

© М.В. НИКОЛЕНКО

Тюменская государственная медицинская академия
nikolenko-marina@mail.ru

УДК 616. 992:576

**МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ВРЕМЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ CANDIDA ALBICANS
ПРИ АССОЦИАТИВНОМ СИМБИОЗЕ**

**MECHANISMS OF FORMATION OF THE TEMPORAL ORGANIZATION
OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF CANDIDA ALBICANS
IN ASSOCIATIVE SYMBIOSIS**

АННОТАЦИЯ. Временная организация физиологической активности эталонного штамма является видовым признаком *C. albicans*. Экспериментально установлены универсальные ритмометрические характеристики (вклад ритма и амплитудно-фазовая стабильность), различающие штаммы, полученные от здоровых людей от изолятов, выделенных от больных пациентов. Впервые выявлены механизмы формирования временной организации физиологических свойств *C. albicans*, полученных из организма человека. Установлено, что последовательность и согласованность физиологической активности во времени у *C. albicans*, обитающих в организме здорового человека, может формироваться под действием продуктов жизнедеятельности бактерий, представителей дисбиотической микробиоты, что отражает симбионтные отношения патогенов в микросимбиозе. Сочетанное действие продуктов жизнедеятельности нормофлоры биотопа с субфунгиостатическими концентрациями антимикотика привело к преобразованию временной организации эталонного штамма в хроноинфраструктуру, характерную для грибов, изолированных от больных кандидозом. Доказано, что одним из механизмов адаптации грибов *C. albicans* к факторам среды является изменение ритмов интенсивности физиологических процессов.

SUMMARY. The temporal organization of physiological activity of the reference strain is a species characteristic of *C. albicans*. We have established the universal rhythmometric characteristics (rhythm contribution; phase and amplitude stability), which differentiate the strains obtained from healthy people from the isolates received from patients. For the first time we determine the mechanisms of formation of the temporal organization of the physiological properties of *C. albicans* obtained from the human body. It is established that the temporal pattern of *C. albicans*' physiological activity in the healthy human body may be influenced by bacterial metabolites, representatives of dysbiotic microbiota, which reflects the symbiotic relationship of pathogens in microsymbiocoenosis. The combined effect of metabolic products of the biotope's normal flora with subfungiostatic

concentrations of antimycotics leads to conversion of the reference strain's temporal organization into a chrono-infrastructure characteristic of fungi isolated from patients with candidiasis. It is proved that one of the environmental adaptation mechanisms of fungi C. albicans is changing rhythms of their physiological processes.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. *Временная организация, биологическая активность грибов, Candida albicans.*

KEY WORDS. *Temporal organization, biological activity of fungi, Candida albicans.*

Проблемой современной биологии и медицины является изучение вопросов адаптации, которые тесно связаны с вопросами биоритмологии, так как ритмы охватывают все проявления живого — от деятельности субклеточных структур и отдельных клеток до сложных форм поведения организма и экологической системы, символизируя саму жизнь [1]. Автономный самоподдерживающийся процесс периодического чередования состояний клетки и колебаний интенсивности физиологических процессов, с одной стороны, достаточно стабилен и по возможности не зависим от многочисленных случайных воздействий за счет своей внутренней синхронизации, с другой — лабилен, постоянно подстраивается к новой среде обитания [2]. Поэтому поиск новых факторов, играющих роль сигналов, информирующих организм и активно участвующих в его приспособительных перестройках в связи с предстоящими изменениями параметров окружающей среды, актуальны для понимания адаптивных возможностей биосистемы [3].

Цель: выявить механизмы формирования временной организации биологических свойств *C. albicans* в системе ассоциативного симбиоза.

Материалы и методы. Для исследования ритмичности биологических свойств были использованы 10 свежевыделенных клинических изолятов *C. albicans* из кишечника здоровых и больных кандидозом людей. Контролем служил эталонный штамм *C. albicans* 24433 АТСС. Выделение и идентификацию грибов проводили по комплексу признаков: внешнему виду колоний, хламидоспорообразованию, тесту на образование ростовых трубок, чувствительности к антифунгальным препаратам диско-диффузионным методом, ассимиляционной способности [4].

