

© М.В. НИКОЛЕНКО, Т.Х. ТИМОХИНА

*nikolenko-marina@mail.ru*

УДК 616. 992:576.8

## НОВЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ CANDIDA KRUSEI

*АННОТАЦИЯ.* Хронобиологический метод позволил выявить и изучить патогенные свойства грибов *Candida krusei* при *Candida* — носительстве и кандидозе. Экспериментально установлено, что у клинических изолятов грибов данного вида отмечены пики биологической активности только в вечерний и ночной период.

*SUMMARY.* The chronobiological method made it possible to reveal and investigate the pathogenic features of *Candida krusei* fungi in *Candida* — carriage and candidosis. The experiment showed that clinical isolates of this fungi species have activity peaks only in evening and night time.

*КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА.* Биологические свойства, биоритм, *Candida krusei*.

*KEY WORD.* Biological features, biorhythm, *Candida krusei*.

За последние десятилетия на смену традиционным возбудителям пришли условно-патогенные микроорганизмы. В их ряду *Candida* spp. занимают одну из ведущих позиций. Относительно высокая устойчивость грибов в макроорганизме не является абсолютным условием для реализации их патогенных свойств. Обнаружение дрожжей у здоровых людей в титре  $10^2$  КОЕ/мл (колониеобразующие единицы в мл) без клинических симптомов и без существенного увеличения количества является лишь показателем носительства [1].

Однако, являясь комменсалами, они могут стать причиной широкого спектра заболеваний — от неопасных поражений до жизнеугрожающих инвазивных процессов в любых органах. В 57% случаев возбудителем кандидоза является вид *Candida albicans* (*C. albicans*), в остальных — виды *Candida non-albicans* (*C. non-albicans*): *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* и др [2].

До последнего времени при определении этиологии неспецифических инфекций решающее значение придавалось численности обнаруженных условно-патогенных микробов в пораженном органе, а в случае микст — инфекции — установлению количественных соотношений между ассоциантами. Вместе с тем, в подобных ситуациях более существенным признается определение у выделенных культур факторов патогенности [3]. Успехи в изучении биологии грибов позволили охарактеризовать отдельные факторы адгезии и инвазии только у *C. albicans* [4], [5]. Открытым и дискуссионным остается вопрос относительно синтеза факторов патогенности *C. non-albicans*. В данной группе возбудителей менее изучены биологические свойства у *C. krusei*. Есть сведения, что микробы этого вида, не способны секретировать фосфолипазу, протеазу и каталазу [6], [7].

К сожалению, в настоящее время практически отсутствуют систематизированные сведения о комплексном анализе патогенных свойств *C. krusei*, позволяющих однозначно охарактеризовать патогенность штамма, разграничивая кандидоносительство и кандидоз.

При отсутствии единых стандартов по набору изучаемых параметров и условиям их определения для грибов *C. krusei* возникла необходимость накопления и обобщения максимально большего количества наблюдений в этой области. На наш взгляд, изучение биологических свойств в суточном аспекте открывает новые возможности в решении данного вопроса.

**Цель:** изучить биологическую активность *C. krusei* в течение суток.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования служили 6 культур *C. krusei*, выделенные из кишечника в  $10^2$  степени высеваемости от здоровых людей-носителей при обследовании микробиоценоза изучаемого биотопа и 6 вариантов *C. krusei* получены от больных с диагнозом «кандидоз кишечника» в  $10^6$  КОЕ/мл. Данные культуры обладали типичными для своего вида морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами. Все тест-штаммы выращивали на среде Сабуро. В экспериментах использовали 24-часовую культуру, которая соответствовала начальному этапу стационарной фазы роста. В работе изучали способность грибов к быстрому росту и размножению и их ферментативную активность, как источник питания и получения энергии. Эти биологические параметры имеют огромное значение для активной жизнедеятельности микроорганизмов и характеризуют их патогенность [8].

