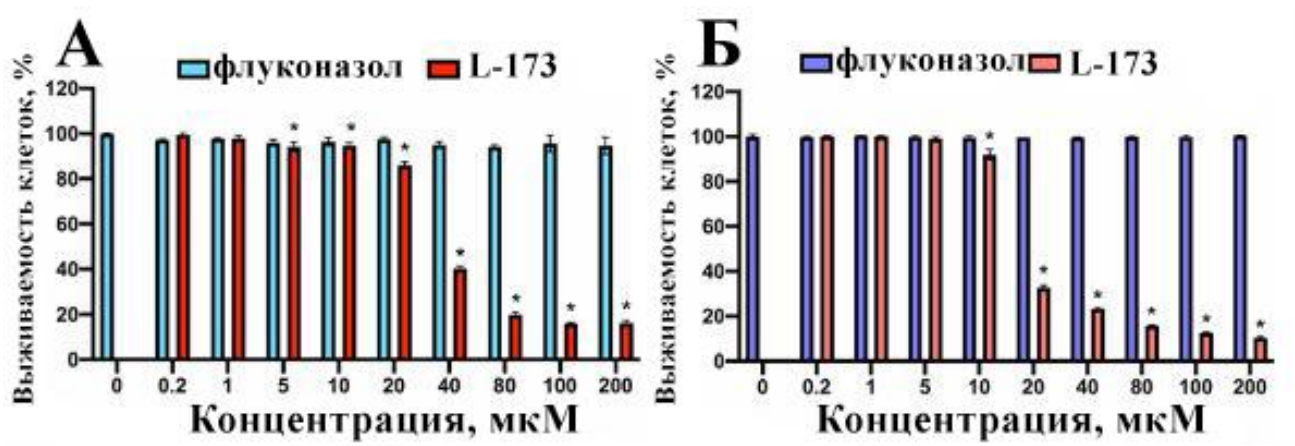


Рисунок 2 – Зависимость выживаемости клеток от концентрации после 72 часов инкубации с различными концентрациями флуконазола или L173 с помощью MTS-теста.

Результаты показаны как средние значения $\pm$ SD, * $p < 0,05$ (t-критерий) при сравнении клеток, инкубированных в культуральной среде («ns» не имеет существенного значения).

(А) клеточная линия PC-3; (Б) культура HEK293.

Таблица 1 – 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

Метод СИПМ

В работе использовался метод СИПМ, в котором 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. 3 (А)).

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 [30].

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 [31]. 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 [32]. 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 [34]:

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

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:

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

Сила поверхностного натяжения рассчитывается по формуле Лапласа:

$$F_\sigma = 2\pi a\sigma, \quad (3)$$

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

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

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

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

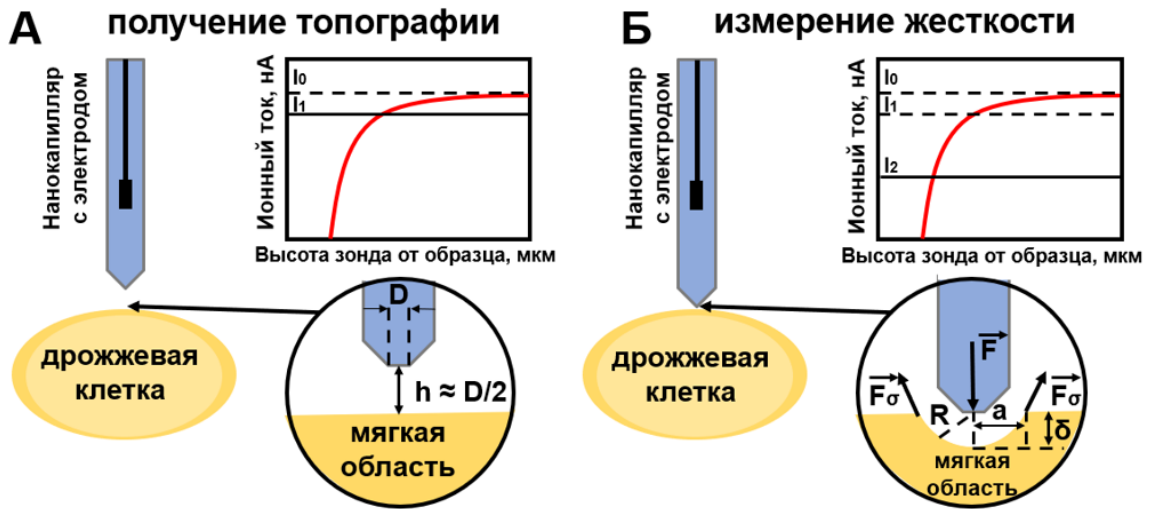


Рисунок 3 – (А) СИПМ схема получения топографии; (Б) графическое представление сил между нанопипеткой и поверхностью образца

Построение изображений топографии и 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 глубины деформации δ представляет собой разницу высот между первой, второй и третьей заданными точками, как показано ниже:

$$\delta = z_{sp2} - z_{sp3}, \quad (5)$$

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

Радиус нанокapилляра и механические характеристики рассчитывались по формуле:

$$r = \frac{I_0}{k\pi V \tan(\alpha)}, \quad (6)$$

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 деформации двойного электрического слоя декан-солевой раствор, как показано ниже [34]:

$$E = PA \left(\frac{S_{sub}}{S_{cell}} - 1 \right)^{-1}, \quad (7)$$

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.

Метод ACM

Измерения ACM проводили с использованием ACM 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 100×00 точек. Отдельные кривые силы были получены при вертикальной пьезоскорости примерно равной 100 мкм/с (скорость линейного изменения 30 Гц с расстоянием 2 мкм) с заданным значением силы 5 нН.

Обработка кривых F-Z была выполнена с использованием программы MATLAB (The MathWorks, Натик, Массачусетс) в соответствии с работой 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.

Разработка методики СИПМ для сканирования дрожжей *Candida spp.*

Ранее применяемые параметры сканирования методом СИПМ были разработаны для работы с биологическими объектами типа клеток млекопитающих [35]. 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 проводилось 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 4 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.