Биологические свойства бластомицетов: активность пролиферации [5], морфогенеза [4] и фосфолипазы [6] изучали в течение двух суток с 4-часовым интервалом, в зимнее время года, IV фаза Луны.

Исследование биологических свойств грибов под действием доминантных и ассоциативных бактерий проводили по методу Н. Б. Перуновой [7]. В качестве доминантов использовали *Bifidumbacterium bifidum* (*B. bifidum*) № 791 («Бифидумбактерин»), ассоциантами являлись: *Escherichia coli* (*E. coli*) лактозопозитивная негемолитическая 301, *E. coli* № 111 лактозонегативная, гемолитическая *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) № 104, изолированные от пациентов при обследовании на дисбиоз кишечника. Воздействия флуконазола на биоритмы биологических свойств эталонного штамма *C. albicans* определяли по стандартной методике серийных разведений [8]. В качестве антимикотика был выбран флуконазол, так как он широко используется в лечении поверхностного и глубокого кандидоза.

Хронодизайн исследований подразумевал получение по каждой оцениваемой функции 6-ти измерений в сутки с 3-5-кратным повторением условий эксперимента. Данные были обработаны по методу наименьших квадратов (косинор-анализ) при заданной значимости достоверности, $p < 0,05$ [9]. Для каждого штамма впоследствии определены основные параметры ритмов с периодами $T=12$ и $T=24$ часа: амплитуда ритма — расстояние от экстремума до мезора и акрофаза — момент времени ожидаемого экстремума функции. Для выявления степени межиндивидуальной синхронизации ритмов использован популяционный косинор-анализ.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследований выявлена суточная динамика биологических показателей всех изучаемых свойств у эталонного штамма. При длительном культивировании *in vitro* биоритмы могут переходить на собственную частоту, проявляя тем самым свой собственный период, закрепленный в геноме вида [10]. В ходе экспериментов у штамма *S. albicans* ATCC выявлены ультрадианные (12-часовые) ритмы пролиферативной и морфологической активности ($p < 0,05$). Ведущим ритмом активности фосфолипазы являлся циркадианный (околосуточный) ритм ($p < 0,05$). Многократно проведенные эксперименты показали идентичные результаты. Следовательно, у музейного штамма есть внутренние механизмы, «биологические часы», позволяющие чувствовать течение времени и измерять его промежутки.

На следующем этапе установлено, что последовательность и согласованность биологических свойств клинических изолятов *S. albicans* во времени зависит от состояния здоровья пациента. У грибов, полученных от здоровых людей, выявлен околосуточный циркадианный ритм всех исследуемых свойств ($p < 0,05$). У микромицетов, полученных от больных острой кандидозной инфекцией, регистрировался ультрадианный вклад ритмов ($p < 0,05$).

Анализ фактического материала показал, что амплитудно-фазовая характеристика биологической активности грибов может служить маркером патогенности. Доказано, что временная организация биологических функций *S. albicans*, выделенных от здоровых людей, аналогична хроноинфраструктуре музейного штамма, но наблюдалось смещение акрофазы пролиферативной активности на ночное время 23.00-24.00 часов ($p < 0,05$). У микроорганизмов, выделенных из кишечника больных кандидозом пациентов, показатели морфогенеза и фосфолипазы зафиксированы в ночное и дневное время, а максимальная активность роста зарегистрирована в утренние и вечерние часы (рис. 1).

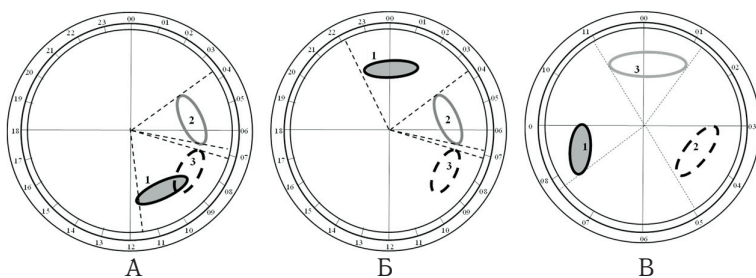


Рис. 1. Амплитудно-фазовая характеристика биологических свойств музейного штамма *S. albicans* (А), изолятов, выделенных от здоровых лиц (Б), изолятов от больных кандидозом (В).