Биоритмы пролиферативной активности определяли по разработанной методике на кафедре микробиологии Тюменской медицинской академии (патент на изобретение № 2285258). Результат оценивали в КОЕ/мл [9]. Активность фосфолипазы  $A_2$  определяли традиционным титрометрическим способом в модификации С.Н. Суплотова с соавт. [10] и оценивали в млмоль/л.час. Для изучения активности протеазы использовали биуретовый метод. Единицы измерения — мг/мин·мл [11]. Каталазную активность регистрировали в мкмоль/мин [12]. Исследования проводились в зимнее время года с учетом фазы Луны (IV фаза) с 4-х часовым интервалом в течение суток.

Все результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента с помощью процессора электронных таблиц Microsoft Office Excel 2010. Сравнительная характеристика биологических свойств между изолятами грибов, выделенных от здоровых и больных пациентов, проводилась с применением критерия Манна-Уитни (U). Анализируемые различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

Хронодизайн исследований подразумевал получение по каждой оцениваемой функции 6-ти измерений в сутки с 5-ти кратным повторением условий эксперимента. Данные были обработаны по методу наименьших квадратов (косинор-анализ) при заданной значимости достоверности  $p < 0,05$  [14]. Для каждого штамма впоследствии определены основные параметры ритмов с периодами  $T=12$  и  $T=24$  часа: мезор — среднее значение изучаемого параметра, амплитуда ритма — наибольшее отклонение показателя от мезора и акрофаза — момент времени, когда отмечалось максимальное значение исследуемого параметра. Для анализа хронограмм применен метод популяционного косинор-анализа, реализованного в виде прикладной программы «Групповой косинор — анализ» [15].

**Результаты и их обсуждение.** Изучение биологических свойств изолятов *S. krussei* в течение суток позволило выявить наличие у них физиологической активности. В первой серии экспериментов исследовали хронопоказатели культур, выделенных при нормобиоценозе. Установили достоверные циркадианные (околосуточные) ритмы активности пролиферации, фосфолипазы, протеазы и каталазы ( $p < 0,05$ ). Циркадианная ритмичность всех показателей свидетельствует о стабильности биологических свойств и успешной адаптации [16] гриба к биотопу макроорганизма. У *S. krussei* регистрировалась высокая скорость роста. Среднесуточные показатели пролиферации зафиксированы у разных культур ( $n=6$ ) в пределах от  $139,4 \pm 11,5$  КОЕ/мл до  $171,9 \pm 24,9$  КОЕ/мл. Амплитуда колебаний составила в среднем  $190,9 \pm 9,6$  КОЕ/мл с максимальными значениями активности в 24.00 часа (табл. 1).

Таблица 1

**Ритмометрические параметры биологической активности изолятов *S. krussei*, выделенных из организма здорового человека**

Активность	Вклад ритма, %	Мезор М $\pm$ м,	Амплитуда	Акрофаза, час
	24-часовой 12-часовой		24-часовой 12-часовой	24-часовой 12-часовой
Пролиферации, КОЕ/мл	68,4* 17,9	151,9 $\pm$ 14,9	190,9 $\pm$ 9,6* 34,6 $\pm$ 5,9	24.00 04.45
Фосфолипазы, мкмоль/л. час	66,6* 29,0	7,7 $\pm$ 0,4	17,0 $\pm$ 2,1* 5,1 $\pm$ 0,7	04.16 06.20
Протеазы, мг/мин·мл	74,1* 20,2	0,12 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,04 0,07 $\pm$ 0,01	05.19 16.00
Каталазы, мкмоль/мин	61,5* 8,3	0,22 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,02 0,05 $\pm$ 0,01	05.30 08.38

Примечание: \* —  $p < 0,05$

Установлено, что изоляты *S. krussei* у здоровых людей наиболее агрессивны в утреннее время, с 04.00 до 05.30 часов. В этот период времени грибы активно секретировали ферменты за пределы клетки, катализировали гидролитическое расщепление жирных кислот в фосфолипидах, разрушали иммуноглобулины и повышали устойчивость грибной клетки к кислородзависимым бактерицидным механизмам фагоцитов [6], [17], что способствует пенетрации и инвазии. В остальное время суток активность ферментов агрессии была очень низкой.