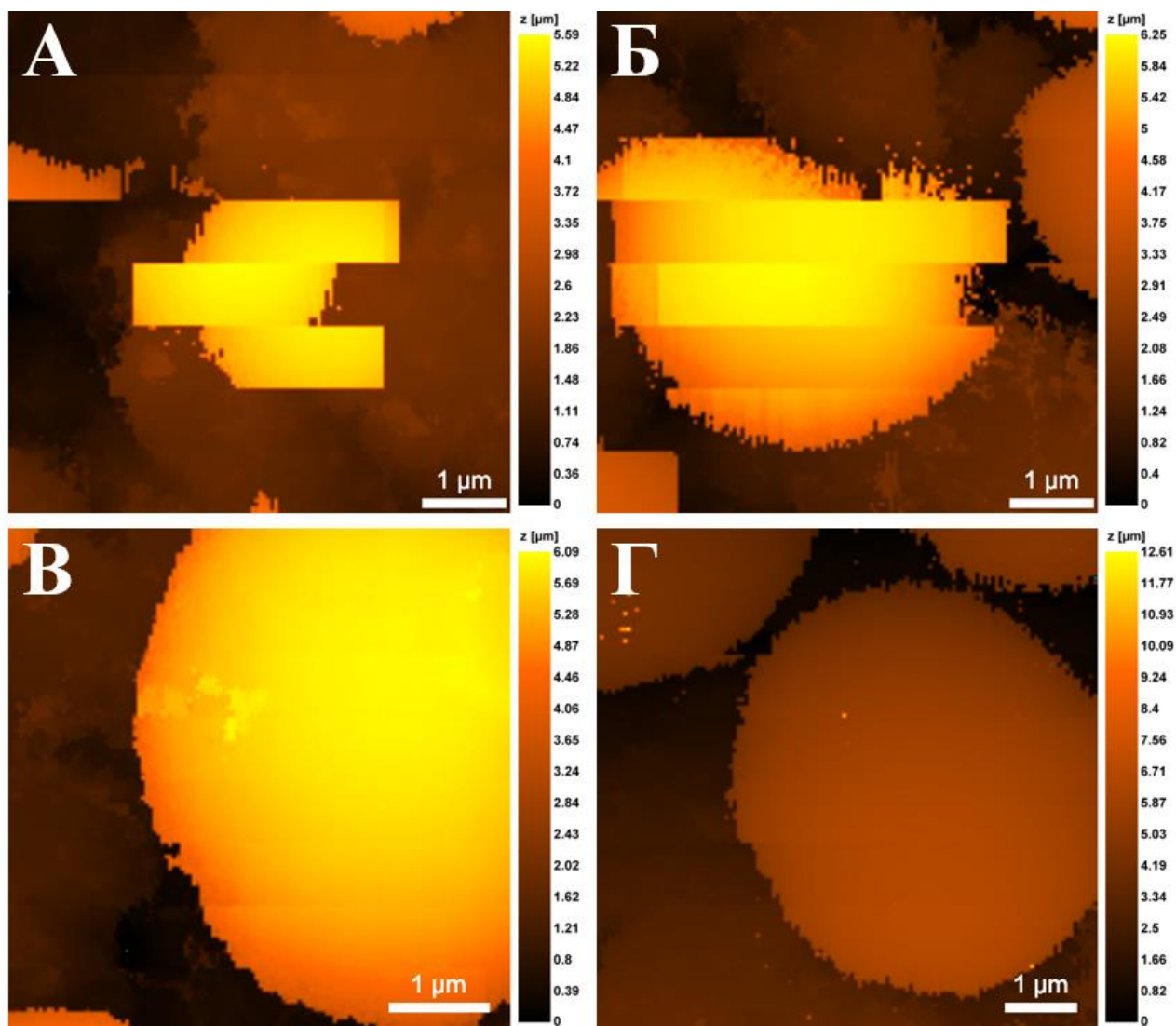


Рисунок 4 – СИПМ топография клеток *Saccharomyces cerevisiae* W303

при величине рабочей точки в (А) 0,5 %; (Б) 0,4 %; (В) 0,3 %; (Г) 0,2 %

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.

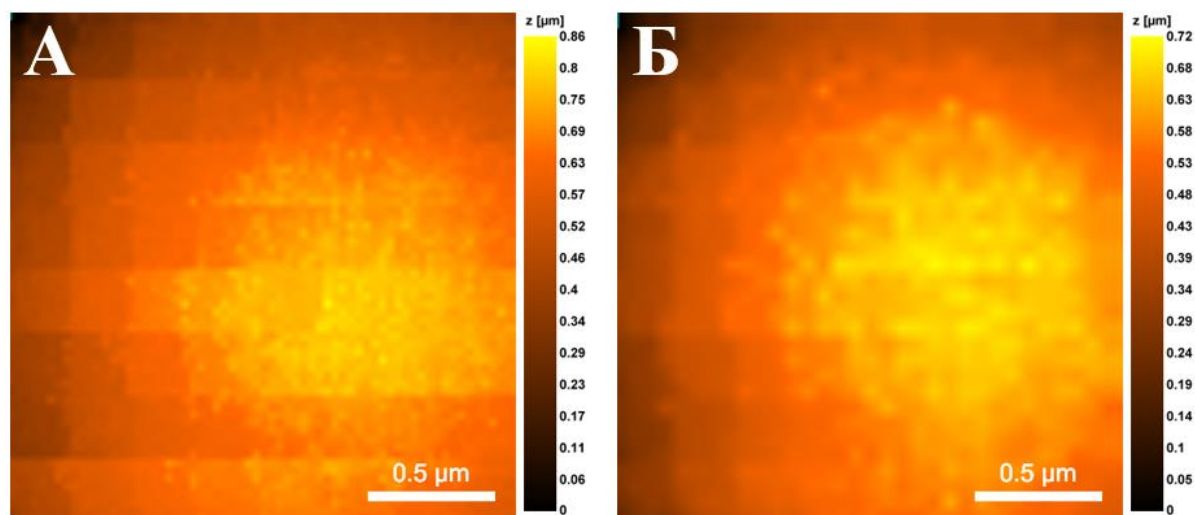


Рисунок 5 – СИПМ топография клеток *Saccharomyces cerevisiae* W303 при пространственном разрешении в (А) 31 нм; (Б) 63 нм. Здесь и далее ось z по высоте представлена цветовым градиентом (мкм).

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 6), которое соответствует 50 нм/мс при котором отсутствует дрейф клеток. При дальнейшем снижении скорости отличительных изменений не обнаружено, однако повышается время съемки.

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 7 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.

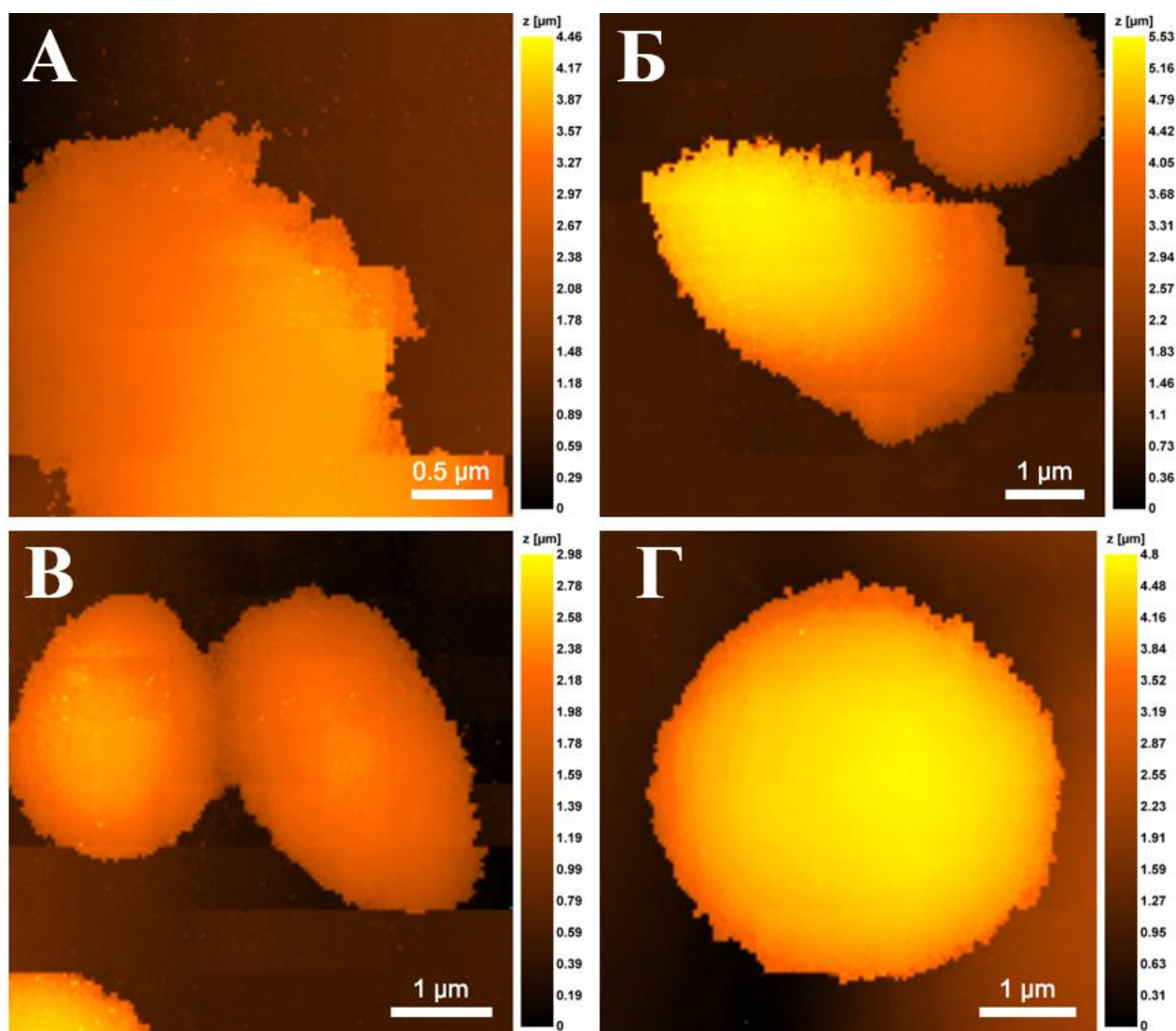


Рисунок 6 – СИПМ топография клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019 при величине скорости подвода зонда равной (А) 100 нм/мс; (Б) 75 нм/мс; (В) 50 нм/мс; (Г) 40 нм/мс

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.

