

© М.В. НИКОЛЕНКО

nikolenko-marina@mail.ru

УДК 631.466.1-044. 332

АДАПТИВНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ *CANDIDA ALBICANS*

АННОТАЦИЯ. Выявлены биоритмы пролиферативной активности дрожжеподобных грибов. Экспериментально доказано, что временная самоорганизация грибной клетки обусловлена не только проявлением генетически детерминированных ритмов жизнедеятельности культуры, но и влиянием внешних управляющих параметров.

SUMMARY. *The biorhythms of proliferative activity of yeast-like fungi have been identified. It is experimentally proved that the temporal self-organization of fungal cells is caused not only by a manifestation of genetically determined rhythms of culture life, but also by the influence of external control parameters.*

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. *Пролиферативная активность, биоритм, Candida albicans.*

KEY WORD. *Proliferative activity, biorhythm, Candida albicans.*

Известно, что биологические процессы в природе протекают с достаточно четкой периодичностью. Это свидетельствует о том, что биоритмы являются универсальным и важнейшим свойством жизни и способом существования живых организмов от одноклеточных до сложных многоклеточных [1].

Естественные временные параметры, сформировавшие в процессе эволюции ритмику живых организмов — это ритм солнечной освещенности (чередование дня и ночи), ритмы температуры, лунный цикл и т. д. [2]. Однако непрерывные колебания функциональной активности биосистем нельзя считать прямой реакцией на эти изменения. У живых организмов имеются внутренние механизмы — «биологические часы», позволяющие чувствовать течение времени и измерять его промежутки [3]. Каждая клетка, как целостный механизм — самоподдерживающаяся система.

Микроорганизмы, и, в частности, дрожжеподобные грибы, как одноклеточная форма жизни, функционирует в природе в составе многоклеточных сообществ — «биологических пленок» [4]. В составе такого структурного сообщества, помимо абиотических факторов, на них оказывают влияние экзогенные продукты метаболизма микробов — ассоциантов. При этом изменение биологических свойств грибов может происходить на нескольких уровнях: генотипическом и фенотипическом, и заключаться либо в изменении генофонда вида путем естественного отбора, либо биологических параметров при постоянно изменяющихся условиях внешней среды [5].

Candida albicans (*C. albicans*) широко распространена в природе и относится к уникальным микроорганизмам, демонстрирующим широкий диапазон адаптивных возможностей [6]. В различных экологических нишах данный вид может быть как уверенным комменсалом, так и «успешным» оппортунистом [7]; [8].

Окончательно не выяснено, каковы причины и вклад *S. albicans* при переключении поведения от «безобидного» сосуществования до агрессии. Настоящее исследование открывает возможность определить внутренние механизмы адаптации дрожжеподобных грибов в различные периоды суток, следовательно, прогнозировать их поведение.

Цель: изучить резервные возможности адаптации *S. albicans* к изменяющимся условиям среды.

Материалы и методы. В первой серии экспериментов *in vitro* использовали музейный штамм *S. albicans* 24433 АТСС и изоляты *S. albicans* 463, 203, выделенные из клинического материала, от кандидоносителей. Данные культуры обладали типичными для своего вида морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами. Для биохимической диагностики применяли ассимиляционный колориметрический тест «Auxacolor 2» фирмы Bio-Rad. Все тест-штаммы выращивали и хранили на жидкой среде Сабуро.

Для экспериментов использовали 24-часовую культуру, которая соответствовала начальному этапу фазы стационарного роста и покоя. Концентрацию микробной взвеси (0,5 ед. Мак-Фарланда) получали при помощи прибора для определения мутности грибной суспензии — денситометра «Densi-La-Meter» фирмы «Lachema» (Чехия). Из рабочей концентрации делали высев по методу Дригальского на среду Сабуро. Эксперименты ставились в течение 2-х суток с 4-х часовым интервалом (IV фаза Луны). Посевы инкубировали в термостате при температуре 37°C. Результат оценивали по количеству колониеобразующих единиц на 1 мл (КОЕ/мл). Культуры пересеивали через две недели в течение шести месяцев.

Во второй серии экспериментов исследовали пролиферативную активность у музейного штамма в условиях межмикробных взаимоотношений [9]. В опытную пробирку с жидкой средой Сабуро и культурой *S. albicans* 24433 АТСС добавляли супернатанты (продукты жизнедеятельности) бактерий. Экзопродукты получали от культур *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) 25923 АТСС, *Escherichia coli* (*E. coli*) 35218 АТСС, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) 27853 АТСС. Метаболиты стерилизовали хлороформом. Посевы выращивали в течение 24 ч при 37°C. Контроль — посев дрожжевых грибов в жидкую среду без метаболитов.

Все результаты исследований обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента с помощью процессора электронных таблиц Microsoft Office Excel 2003. Данные по определению влияния экзопродуктов ассоциативной микробиоты на биологические свойства *S. albicans* были подвергнуты статистической обработке непараметрическим методом с применением критерия Уилкоксона (*W*). Сравнительная характеристика биологических свойств между музейным штаммом и клиническими вариантами проводилась с применением критерия Манна-Уитни (*T*). Анализируя данные, считали их достоверными при значениях $p < 0,05$.