Во второй серии экспериментов исследовали хроноинфраструктуру изолятов *S. krussei*, полученных в клинически манифестируемой степени высеваемости —  $10^6$  КОЕ/мл. В этой группе у всех культур микромицетов ( $n=6$ ), установлена ультрадианная (ок. 12-часовая) ритмичность физиологической активности (табл. 2). Увеличение числа колебаний имеет биологический смысл, так как свидетельствует о функциональной экономии организма в условиях напряженного выброса ферментов и увеличения численности популяции [18].

Таблица 2

**Ритмометрические параметры биологической активности изолятов *S. krusei*, выделенных из организма больного кандидозом человека**

Активность	Вклад ритма, %	Мезор M±m	Амплитуда	Акрофаза, час
	24-часовой 12-часовой		24-часовой 12-часовой	24-часовой 12-часовой
Пролиферации, КОЕ/мл	23,0 69,7*	31,0±5,9	12,5±2,5 30,3±3,4*	03.26 23.30
Фосфолипазы, мкмоль/л. час	41,5* 56,1*	10,5±1,1	5,4±1,4 7,3±2,1	03.20 01.12
Протеазы, мг/мин·мл	24,3 65,6*	0,23±0,03	0,11±0,02 0,21±0,03	04.20 02.14
Каталазы, мкмоль/мин	21,3 68,7*	0,28±0,02	0,05±0,01 0,11±0,03	04.20 07.23

Примечание: \* —  $p < 0,05$

При кандидозе у *S. krusei* наблюдалось изменение профилей ритма и увеличение амплитуды колебаний ферментативной активности. Зафиксировано снижение среднесуточных показатели пролиферации в 4,9 раз ( $T = 34,0$ ;  $p < 0,05$ ), на фоне усиления синтеза фосфолипазы в 1,4 раза, протеазы в 1,9 раз ( $T = 37,0$ ;  $p < 0,05$ ) и каталазы в 1,4 раза. Суточные критерии изучаемых свойств грибов сравнивали с полученными данными у микроорганизмов при нормобиоценозе (рис. 1).

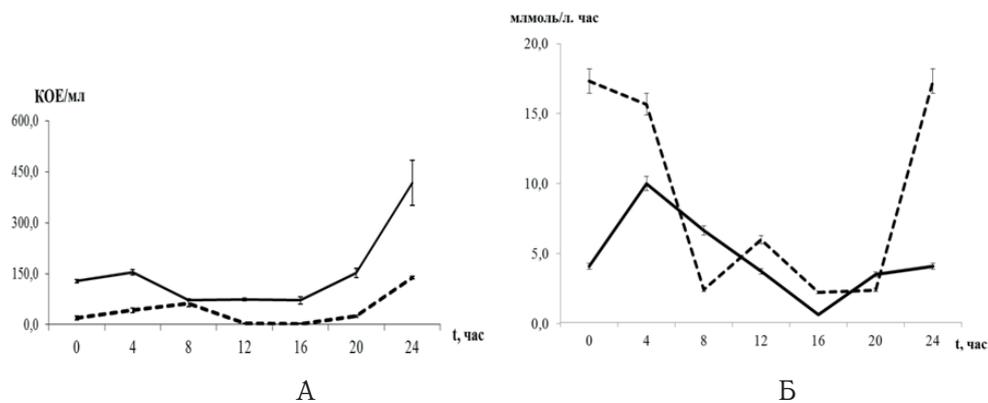


Рис. 1. Биологическая активность клинических изолятов *S. krusei* в течение суток.  
Примечание: А) пролиферация; Б) фосфолипаза.