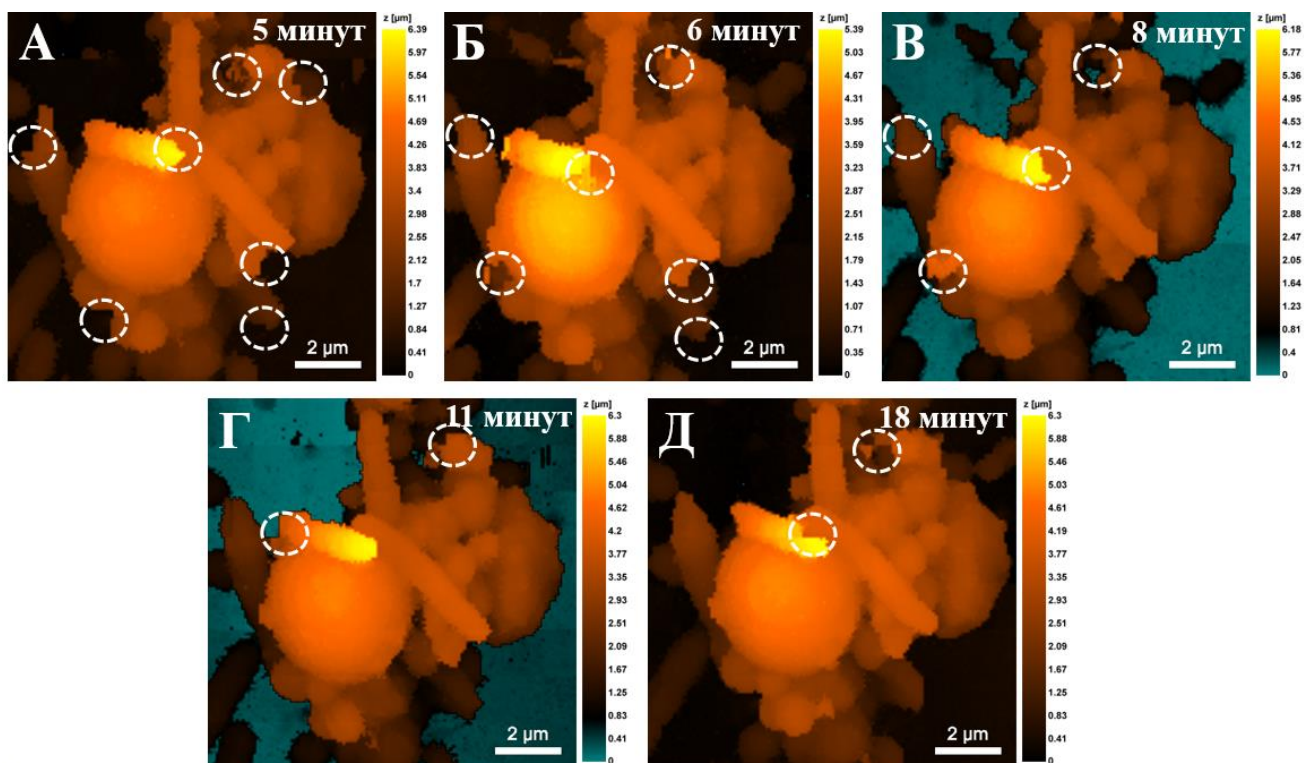


Рисунок 7 – СИПМ топография клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019 при величине задержки равной (А) 7 мкс; (Б) 9 мкс; (В) 11 мкс; (Г) 13 мкс; (Д) 14 мкс. Пунктиром выделены артефакты изображения

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 8, 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.

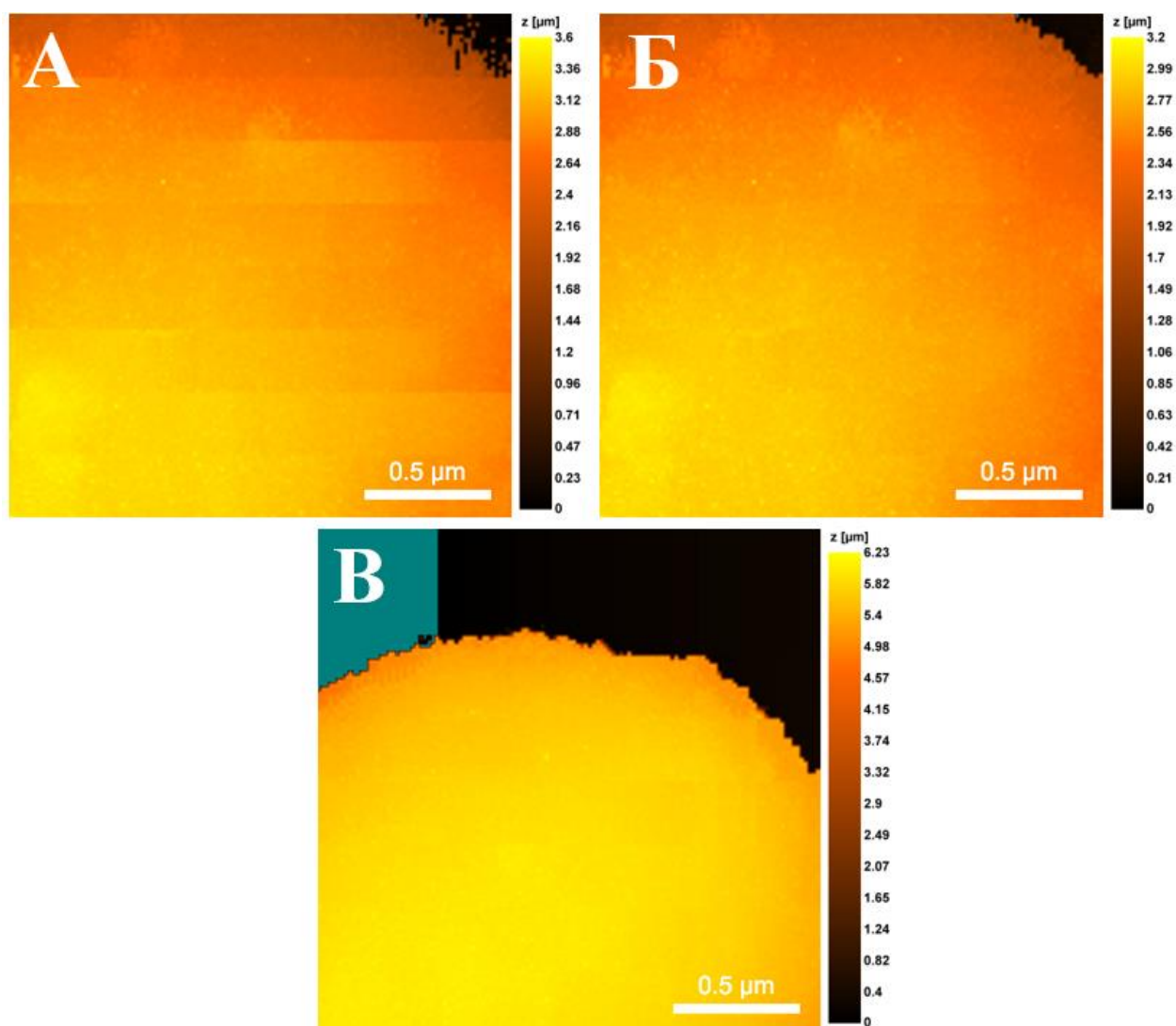


Рисунок 8 – СИПМ топография поверхности клетки *C. parapsilosis* ATCC 22019 при величине высоты предварительного сканирования (А) 5 мкм; (Б) 2 мкм; (В) 1,5 мкм

Тем не менее, в случае получения изображения агломерата клеток малая высота предварительного сканирования приводит к смещению клеток по поверхности. Так на рисунке 9 (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 9 (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.

