

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ CANDIDA ALBICANS МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Филиппова Е.М. Несвижский Ю.В. Титов С.А. Глухов А.И.

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

г. Москва, РФ; e-mail: liza.filippova97@yandex.ru

Поступила в редакцию: 15.07.2021

**Аннотация.** *Candida* – дрожжеподобный гриб, который играет заметную роль в развитии оппортунистических инфекций у иммунокомпрометированных людей. Однако микробиологическая диагностика данного микроба, учитывая неуклонное расширение пула его лекарственно устойчивых штаммов, имеет определенные сложности. В этой связи целью настоящей работы явилась оценка возможности применения атомно-силовой микроскопии (АСМ) как средства микробиологической диагностики грибов рода *Candida*. В ходе исследования методом АСМ было проведено сканирование поверхности коллекционного штамма *Candida albicans* и сняты кривые взаимодействия биоорганических структур клеточной стенки гриба со сканирующим устройством прибора. Сканирование и снятие кривых проводили в двух режимах работы микроскопа: контактном и полуконтактном, а также с использованием трех сенсоров, отличающихся константой упругости: «мягкий» (константа упругости 0,03 Н/м), «средний» (3,5 Н/м) и «жесткий» (5,5 Н/м). В результате исследования был подобран оптимальный по константе упругости кантилевер и режим атомно-силовой микроскопии клеточной поверхности *Candida albicans*.

**Ключевые слова:** атомно-силовая микроскопия, *Candida albicans*.

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Во многих сообщениях от ВОЗ говорится о том, что за последние десятилетия сильно вырос процент микозов. В основном это связано растущим количеством иммунокомпрометированных лиц, например, людей с иммунодефицитом или получающих иммуносупрессоры после трансплантации, в следствии аутоиммунных заболеваний или для подавления воспаления, а также проходящих химиотерапию по поводу онкологического заболевания. Чаще всего причиной микозов являются дрожжеподобные грибы рода *Candida*, которые могут вызывать как поверхностные, так и системные процессы, отличающиеся высокой смертностью. Наиболее распространенным и хорошо изученным представителем данного рода грибов является *Candida albicans*.

По современным представлениям, в нормальных условиях основным «местом обитания» *Candida spp.* в организме человека является кишечник. При исследовании состава микрофлоры кишечника здоровых людей нескольких стран Европы присутствие грибов обнаружено в 20–80% [1], в кале — у 65–80%. Также *Candida spp.* выделяется из других биотопов - ротовой полости, урогенитального тракта [2]. Так, исследование взрослых здоровых добровольцев показало, что, например, *C. albicans* присутствует в орофарингеальной зоне у 17–75% лиц [3,4].

На сегодняшний день известно более 200 видов грибов рода *Candida*, идентификация которых затруднительна в связи с особенностями их биологии: они имеют как гаплоидный, так и диплоидный набор хромосом, изменчивую морфологию, высокую прочность клеточной стенки, обладают устойчивостью к действию иммунных факторов и пр. В последние десятилетия четко обозначилось неуклонное расширение пула штаммов с высокой резистентностью к антимикотическим препаратам, что осложняет лечебные мероприятия [5].

Сказанное определило актуальность проблемы выявления и лечения инфекций, вызванных дрожжеподобными грибами рода *Candida*, и поиска новых диагностических подходов, одним из которых может стать атомно-силовая микроскопия (АСМ). Суть методики - сканирование поверхности объекта чувствительным зондом, позволяющая получить его топографические характеристики. Этот инструмент прекрасно подходит изучения объектов биологии, в частности клеток, поскольку он обеспечивает более высокое, чем световой микроскоп, нанометровое разрешение [6].