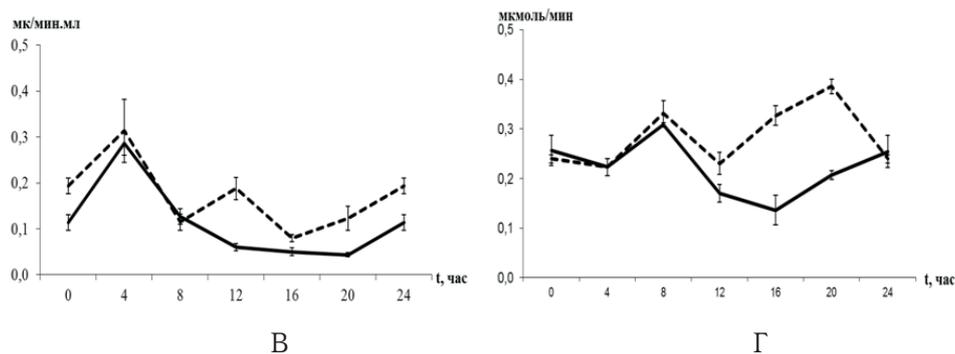


Рис. 1. Биологическая активность клинических изолятов *S. krusei* в течение суток.

Примечание: В) протеаза; Г) каталаза.

по оси абсцисс — время суток, часы;

по оси ординат — КОЕ/мл (А); мкмоль/л. час (Б); мг/мин·мл (В); мкмоль/мин (Г).

— — — — — биологическая активность грибов при *Candida*-носителстве

- - - - - биологическая активность грибов при кандидозе

Далее сопоставили основные ритмометрические параметры различных уровней интеграции и выявили амплитудно-фазовую стабильность физиологических свойств микроорганизмов при *Candida*-носителстве и кандидозе. Местоположения доверительных эллипсов (контуры которых отграничивают область двумерного пространства — амплитуд и фаз) отражают максимальную временную зону проявления биоритмов.

Экспериментально доказано, что у *S. krusei* при кандидозе сохранялся ночной тип ритмичности, характерный для культур, полученных при нормобиоценозе. Отмечены значительные промежутки времени отсутствия биологической активности с 04.30 до 20.00 часов (рис.2). (Возможно, этим можно объяснить не выявление факторов патогенности или определение их в минимальных концентрациях у культур *S. krusei* в лабораториях с обычным режимом работы.)

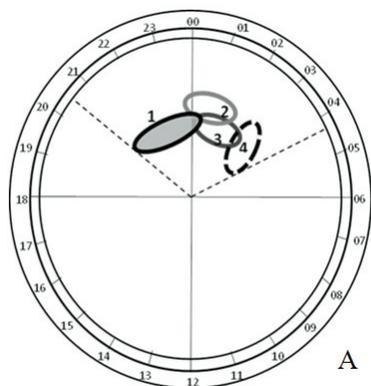


Рис. 2. Сравнительная характеристика амплитудно-фазовой стабильности биологических свойств *S. krusei*; T=24 часа

Примечание:

А) культуры, выделенные от носителей;

1) пролиферация; 2) фосфолипаза; 3) протеаза; 4) каталаза.

По окружности — время суток, часы.

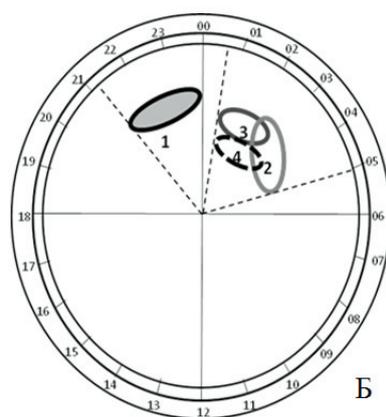


Рис. 2. Сравнительная характеристика амплитудно-фазовой стабильности биологических свойств *C. krusei*; T=24 часа

Примечание:

Б) культуры, выделенные от больных кандидозом пациентов.

1) пролиферация; 2) фосфолипаза; 3) протеаза; 4) каталаза.

По окружности — время суток, часы.