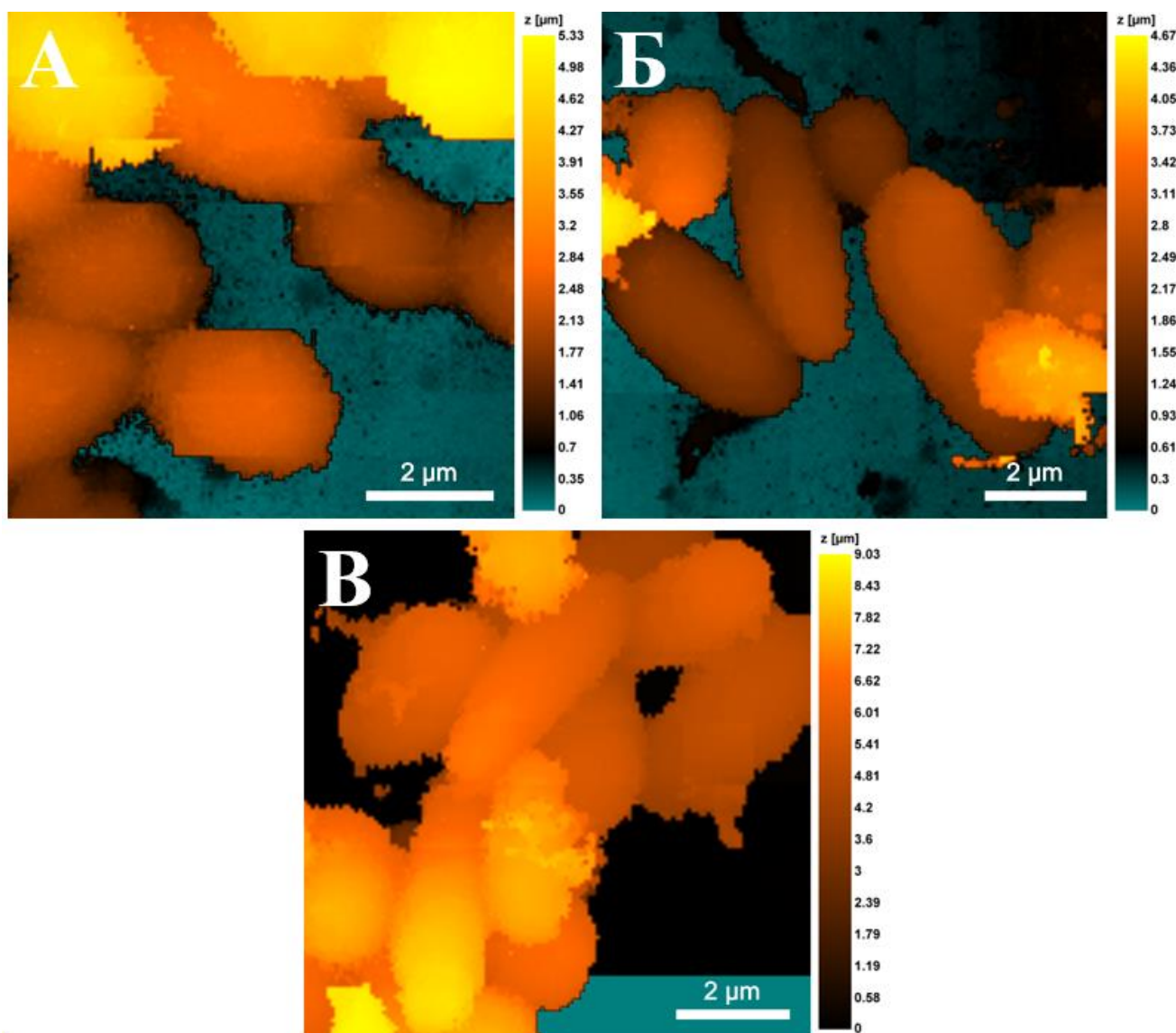


Рисунок 9 – СИПМ топография поверхности клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019 при величине высоты предварительного сканирования (А) 2 мкм; (Б) 3 мкм; (В) 4 мкм

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 10 (А)). При уменьшении радиуса зонда до 40 нм (оказываемое зондом давление равно 44 кПа) количество деформированных зон на изображении увеличивается (рисунок 10 (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 10 (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 нанокapилляра, 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.

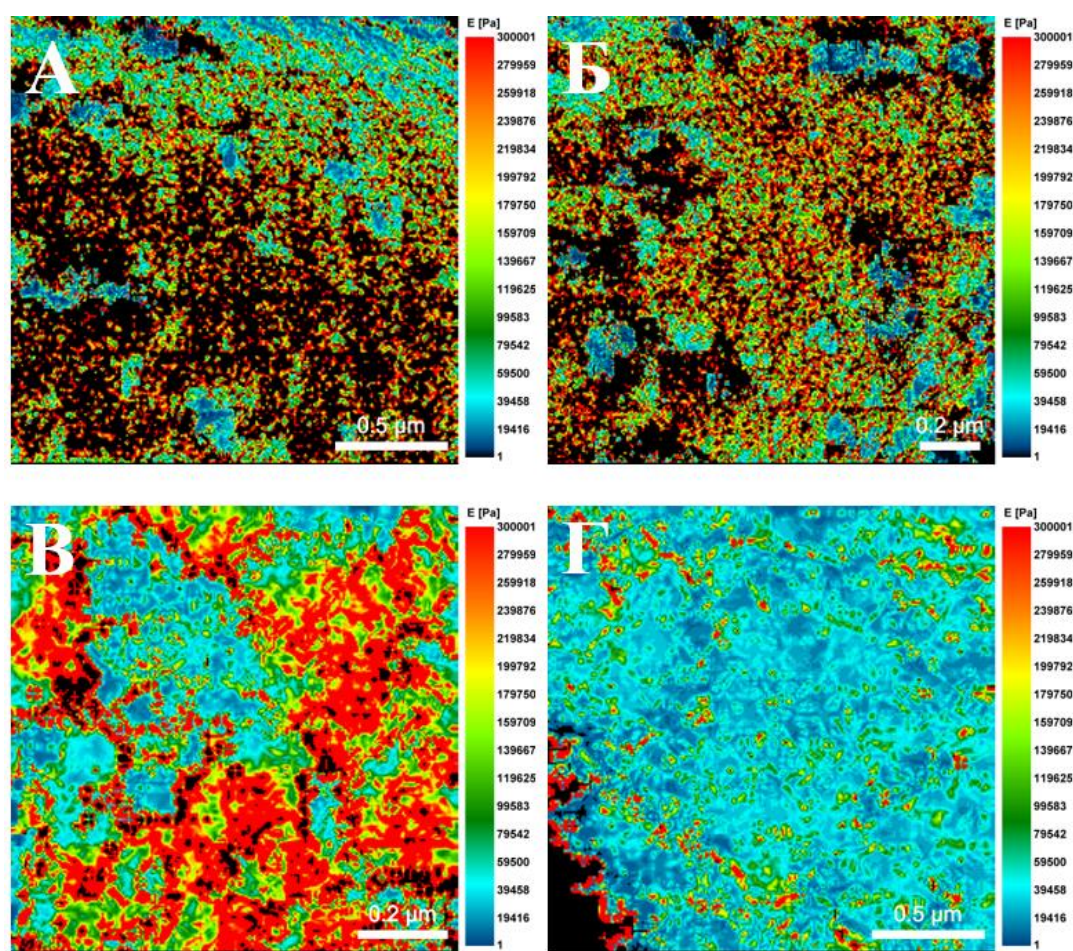


Рисунок 10 – СИПМ карты модуля Юнга поверхности *C. parapsilosis* ATCC 22019 при использовании зондов радиуса (А) 50 нм; (Б) 40 нм; (В) 30 нм; (Г) 20 нм

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.

В третьей главе представлены результаты изучения рельефа поверхности клеточной стенки дрожжей, их морфология и механические свойства. На СИПМ-изображениях у контрольных клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019 наблюдается слабо развитый рельеф клеточной стенки (рис. 11 (А, Р1)).