В соответствии с вышесказанным целью настоящей работы явилось исследование физико-химических свойств поверхности *C. albicans* методом АСМ: сканирование поверхности гриба и снятие кривых взаимодействия биоорганических структур клеточной стенки гриба со сканирующим устройством прибора.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовался штамм 30.2 *C. albicans* из коллекции ФБУН МНИИЭМ института им. Н.Г. Габричевского Роспотребнадзора. Штаммы хранились в замороженном состоянии при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Перед работой была проведена программная разморозка штамма, его восстановление и посев на плотную питательную среду Сабуро (агар). Чашки Петри хранились в стерильных условиях. Из культур микробов, выросших на Сабуро, готовили густую суспензию. Далее ее наносили на обезжиренные предметные стекла для приготовления 4 образцов, которые в последствии высушивались на открытом воздухе в стерильных условиях ламинарного бокса

и хранились до востребования. Качество приготовления микропрепаратов оценивали световой микроскопией в проходящем свете.

Для АСМ использовался микроскоп фирмы NT-MDT, модель Solver PRO. Работу вели в контактном и полуконтактном режимах. На каждом образце проводили исследование 8-11 точек, а также снимали кривые DFL(Height) при каждом подводе и отводе кантилевера. В работе сравнивали три вида кантилеверов с разными константами упругости: «мягкий» CSG 11 (константа упругости 0,03 Н/м), «средний» HA\_FM/W2C (константа упругости 3,5 Н/м), «жесткий» NSG 11(константа упругости 5,5 Н/м).

Для получения изображения сканировали участок объекта размером 5x5 nm. Для оценки качества изображения были введены два параметра - контрастность и качество изображения. Последнее оценивалось методом экспертной оценки по отсутствию визуальных дефектов: полос и пропусков отдельных областей изображения. Опираясь на качество и контрастность изображений принималось решение об эффективности режима работы прибора какой кантилевера.

Снятие кривых взаимодействия биоорганических структур клеточной стенки гриба со сканирующим устройством прибора, т.е. зависимости отклонения кантилевера от высоты расположения или расстояния до объекта, проводили в режиме «подведения» и «отведения». Полученные кривые имели типовой вид (рис. 1). Определяли следующие точки, каждая из которых имеет две координаты по оси абсцисс и ординат. В режиме «подведение» (рис. 1a): «1» – начало действия притягивающих сил на кантилевер, «2» – смена действия сил на отталкивание, «3» – силы, возникающие при непосредственном контакте с поверхностью клетки. В режиме «отведение» (рис. 1b): «1» – минимальное действие сил адгезии, «2» – максимальное проявление сил адгезии, «3» – силы, возникающие при непосредственном контакте с поверхностью клетки.

Результаты исследования подвергали стандартной статистической обработке с помощью программы STATISTICA for Windows версия 6.0. В сравнительном анализе использовали непараметрические методы Манна-Уитни и «Хи-квадрат». Критерием статистической достоверности получаемых данных считали общепринятую в медицине величину  $p < 0,05$  [7]

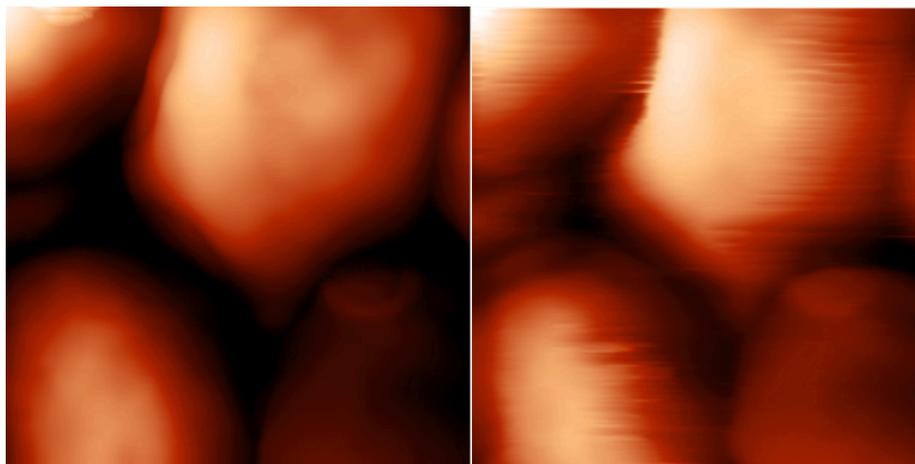
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате работы у нас получилось снять 52 изображения: 18 «мягким» кантилевером, 18 «средним» и 16 «жестким». Каждый кантилевер работал в двух режимах: контактном и полуконтактном. Соответственно половина изображений для каждого сенсора была снята одним режимом, оставшаяся часть – другим. На рисунках 2-4 представлены примеры полученных изображений для каждого режима и сенсора, а результаты экспертной оценки их качества – в таблице 1. Согласно проведенному сравнительному анализу (табл. 2) можно заключить, что для получения в АСМ изображений *S. albicans* в полуконтактном режиме лучше подходят «средний» и «жесткий» кантилеверы, а в контактном – «мягкий». При этом полуконтактный режим представляется более предпочтительным.