При оценке пространственно-временной организации у изолятов *C. krusei* независимо от степени высеваемости установлено, что реализация биологического потенциала начиналась с колонизации поверхности за счет высокой скорости размножения в 21.00-24.00 часа, затем с 24.00 до 05.30 часов грибы активно выделяли ферменты агрессии и защиты — протеазу, фосфолипазу, каталазу. В результате нескольких серий суточных исследований при одинаковых условиях проведения экспериментов были получены идентичные результаты. (Этот факт позволил предположить, что хроноинфраструктура изученных временных рядов биологической активности (пролиферативной и ферментативной) является видовым генетически детерминированным признаком изолятов *C. krusei*.)

Таким образом, хронобиологический подход к изучению биологии позволяет расширить представление о биологических свойствах грибов, их согласованном проявлении в различное время суток, что может быть использовано для разработки новых методов диагностики микозов.

#### **Выводы:**

1. Амплитудно-фазовая оценка суточных ритмов физиологических функций клинических изолятов *C. krusei* можно считать объективной характеристикой вида.

2. Совокупность параметров суточных ритмов пролиферативной и ферментативной активности *C. krusei* можно использовать в качестве критериев при дифференциации носительства и кандидоза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хмельницкий О.К. О кандидозе слизистых оболочек // Архив патологии. 2000. Т. 62. С. 3-10.
2. Candida. Кандидозы. Лабораторная диагностика / Под ред. проф. Н.П. Елинова. СПб.: Коста, 2010. 224 с.
3. Дробкова В.А. Биологические особенности грибов рода *Candida*, изолированных из вагинального биотопа женщин репродуктивного возраста: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Пермь, 2010. 22 с.
4. Лисовская С.А. Новый подход к оценке патогенного потенциала клинических штаммов *Candida albicans*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Казань, 2008. 25 с.
5. Свиридов М.А. Влияние различных факторов на адгезивные свойства *C. albicans* на поверхности вагинальных эпителиоцитов женщин репродуктивного возраста: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2008. 142 с.
6. Карпунина Т.И., Олина А.А., Машуров М.Г. Фосфолипазы оппортунистических грибов: их возможная роль в патогенезе и диагностике микозов // Проблемы медицинской микологии. 2006. Т. 8 № 4. С. 41-46.
7. Ozutsumi, K., Sugimoto, N. and Matsuda, M. Appl. Environ. Microbiol. 1985. №49. P. 939-943.
8. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. СПб.: Специальная литература, 1998. 592 с.
9. Патент на изобретение № 2285258. Способ диагностики госпитальных штаммов. 2006. 11 с.
10. Суплютов С.Н., Журавлева Т.Д. Адаптация человека к авиационным полетам. Липопероксидация в эритроцитах и ее регуляция. Методы лабораторной диагностики. Тюмень: Печатник, 2009. 104 с.
11. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова М.: Академия, 2005. 608 с.
12. Бухарин О.В., Черкасов С.В., Сгибнев А.В. Влияние микробных метаболитов на активность каталазы и рост *Staphylococcus aureus* 6538 P // Бюлл. эксп. Биологии. 2000. Т. 130. № 7. С. 80-82.
13. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика, 1999. 459 с.
14. Nelson, W., Tong, Y.L., Lee, J.K. Methods for cosinorhythmometry // Chronobiologia. 1979. Vol. 6. № 4. P. 305-323.
15. Авторское свидетельство № 2009614932. Автоматизированная система «Косинор-анализа». 2009. № 4. 10 с.
16. Хронобиология и хронокардиология / Под ред. В.П. Фролова, С.М. Чибисова. М.: Изд-во УДН. 1988. 52 с.
17. Брудастов Ю.А., Сборец Т.С., Дерябин Д.Г. Активность каталазы и супероксиддисмутазы при их персистенции в макроорганизме // ЖМЭИ. 2001. № 2. С. 13-16.
18. Хетагурова Л.Г. // Тез. докл. конф. «Хронопатофизиология — новое направление классической патофизиологии». Владикавказ, 2008. С. 47-55.