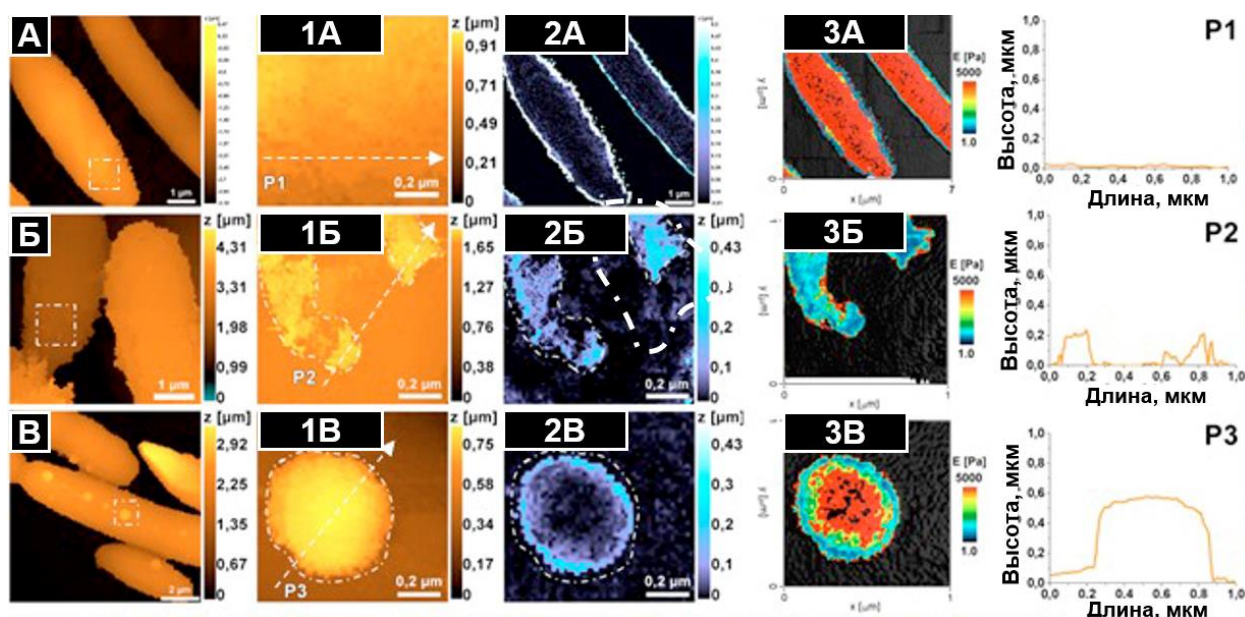


Рисунок 11 – СИПМ-изображения; Топография (1), глубина деформации (2), карта модуля Юнга (3); (А) контрольные клетки *C. parapsilosis* ATCC 22019; (Б) обработанные итраконазолом; (В) обработанные микафунгином. Нормализованные профили высот Р1-Р3 (белая черта на топографии (1) выше)

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. 12). На поверхности *C. parapsilosis* ATCC 22019, обработанной вориконазолом (рис. 10 (В, Р3)) или итраконазолом (рис. 11 (Г, Р4)) 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, обнаружены шероховатые участки рельефа высотой до 0,8 мкм, предположительно являющиеся разрушенной капсулой клетки [36]. 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.

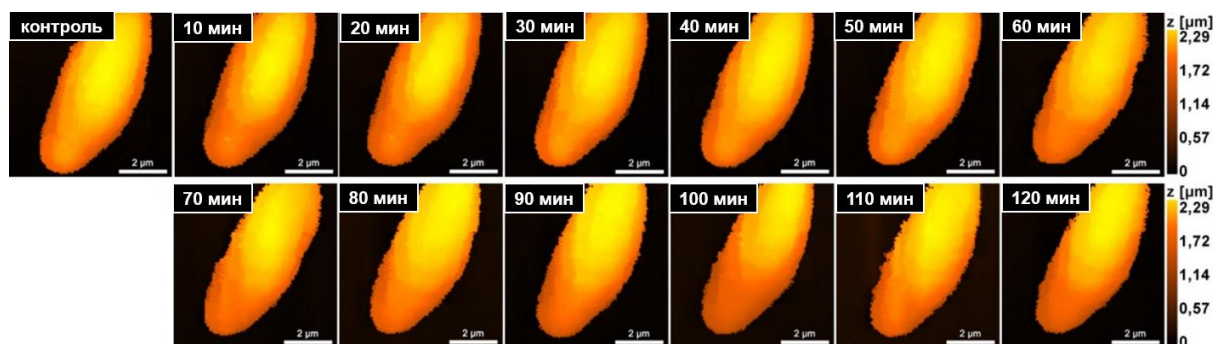


Рисунок 12 – СИПМ-изображения при непрерывном сканировании в течение двух часов (при времени сканирования одно изображение за 10 минут) единичной контрольной клетки *C. parapsilosis* ATCC 22019

C. parapsilosis ATCC 22019 инкубировали с эхинокандином микафунгином в течение 24 часов при концентрации 40 мкг/мл. На СИПМ-изображениях клеток *C. parapsilosis* ATCC 22019 наблюдается изменение рельефа поверхности (округлые участки на клетках дрожжей), которое может указывать на лизис клеточной стенки [37] (рис. 11 (Д)). Полученные данные согласуются с ранее цитированными источниками.

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. 13 (А – Д; 1Р – 5Р)). При самой низкой концентрации 1 мкг/мл не было обнаружено изменений на поверхности клеток. 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.