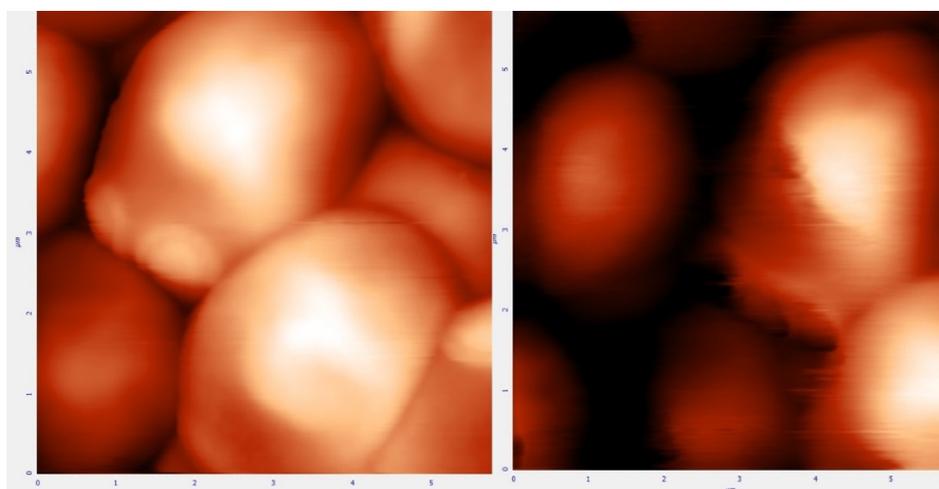
В каждой из 52 анализируемых точек был о исследовано взаимодействие биоорганических структур клеточной стенки гриба со сканирующим устройством АСМ. При проведении данного исследования проявились ограничения, связанные с характером работы прибора: в полуконтактном режиме при приближении к изучаемому объекту кантилеверы проявляли высокочастотную вибрацию, не позволяющую фиксировать контрольные точки. Кроме того, «жесткий» кантилевер не выявлял данные точки и в контактном режиме. При этом контрольные точки хорошо выявлялись в 100% случаев «мягким» и «средним» кантилеверами в контактном режиме.



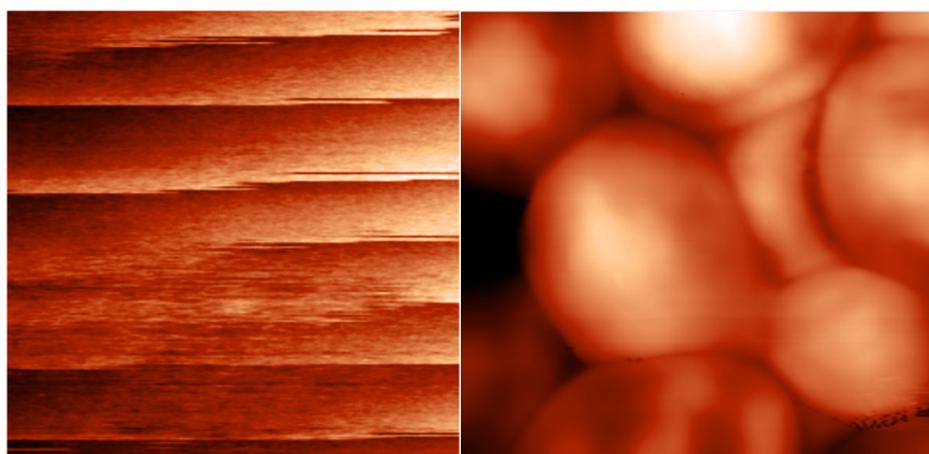
**Рисунок 1.** Примеры кривых DFL(Height) в режиме «подведение» (a) и «отведение» (b) кантилевера. По оси абсцисс показана высота (Height), измеряемая в нанометрах. По оси ординат – значение вертикального отклонения кантилевера (DFL), измеряемая в наноамперах