Примечание: 1) пролиферация; 2) морфогенез; 3) фосфолипаза.
По окружности — время суток, часы

Корреляционный анализ выявил четкую обратную зависимость между ростовой способностью и активностью патогенных характеристик (морфогенезом, фосфолипазой) у изолятов, полученных от здоровых лиц, и прямую корреляцию всех свойств культур, полученных от больных пациентов ($p < 0,05$)

Следовательно, ритмичность изучаемых свойств клинических изолятов *S. albicans* изменялась в организме человека под влиянием внешних факторов. Для выявления механизмов формирования хроноинфраструктуры данных изолятов, на музейный штамм с генетически запрограммированными «биологическими часами» влияли метаболитами микросимбионтов. В качестве доминантов выбраны *B. bifidum*, именно они являются важнейшими представителями облигатной микрофлоры кишечника [11]. Одной из функций бифидофлоры является поддержание нормального микроэкологического статуса занимаемого биотопа [12]. Микросимбионты *S. aureus* и *E. coli* «lac-», характерны для дисбиоза кишечника, и обычно обнаруживаемые в большом количестве на фоне дефицита бифидофлоры [11], чаще высеваются с грибами рода *Candida*.

В присутствии метаболитов *S. aureus* и *E. coli* «lac-» у эталонного штамма *S. albicans* выявлено смещение акрофазы пролиферативной активности с дневного времени на ночные часы ($p < 0,05$) (рис. 2).

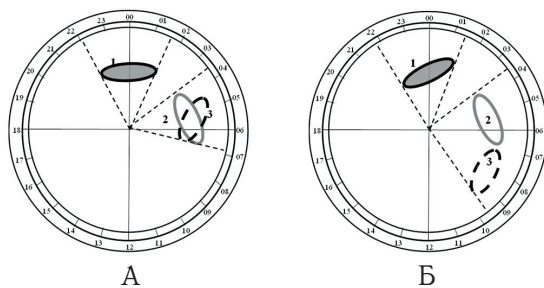


Рис. 2. Амплитудно-фазовая характеристика биологических свойств *S. albicans* ATCC после воздействия экзометаболитов *S. aureus* (А); после воздействия экзометаболитов *E. coli* «lac-» (Б); T=24 часа.

Примечание: 1) пролиферация; 2) морфогенез; 3) фосфолипаза.
По окружности — время суток, часы.

Корреляционный анализ биологических свойств *S. albicans* выявил согласованность физиологической активности грибов, свойственную культурам, полученным от здоровых лиц ($p < 0,05$).

Для выявления регуляторов ритмичности, характерной для микромицетов при кандидозе, на эталонный штамм *S. albicans* воздействовали субфунгиостатическими концентрациями флуконазола. Данные концентрации антимикотика у *S. albicans*, проявляющего к нему чувствительность, нарушали исходную архитектуру ритмов: регистрировалось снижение мезора, резкое уменьшение амплитуды, асинхронность вплоть до противофазности, наличие достоверных ультрадианных гармоник физиологической активности ($p < 0,05$).

При сочетанном действии флуконазола и экзометаболитов бактерий *B. bifidum*, *E. coli* «lac+», *E. coli* «lac-», *S. aureus* метаболиты не влияли на спектральный состав биоритмов изучаемых свойств. Преобладала ультрадианная ритмичность биологической активности *S. albicans* ($p < 0,05$). Следовательно, вклад ритма эталонного штамма изменился именно под действием флуконазола.