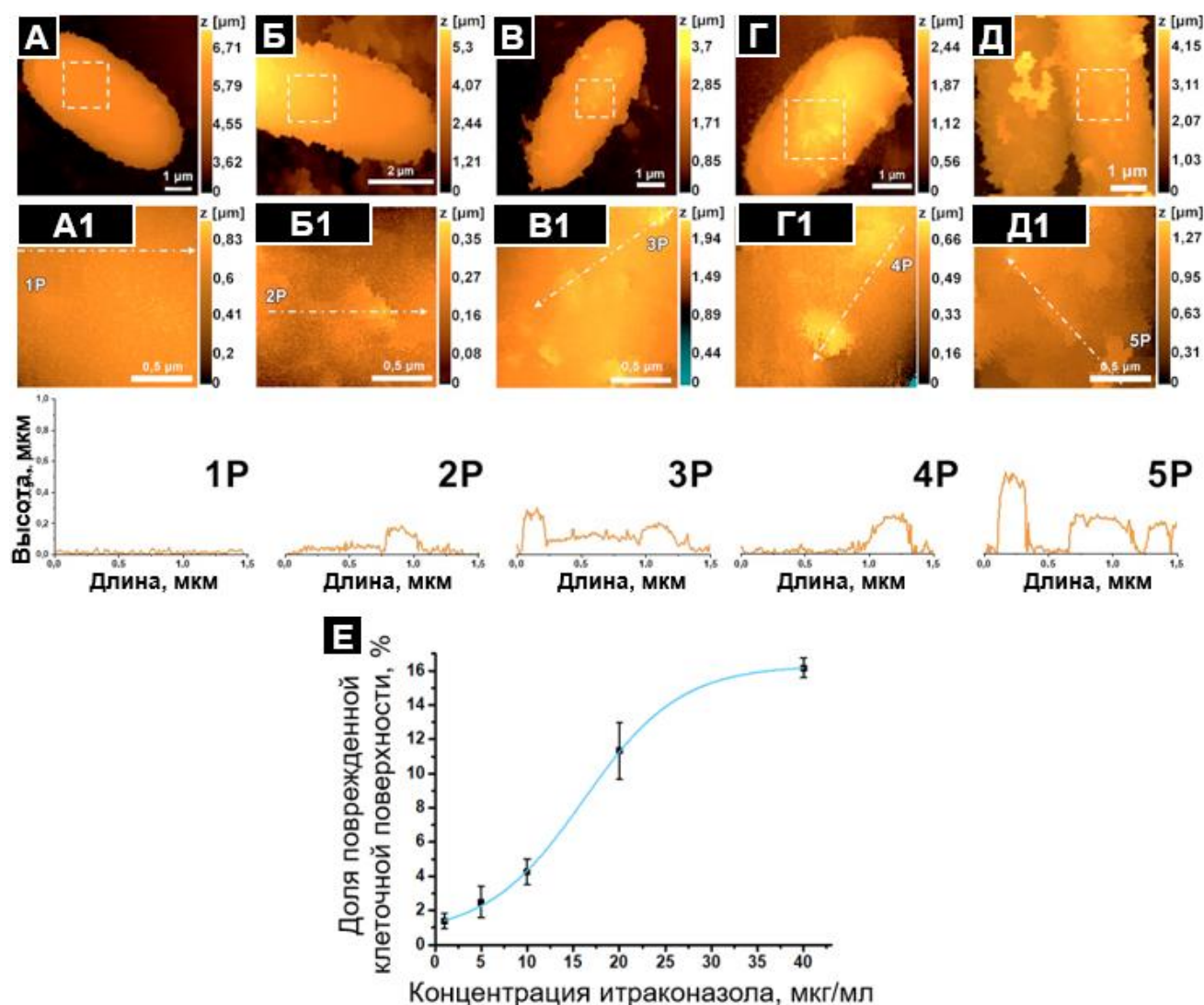


Рисунок 13 – СИПМ-изображения *C. parapsilosis* ATCC 22019 после лечения итраконазолом при концентрациях (А) 1 мкг/мл, (Б) 5 мкг/мл, (В) 10 мкг/мл, (Г) 20 мкг/мл, (Д) 40 мкг/мл. Белыми пунктирными квадратами обозначены увеличенные участки на области клетки (А – Д). Нормализованные профили высоты 1Р-5Р (белая пунктирная стрелка на топографии), (Е) Кривая доза-реакция доли клеточной поверхности с измененным рельефом в зависимости от концентрации итраконазола

Используя данные о площади обработанной поверхности клеток, была построена кривая зависимости «доза-эффект» процента площади поврежденной поверхности клеток в зависимости от концентрации итраконазола (рис. 13 (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).

Таким же образом были получены данные о воздействии разрабатываемых препаратов на рельеф поверхности клеточных структур дрожжей. Обнаружено, что производные тиазолидин-2,4-дионов приводят к изменениям рельефа, которые могут происходить при разрушении мембраны, а также при лизисе клеточной стенки. При этом воздействие на рельеф поверхности у тиазолидинов с фтор- или хлорфениловой группой менее выражен. Наибольший эффект воздействия проявляют тиазолидины с алкеновой группой, что может быть связано с повышенной диффузией вещества сквозь клеточную стенку, накоплению вещества, что в дальнейшем повышает проницаемость мембраны, и в итоге приводит к лизису. Причем, чем больше число атомов углерода в этой группе, тем обширнее изменение рельефа по высоте. Также были классифицированы изменения структуры дрожжей под воздействием противогрибковых препаратов.

Классификация воздействия препаратов на дрожжи *C. parapsilosis* ATCC 22019 представляет собой следующие типы: «КС» – при воздействии вещества наблюдается лизис 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 2. Данные по воздействию препаратов при различных концентрациях на дрожжи *C. parapsilosis* ATCC 22019 представлены в таблице 3.

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. На примере препарата L-173 было проведено исследование его селективности к различным штаммам *Candida spp.*

Таблица 2 – Воздействия исследуемых веществ на патогенные дрожжи *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* ATCC 24433 и *C. krusei* ATCC 14243 в сравнении с коммерческими противогрибковыми препаратами

Препарат /штамм	L-272	L-273	L-274	L-98R	L-173	Дифлук оназол	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> 8R	–	–	–	–	–	–	3 КС
<i>C. krusei</i> 432М	–	–	3 КС + ЦМ	1 ЦМ	–	–	–
Препарат /штамм	Вори ко- назол	Итрако - назол	Микозиди н	Мика- фунгин	–	–	
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1 ЦМ	2 ЦМ	2 КС	2 КС	–	–	

Таблица 3 – 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
Итраконазол	1	1	2	2	3
Вориконазол	0	1	1	0	1
Микозидин	0	1	1	2	2
Микафунгин	0	0	2	2	2

Для сравнения эффектов препарата L-173 в различных концентрациях использовалась следующая классификация: «0» - эффект препарата не выявлен, клетки аналогичны контрольной группе; «1» — на рельефе поверхности клетки обнаружены

впадины; «2» — рельеф поверхности ставится более шероховатым, по сравнению с контролем; «3» — поверхность клеток повреждена более чем на 80%, клетки считаются погибшими/разрушенными. Данные представлены в таблице 4.

Таблица 4 – 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

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.

Для определения механических свойств клеточной стенки дрожжей была апробирована ранее представленная методика. Для сравнения данных о механических свойствах был использован метод АСМ. В качестве калибровочного образца использовался силиконовый эластомер Sylgard, применяемый ранее для модификации чашек Петри. Данный полимер деформировали кантилевером АСМ и нанокapиллярном СИПМ. Минимальное значение глубины деформации для АСМ на порядок превышает максимальное значение глубины деформации зондом СИПМ.

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. 14 (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. 14 (Б)), выбиралась область с выпуклыми участками клеточной стенки и проводилось сканирование

топографии с одновременным картированием механических свойств. На рисунке 14 (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. 14 (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.

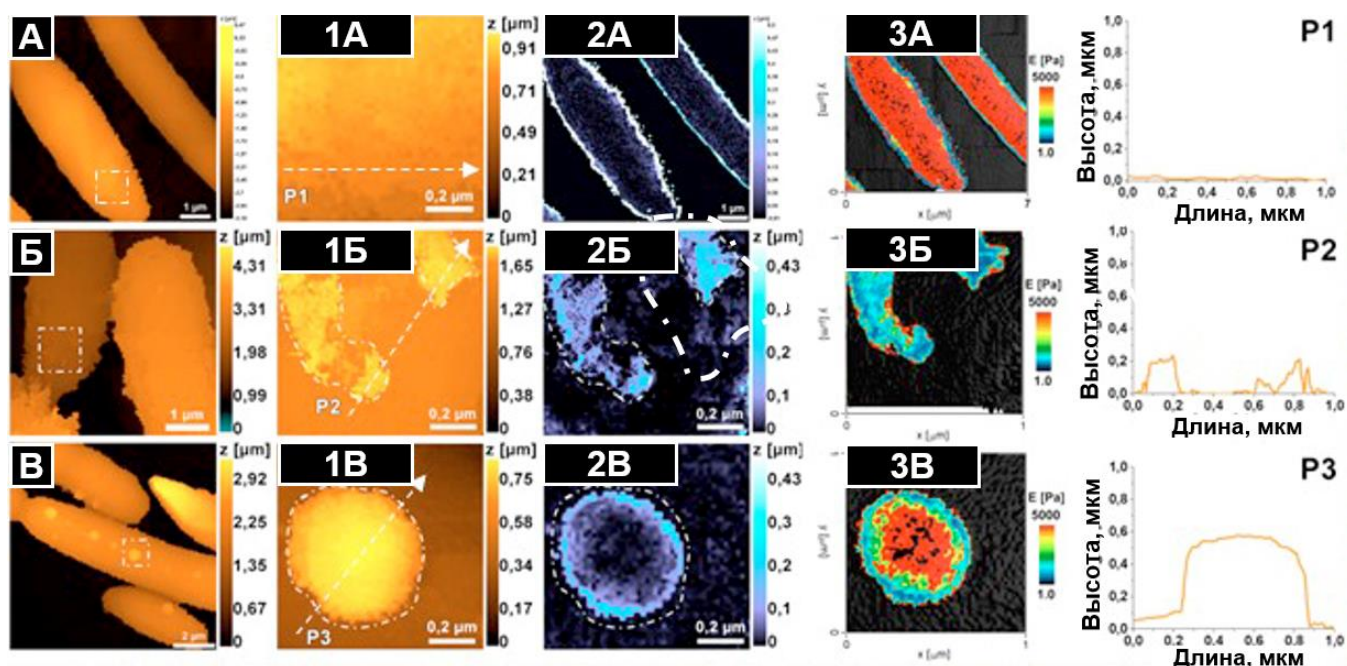


Рисунок 14 – СИПМ-изображения; топография (1), деформация (2), карта модуля Юнга (3); (А) контрольные клетки *C. parapsilosis* ATCC 22019; (Б) обработанные итраконазолом; (В) обработанные микафунгином. Профили высот Р1-Р3 (белая черта на топографии (1) выше)

Аналогично была получена величина глубины деформации на поверхности клеток, обработанных микафунгином при концентрации 40 мкг/мл. На рисунке 14 (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 рис. 15 (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 и $\delta = 100 \pm 50$ мкм и модулем Юнга $E = 0,2 \pm 0,2$ МПа. 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 5.