**Рисунок 2.** Изображение клетки *C. albicans* в полуконтактном (слева) и контактном (справа) режимах при работе «жестким» кантилевером. Изображение получено в программе Nova



**Рисунок 3.** Изображение клетки *C. albicans* в полуконтактном (слева) и контактном (справа) режимах при работе «средним» кантилевером. Изображение получено в программе Nova



**Рисунок 4.** Изображение клетки *C. albicans* в полуконтактном (слева) и контактном (справа) режимах при работе «мягким» кантилевером. Изображение получено в программе Nova

Таблица 1. Результаты оценки качества изображений

Сенсор	Метод	Количество изображений	Контрастность		Отсутствие дефектов сканирования	
			n	%	n	%
«Мягкий»	Контактный	9	9	100,0	8	88,9
	Полуконтактный	9	0	0,0	0	0
«Средний»	Контактный	9	3	33,3	0	0
	Полуконтактный	9	9	100,0	8	88,9
«Жесткий»	Контактный	8	5	62,5	1	12,50
	Полуконтактный	8	6	75,0	5	62,50

Таблица 2. Сравнение эффективности сенсоров по параметрам оценки качества изображения при разных режимах сканирования

	Контактный режим		Полуконтактный режим	
	Контрастность	Отсутствие дефектов	Контрастность	Отсутствие дефектов
«Мягкий»/ «Средний»	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001
«Мягкий»/ «Жесткий»	<0,05	<0,01	<0,01	>0,05
«Средний»/ «Жесткий»	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Таблица 3. Сравнительная эффективность кантилеверов в режиме «подведения»

Характеристика	Точка	Кантилевер		К	p
		«Мягкий»	«Средний»		
Height	«1»	208,55 +- 25,44	174,7125 +- 9,88	1,19	>0,05
	«2»	199,80625 +- 26,08	171,74375 +- 9,92	1,16	>0,05
	«3»	0	0	0	-
DFL	«1»	482,95625 +- 46,18	-144,4375 +- 28,32	-3,34	<0,05
	«2»	432,1875 +- 42,86	-195,5625 +- 26,12	-2,21	<0,05
	«3»	1496,1875 +- 80,45	- 1246,04375 +- 84,22	1,20	<0,05

В таблице 3 отражены результаты измерения значений координат (Height и DFL) точек исследуемых графиков в режиме «подведения» различными сенсорами. Среднее значение Height для «1» точки, измеренное мягким сенсором, несущественно отличается от значения, полученного «средним» сенсором ( $p > 0,5$ ). Для «2» и «3» точек отличие также несущественно ( $p > 0,5$ ). Для характеристики DFL значения всех трех точек, полученных «мягким» и «средним» сенсорами, оказались существенно отличными ( $p < 0,05$ ).

Таблица 4 содержит аналогичную информацию для режима «отведения». Среднее значение для высоты в «1» точке, измеренное «мягким» сенсором, значительно отличается в 1,64 ( $p < 0,05$ ) раза от данного значения, измеренного «средним» сенсором. Значение для «2» точки также существенно отличается в 1,86 раза ( $p < 0,05$ ). Аналогичные значения для «3» точки существенно не отличаются ( $p > 0,05$ ). Результаты для DFL получились следующие: «1» точка существенно отличается в -3,18 раза ( $p < 0,05$ ), а «2» и «3» несущественно в 0,87 ( $p > 0,05$ ) и 1,18 ( $p > 0,05$ ), соответственно.