Сочетанное действие продуктов жизнедеятельности нормофлоры - *V. bifidum*, *E. coli* «Iac+» дистального отдела толстого кишечника с субфунгиостатическими концентрациями антимикотика привело к трансформации временной организации эталонного штамма в «хроном», характерный для грибов, изолированных от больных кандидозом (рис. 3).

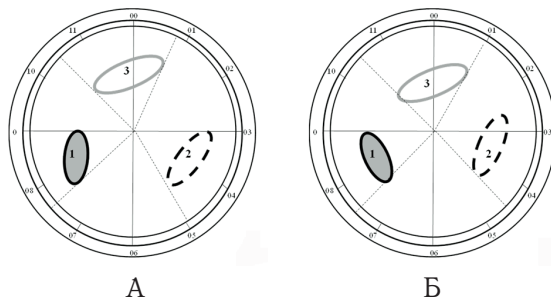


Рис. 3. Амплитудно-фазовая характеристика биологических свойств *S. albicans* ATCC при воздействии флуконазола сочетанно с метаболитами *E. coli* «Iac+» (А); с метаболитами *V. bifidum* (Б); T=12 часов.

Примечание: 1) пролиферация; 2) морфогенез; 3) фосфолипаза.

По окружности — время суток, часы.

Корреляционный анализ выявил прямую зависимость между всеми изучаемыми показателями факторов патогенности эталонной культуры *S. albicans*, что также характерно для клинических изолятов грибов при кандидозе ($p < 0,05$).

Таким образом, одним из главных механизмов адаптации грибов рода *Candida* к факторам среды и компенсации нарушенных функций является соответствующее изменение ритмов интенсивности физиологических процессов. Изменение исходной периодичности у эталонных штаммов дрожжевых грибов характеризовалось не только нарушением постоянства периода, но и изменением амплитуды колебательного процесса вследствие активации расхода и восстановления энергетических и пластических ресурсов, т.е. активации обеих сторон обмена веществ - катаболизма и анаболизма [3].

Выводы.

Временная организация физиологической активности эталонного штамма является видовым признаком *S. albicans*, а хроноинфраструктура биологических свойств клинических изолятов грибов формируется под действием биологических факторов.

Трансформация временной организации биологических характеристик эталонного штамма *S. albicans* в хроноинфраструктуру, характерную для клинических изолятов здоровых лиц, происходит под влиянием метаболитов дисбиотической микробиоты биотопа.

Трансформация временной организации биологических характеристик эталонного штамма *S. albicans* в хроноинфраструктуру, характерную для клинических изолятов от больных кандидозом людей, происходит при сочетанном воздействии субфунгиостатических концентраций флуконазола и метаболитов нормобиоты биотопа.

Одним из механизмов адаптации грибов *S. albicans* к факторам среды является изменение ритмов интенсивности физиологических процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арушанян Э.Б. Основы хронофармакологии. М.: Ставрополь, 2000. 565 с.
2. Губин Д.Г., Губин Г.Д. Хроном сердечно-сосудистой системы на различных этапах онтогенеза человека. Тюмень, 2000. 176 с.
3. Дмитрук А.И. Биоритмологические аспекты проблемы адаптации в спорте: Учебно-методическое пособие. СПб., 2007. 58 с.
4. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А. *Candida*. Кандидозы. Лабораторная диагностика / Под ред. Н.П. Елинова. СПб.: Коста, 2010. 224 с.
5. Кашуба Э.А., Тимохина Т.Х. Способ диагностики госпитальных штаммов / Патент на изобретение № 2285258, 2006. 11 с.
6. Суплотов С.Н., Журавлева Т.Д. Адаптация человека к авиаполетам. Липопероксидация в эритроцитах и ее регуляция. Методы лабораторной диагностики. Тюмень: Печатник, 2009. 104 с.
7. Перунова Н.Б. Характеристика биологических свойств микроорганизмов в бактериально-грибковых ассоциациях кишечника: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2003. 25 с.
8. Клиническая лабораторная аналитика / Под ред. В.В. Меньшикова. Москва, 2000. 815 с.
9. Nelson, W., Tong, Y.L., Lee, J.K. Methods for cosinorhythmometry // *Chronobiologia*. 1979. Vol. 6. № 4. Pp. 305-323.
10. Ашофф Ю. Обзор биологических ритмов // Биологические ритмы. Пер. с англ. М.: Мир. 1984. Т. 1. С. 12-21.
11. Перунова Н.Б. Биорегуляция микросимбионтов в микросимбиозе кишечника человека: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. Оренбург, 2011. 43 с.
12. Шендеров Б.А. Нормальная микрофлора и ее роль в поддержании здоровья человека // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 1998. Т. 7. № 1. С. 61-65.