Полученная методом АСМ величина модуля Юнга сопоставима с величиной модуля Юнга дрожжевых клеток *Candida spp.* и имеют порядок в несколько сотен Мпа [38]. 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 5 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.

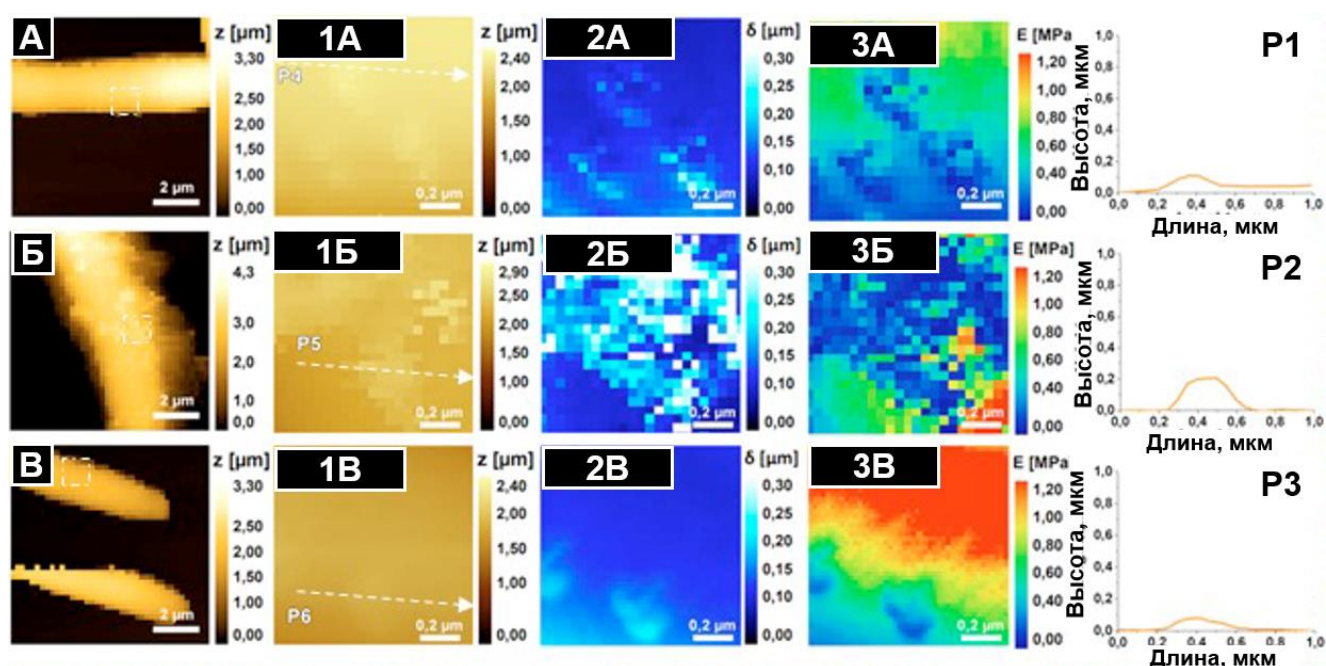


Рисунок 15 – АФМ-изображения; Топография (1), глубина деформации (2), карта модуля Юнга (3); (А) контрольные клетки *C. parapsilosis* ATCC 22019; (Б) обработанные итраконазолом; (В) обработанные микафунгином. Нормализованные профили высот P1- P3 (белая черта на топографии (1) выше)

Таблица 5 – Модуль Юнга (кПа) поврежденных участков клетки под различными воздействиями препаратов (Itr – итраконазол; Vor – вориконазол; Mic – микафунгин).

Структура/ Препарат	Cntr	Itr	Vor	Mic	17b	L-274	L-173
мембрана		–	–	8,2 ± 0,2	–	5,2 ± 0,4	3,1 ± 0,2
клеточная стенка	65 ± 8,3	1,9 ± 0,1	2,3 ± 0,2	–	1,7 ± 0,1	–	1,5 ± 0,1

В дополнение к изучению механических свойств наноразмерных структур дрожжей, изучено влияние противомикробного препарата флуконазола и препарата L-173 на клеточные линии рака предстательной железы человека РС3 и эмбриональной почки человека НЕК 293; топографию (А1 – Е1) и карты механических свойств (А2 – Е2), представленные на рисунке 16.