Таблица 4. Сравнительная эффективность кантилеверов в режиме «отведения».

Характеристика	Точка	Кантилевер		К	р
		«Мягкий»	«Средний»		
Height	«1»	371,7625 +- 32,92	226,76875 +- 9,93	1,64	<0,05
	«2»	367,0625 +- 33,74	197,90625 +- 10,51	1,86	<0,05
	«3»	0	0	0	-
DFL	«1»	488,875 +- 47,55	-153,6875 +- 31,45	-3,18	<0,05
	«2»	-234,75 +- 56,97	-271,1875 +- 28,75	0,87	>0,05
	«3»	1540,25 +- 82,81	1309,625 +- 86,03	1,18	>0,05

Таблица 5. Сравнение способности сенсоров детектировать отличия между точками

Характеристика	Режим	Сенсор	Сравниваемые точки		
			«1»/ «2»	«1»/ «3»	«2»/ «3»
Height	«Подведение»	«Мягкий»	-	<0,05	<0,05
		«Средний»	-	<0,05	<0,05
	«Отведение»	«Мягкий»	-	<0,05	<0,05
		«Средний»	<0,05	<0,05	<0,05
DFL	«Подведение»	«Мягкий»	-	<0,05	<0,05
		«Средний»	<0,05	<0,05	<0,05
	«Отведение»	«Мягкий»	<0,05	<0,05	<0,05
		«Средний»	<0,05	<0,05	<0,05

Для сравнения эффективности «мягкого» и «среднего» сенсора по фиксированию контрольных точек полученные результаты были сведены в таблице 5. Как можно видеть, «мягкий» сенсор чаще «допускал» ошибку при исследовании такого объекта, как *Candida albicans*.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы показали, что АСМ успешно позволяет визуализировать такой микроскопический объект, как дрожжеподобные грибы рода *Candida*, и изучать интегральные физико-химические характеристики биоорганических структур ее клеточной стенки.

В настоящем исследовании, хотя и на ограниченном количестве образцов, испытание было проведено параллельно в контактном и полуконтактном режимах и несколькими кантилеверами при их отведении и подведении, что уже на этом этапе позволяет наметить оптимальный режим дальнейших исследований исследования физико-химических свойств данного объекта методом АСМ.

Наши результаты только частично сошлись с работами ученых, исследующих *C. albicans*. Полученные нами результаты согласуются с данными, полученными [8,9] при отработке режимов исследования *C. albicans*. В тоже время, они противоречат способу детектировать кривые зависимости силы от расстояния Sofiane El-Kirat-Chatel et al. [10]. Действительно *C. albicans* лучше подвергается визуализации в полуконтактном режиме при использовании сенсоров с низкой константой упругости. Однако, в нашей работе было показано, что «средний» кантилевер обладает большей чувствительностью, нежели «мягкий», которым обычно пользуются ученые для изучения физико-химических свойств клеточной стенки *C. albicans*, а «жесткий», в тоже время, малопригоден. Совершенно очевидно, что в такой ситуации для преодоления разногласий и выработки эффективных режимов атомно-силовой микроскопии *C. albicans* необходимо продолжить начатое нами исследование на большей выборке.

### ВЫВОДЫ

1. *C. albicans* может успешно изучаться методом АСМ.
2. Для визуальной оценки в контактном режиме оказался эффективным «мягкий» кантилевер, а в полуконтактном – «средний».
3. «Средний» кантилевер обладает большей эффективностью при исследовании структур *C. albicans* по сравнению с «мягким», так как он оказался более результативным по отношению к характеристике Height при «отведении» и DFL при «отведении».
4. При АСМ *C. albicans* характеристика DFL обладает большей чувствительностью и эффективностью, по сравнению Height, так как хорошо дифференцируется при «отведении» и «подведении».