REFERENCES

1. Arushanian, E.B. *Osnovy khronofarmakologii* [The basis of chronopharmacology]. Moscow, 2000. 565 p. (in Russian).
2. Gubin, D.G., Gubin, G.D. *Khronom serdechno-sosudistoi sistemy na razlichnykh etapakh ontogeneza cheloveka* [Chronom of cardiovascular system at different stages of ontogenesis in men]. Tyumen, 2000. 176 p. (in Russian).
3. Dmitruk, A.I. *Bioritmologicheskie aspekty problemy adaptatsii v sporte: Uchebno-metodicheskoe posobie* [Biorythmological aspects of the adaptation problem in sport]. St-Petersburg, 2007. 58 p. (in Russian).
4. Elinov, N.P., Vasil'eva, N.V., Stepanova, A.A. *Candida. Kandidozy. Laboratornaia diagnostika* [Candida. Candidosis. Laboratory diagnostics]. / Ed. by N.P. Elinov. St-Petersburg, 2010. 224 p. (in Russian).
5. Kashuba, E.A., Timokhina, T.Kh. Method of diagnostics of hospital strains / Patent RF № 2285258 (2006). (in Russian).
6. Suplotov, S.N., Zhuravleva, T.D. *Adaptatsiia cheloveka k aviapoletam. Lipoperoksidatsiia v eritrotsitakh i ee reguliatsiia. Metody laboratornoi diagnostiki* [The human adaptation to the flight. Lipid peroxidation in erythrocytes and regulation. Methods of laboratory diagnostics]. Tyumen, 2009. 104 p. (in Russian).
7. Perunova, N.B. *Kharakteristika biologicheskikh svoistv mikroorganizmov v bakterial'no-gribkovykh assotsiatsiakh kishechnika* (Avtoref. diss. kand.) [Characteristics of the biological properties of microorganisms in bacterial-fungal associations of the intestine (Extended Abstract of Cand. Sci. (Med.) Diss.)]. Orenburg, 2003. 25 p. (in Russian).

8. *Klinicheskaia laboratornaia analitika* [Clinical laboratory analytics]. / Ed. by V.V. Menshikov. Moscow, 2000. 815 p. (in Russian).

9. Nelson, W., Tong, Y.L., Lee, J.K. Methods for cosinorhythmometry. *Chronobiologia*. 1979. Vol. 6. № 4. Pp. 305-323.

10. Ashoff, Y. Review of the biological rhythms. *Biologicheskie ritmy. T. 1* [Biological rhythms. Vol. 1]. Moscow, 1984. Pp. 12-21. (in Russian).

11. Perunova, N.B. *Bioreguliatsiia mikrosimbiontov v mikrosimbiotsenoze kischechnika cheloveka* (Avtoref. diss. dokt.) [The bioregulation of microsymbionts in microsymbionts in the human intestine (Extended Abstract of Dr. Sci. (Med.) Diss.)]. Orenburg, 2011. 43 p. (in Russian).

12. Shenderov, B.A. Normal microflora and its role in maintaining human health. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii — Russian journal of gastroenterology, hepatology, koloproctology*. 1998. Vol. 7. № 1. Pp. 61-65. (in Russian).

Автор публикации

Николенко Марина Викторовна — доцент кафедры микробиологии Тюменской государственной медицинской академии, доктор биологических наук

Author of the publication

Marina V. Nikolenko — Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical Academy