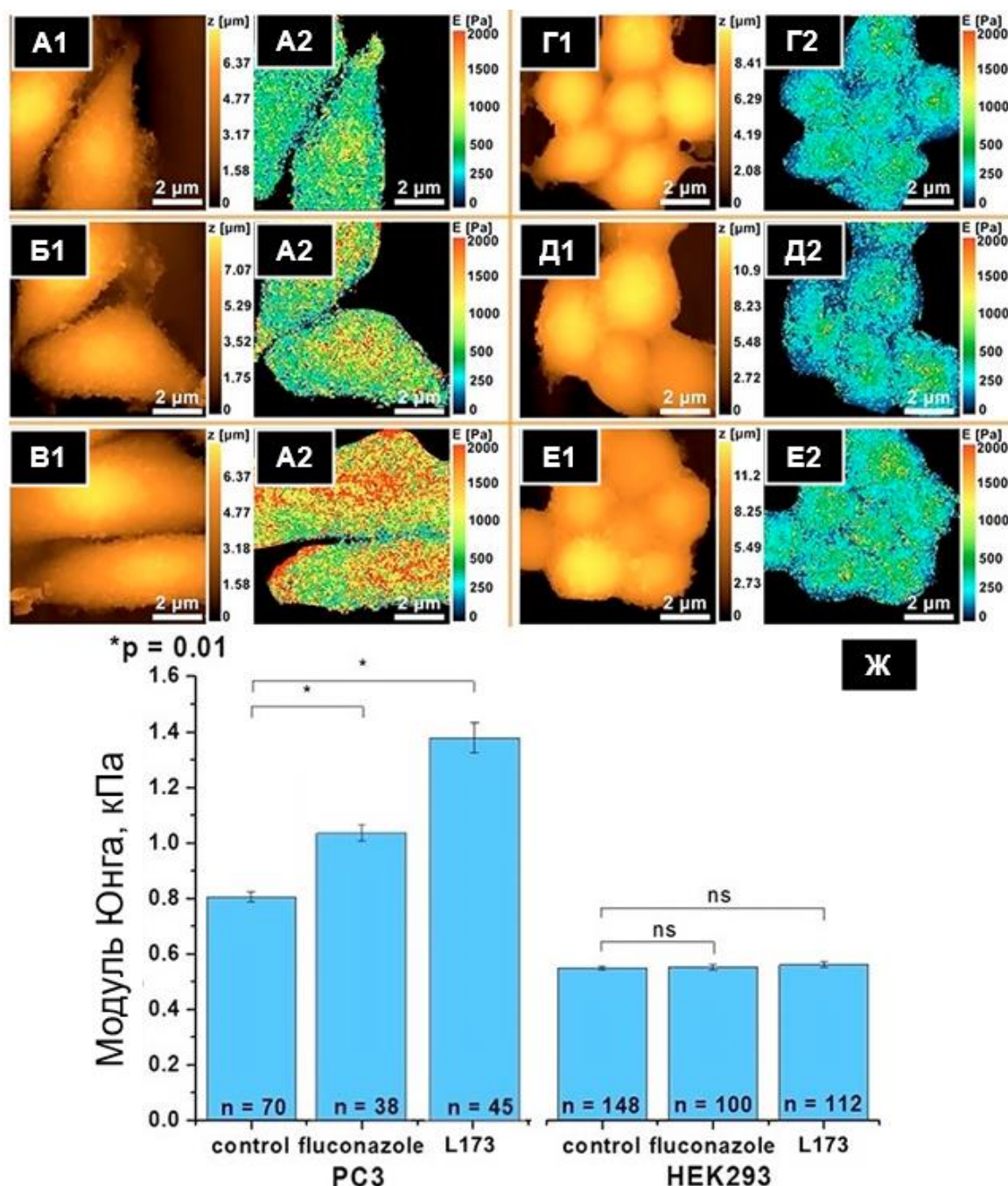


Рисунок 16 – Топография СИПМ (1) и карты модуля Юнга (2) контрольных клеток (А, Г); клетки, обработанные флуконазолом (Б, Д); клетки, обработанные препаратом L-173 (В, Е), где РС3 в (А – В) и НЕК 293 (Г – Д). Гистограмма жесткости клеток РС3 и НЕК 293 с добавлением противогрибковых средств, SE и (*) $p < 0,01$ (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. 16 (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. Кроме того, отсутствие изменений механических свойств здоровой клеточной линии НЕК 293 при воздействии флуконазола и L-173 может свидетельствовать о низкой токсичности этих препаратов.

В данной главе был проведен анализ биологической активности изучаемых 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 $\log S$ [39]. Полученные значения представлены в таблице 6. 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).

Далее параметр ED_{50} был использован для расчёта биологической активности $\log(1/C)$, данные приведены в таблице 6. Построенная зависимость биологической активности от липофильности препарата $\log P$ 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).

Таблица 6 – Дескрипторы биологической активности противогрибковых препаратов

Препарат	ED ₅₀ , мкмоль/л	Log(1/ED ₅₀)	Поляризуемость Å ³ (10 ⁻³⁰ 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

Также по полученным данным высот повреждённых участков были построены концентрационные зависимости. 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 – $R^2 = 0,972$,

$a = 88, b = 0,22; L-98R - R^2 = 0,987, a = 101, b = 0,3; 17b - R^2 = 0,964, a = 0,9, b = 0,92; L-272 - R^2 = 0,983, a = 91, b = 0,36; L-273 - R^2 = 0,982, a = 98, b = 0,5; L-274 - R^2 = 0,976, a = 45, b = 0,78; \text{итраконазол} - R^2 = 0,998, a = 22, b = 0,87; \text{вориконазол} - R^2 = 0,967, a = 126, b = 0,18; \text{микафунгин} - R^2 = 0,989, a = 31, b = 0,16$. Показатели степенной функции также представлены в таблице 6.

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 $70 \text{ \AA}^3 (10^{-30} \text{ м})$.

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 $p = (57 - 67) \text{ \AA}^3$. 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.

ВЫВОДЫ

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 $(0,18 \pm 0,03) \text{ нН}$ и $(0,34 \pm 0,02) \text{ нН}$, 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. 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. – Т. 41. – №. 7. – С. 797-805.
2. Handorf O. et al. Antimicrobial effects of microwave-induced plasma torch (MiniMIP) treatment on *Candida albicans* biofilms // *Microbial biotechnology*. – 2019. – Т. 12. – №. 5. – С. 1034-1048.
3. Sudbery P., Gow N., Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans* // *Trends in microbiology*. – 2004. – Т. 12. – №. 7. – С. 317-324.
4. Nishiyama Y., Uchida K., Yamaguchi H. Morphological changes of *Candida albicans* induced by micafungin (FK463), a water-soluble echinocandin-like lipopeptide // *Microscopy*. – 2002. – Т. 51. – №. 4. – С. 247-255.
5. Madhavan P. et al. Comparative study of the effects of fluconazole and voriconazole on *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida rugosa* biofilms // *Mycopathologia*. – 2018. – Т. 183. – С. 499-511.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Levshin I. B. et al. Antifungal thiazolidines: Synthesis and biological evaluation of mycosidine congeners // *Pharmaceuticals*. – 2022. – Т. 15. – №. 5. – С. 563.
11. Savin N. A. et al. Application of Nanotechnologies in Studying Yeast Structure in *Candida* // *Nanobiotechnology Reports*. – 2021. – Т. 16. – С. 450-472.
12. 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.

13. Ossola D. et al. Simultaneous scanning ion conductance microscopy and atomic force microscopy with microchanneled cantilevers // *Physical review letters*. – 2015. – T. 115. – №. 23. – C. 238103.
14. 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).
15. 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. – T. 12. – №. 4. – C. 501-517.
16. Healey K. R., Perlin D. S. Fungal resistance to echinocandins and the MDR phenomenon in *Candida glabrata* // *Journal of fungi*. – 2018. – T. 4. – №. 3. – C. 105.
17. Pristov K. E., Ghannoum M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2019. – T. 25. – №. 7. – C. 792-798.
18. Cortegiani A. et al. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris* // *Journal of intensive care*. – 2018. – T. 6. – C. 1-13.
19. Georgopapadakou N. H., Walsh T. J. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1996. – T. 40. – №. 2. – C. 279-291.
20. Matsubara T. et al. Cerebroside of the dimorphic human pathogen, *Candida albicans* // *Chemistry and physics of lipids*. – 1987. – T. 43. – №. 1. – C. 1-12.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.

26. Lima T. S. et al. itraconazole reverts ABCB1-mediated docetaxel resistance in prostate cancer //Frontiers in pharmacology. – 2022. – T. 13. – C. 869461.
27. 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.
28. PA W. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard //CLSI document M27-A2. – 2002.
29. 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.
30. Verwey E. J. W. Theory of the stability of lyophobic colloids //The Journal of Physical Chemistry. – 1947. – T. 51. – №. 3. – C. 631-636.
31. Hunter R. J. Introduction to modern colloid science. – 1993.
32. Hartley P. G. et al. Surface forces and deformation at the oil– water interface probed using AFM force measurement //Langmuir. – 1999. – T. 15. – №. 21. – C. 7282-7289.
33. 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.
34. 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.
35. Clarke R. W. et al. Low stress ion conductance microscopy of sub-cellular stiffness //Soft Matter. – 2016. – T. 12. – №. 38. – C. 7953-7958.
36. Tøndervik A. et al. Alginate oligosaccharides inhibit fungal cell growth and potentiate the activity of antifungals against Candida and Aspergillus spp //PLoS One. – 2014. – T. 9. – №. 11. – C. e112518.
37. 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.
38. 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.
39. Мельникова Н.Б., Малыгина Д.С. Современные подходы к синтезу новых лекарственных веществ. Учебное пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2022. – 131 с.

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.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 **Savin N.**, Erofeev A., Gorelkin P. Analytical Models for Measuring the Mechanical Properties of Yeast //Cells. – 2023. – Т. 12. – №. 15. – С. 1946.
- 2 **Savin N.** et al. Investigation of the Antifungal and Anticancer Effects of the Novel Synthesized Thiazolidinedione by Ion-Conductance Microscopy //Cells. – 2023. – Т. 12. – №. 12. – С. 1666.
- 3 **Savin N.** et al. Scanning ion-conductance microscopy technique for studying the topography and mechanical properties of Candida parapsilosis yeast microorganisms //Biomaterials Science. – 2023. – Т. 11. – №. 2. – С. 611-617.
- 4 Antifungal thiazolidines: Synthesis and biological evaluation of mycosidine congeners / Levshin I.B., Simonov A.Y., Lavrenov S.N., Panov A.A., Grammatikova N.E., Alexandrov A.A., Ghazy E.S., **Savin N.A.**, Gorelkin P.V., Erofeev A.S., Polshakov V.I. // Pharmaceuticals. – 2022. – Т. 15. – №. 5. – С. 563.
- 5 **Savin N.** et al. Application of Nanotechnologies in Studying Yeast Structure in Candida //Nanobiotechnology Reports. – 2021. – Т. 16. – С. 450-472.