**Список литературы / References:**

1. Lopes-Colombo A., Guimaraes T., Camargo L.F.A., Richtmann R. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2013, vol. 17, iss. 3, pp. 283-312.
2. Аравийский Р.А., Клишко Н.Н., Горшкова Г.И. Кандидозный сепсис. *Диагностика микозов*. [Arabian R.A., Klimko N.N., Gorshkova G.I. Candidal sepsis. *Diagnosis of mycoses*. (In Russ.)]
3. Gazzard B. Fungal infection of the gastrointestinal tract. *Principles and Practice of Clinical Mycology*, 1996, pp. 165-177.
4. Martha F. Mushi et al. High Oral Carriage of Non-*albicans* *Candida* spp. among HIV-infected individuals. *International Journal of Infectious Diseases*, 2016, vol. 49, pp. 185-188.
5. Воропаев А.Д., Екатеринчев Д.А., Воропаева В.А., Лиханская Е.И., Несвижский Ю.В. Мутации в гене ERG11 *Candida albicans*, выделенных у ВИЧ-инфицированных пациентов. *Проблемы медицинской микологии*, 2021, т. 23, № 2, с. 68. [Voropaev A.D., Ekaterinchev D.A., Voropaeva V.A., Likhanskaya E.I., Nesvizhsky Yu.V. Mutations in the ERG11 gene of *Candida albicans* isolated from HIV-infected patients. *Problems of medical mycology*, 2021, vol. 23, no. 2, p. 68. (In Russ.)]
6. Webb H.K., Truong V.K. et al. Physico-mechanical characterisation of cells using atomic force microscopy. Current research and methodologies. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, vol. 86, pp. 131-139.
7. Урбах В.Ю. *Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях*. М.: 1975, 295 с. [Urbach V.Yu. *Statistical analysis in biological and medical research*. M.: 1975, 295 p. (In Russ.)]
8. Kasas S. et al., AFM contribution to unveil pro- and eukaryotic cell mechanical properties. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, vol. 73, pp. 177-187.
9. Khatiwada D., Lamichhane S.K., A Brief overview of AFM Force distance spectroscopy. *The Himalayan Physics*, 2011, vol. 2, no. 2, pp. 80-83.
10. Sofiane El-Kirat-Chatel et al. Nanoscale analysis of caspofungin-induced cell surface remodelling in *Candida albicans*. *Nanoscale*, 2013, vol. 5, no. 3, pp. 1105-1115.

**APPLYING ATOMIC FORCE MICROSCOPY FOR WORK WITH THE CELL SURFACE OF CANDIDA ALBICANS****Filippova E.M., Nesvizhskiy U.V., Titov S.A., Glukhov A.I.**

Sechenov University (MSMU)

Trubeckaya 8, Moscow, Russia; e-mail: elizaveta.filippova97@yandex.ru

**Abstract.** *Candida albicans* is a yeast-like fungus that lives on people's mucous membranes and skin and does not cause infections. However, it plays a role in the development of opportunistic infections in immunocompromised people. In this work, we would like to evaluate the possibility of studying the cell wall of *C. albicans* by atomic force microscopy, as well as compare the operating modes of the microscope and choose the most optimal one for working with the fungus. Atomic force microscopy is a powerful tool for evaluating surfaces, including the cell walls of biological objects. The microscope is capable of operating in different modes, but in this work we compared two of them: contact and semi-contact. These methods are the most popular for evaluating the surfaces of biological objects. Comparison of the modes was carried out on the *C. albicans* strain. The surface of the strain was scanned by atomic force microscopy, and the curves of the dependence of the sensor deviation from the distance to the object were recorded. Scanning and recording of curves were carried out in two modes of operation of the microscope: contact and semi-contact, as well as three sensors: soft, medium and hard. As a result of the study, the optimal sensor and mode for atomic-force microscopy were selected.

**Key words:** Atomic-force microscope, *Candida Albicans*.