Результаты были обработаны также по методу наименьших квадратов (косинор-анализ) [10] с целью поиска ритмов со статистической достоверностью $\geq 95\%$. Косинор-анализ — математический метод, выявляющий суточный ритм, его фазовую стабильность и оценивающий ритмометрические параметры: мезор,

амплитуду, акрофазу, период ритма. Мезор — статистическая величина среднего значения показателей изучаемого процесса. Акрофаза — момент времени, соответствующий регистрации максимального значения показателя. Амплитуда — величина максимального отклонения показателя от мезора. Период ритма (Т) — продолжительность одного полного цикла [11].

Биологические ритмы по частоте колебаний классифицируют на ультрадианные ритмы (длина периода до 20 ч); циркадианные (околосуточные) ритмы (длина периода 20-28 ч), инфрадианные ритмы (28-72 ч) [12]. С помощью данной программы выявлено два основных спектральных компонента ритма с периодами Т=12 часов и Т=24 часа.

Результаты и их обсуждение. Суточная динамика пролиферативной активности музейного штамма *C. albicans* характеризовалась незначительным вкладом циркадианного (околосуточного) ритма и преобладанием ультрадианного (12-часового) ритма, стабильной акрофазой в дневное время — 12.00 и минимальными значениями показателя в вечернее время. Результаты представлены на рис. 1 и в табл. 1.

У штаммов, выделенных из клинического материала, преобладал циркадианный вклад ритма (рис. 1).

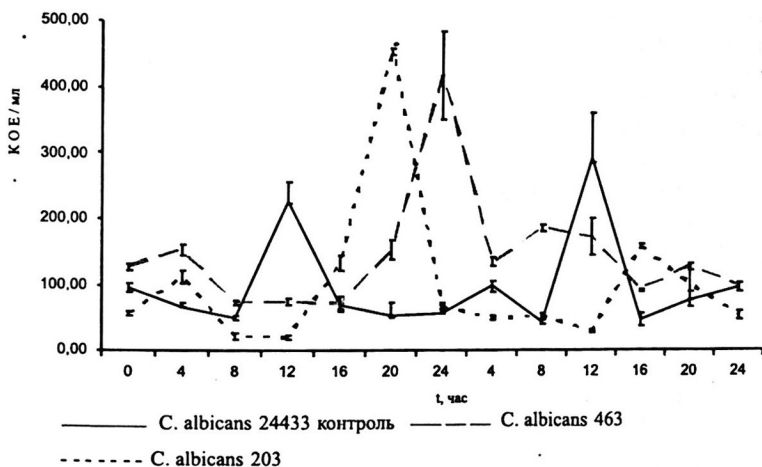


Рис. 1. Суточная динамика пролиферативной активности *C. albicans* музейного штамма и клинических изолятов

Изменения данного параметра были синхронны в течение двух суток с характерным пиком в вечернее-ночное время — 20.00-24.00 часа. Отмечено, что клинические изоляты обладали большей скоростью деления клеток, т.к. значения мезора достоверно выше, чем у музейного штамма (критерий Манна-Уитни $T=36$, при $p<0,05$). Достоверно повышались и значения амплитуды колебаний количества КОЕ у культур, выделенных от носителей. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Ритмометрические параметры пролиферативной активности *S. albicans*

Культура	Вклад ультрадианного ритма, %	Вклад циркадианного ритма, %	Мезор М±m, КОЕ/мл	Амплитуда, КОЕ/мл	Акрофаза, час
24433 ATCC	34,8	20,7	93,5±10,2	65,0±13,9	12.00
463	8,5	50,8	204,6±16,7*	142,4±22,8*	00.00
203	16,1	44,4	180,3±21,7*	151,2±12,7*	20.00

Примечание: * — $p < 0,05$

Изменение биоритмов клинических изолятов *S. albicans* можно считать одним из проявлений процессов адаптации к изменяющимся условиям существования в организме человека. Данные изменения происходят на уровне фенотипа. После прекращения влияния биотических факторов дрожжевым грибам требуется некоторое время для устранения вызванных этим влиянием функциональных сдвигов. Через девять пересевов *in vitro* у вариантов грибов 463, 203 наблюдался десинхронизм биоритмов. При сравнении с музейным штаммом ритмометрические показатели темпа роста у каждого клинического варианта изменялись индивидуально. Суточная динамика пролиферативной активности *S. albicans* 463, 203 характеризовалась выраженностью трех ритмических компонентов спектра — 24-часового и двух его гармоник с периодами 12 и 8 часов. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Суточная динамика темпа роста *S. albicans*

Культура	Вклад ультрадианного ритма, %		Вклад циркадианного ритма, %		Мезор М±m, КОЕ/мл		Амплитуда, КОЕ/мл		Акрофаза, час	
	9	18	9	18	9	18	9	18	9	18
24433 ATCC	34,8	35,7	20,7	21,4	93,5±10,2	97,5±12,2	65,0±13,9	62,0±9,9	12,0	11,3
463	20,3	62,4*	5,4	40,2*	98,4±6,2	110,2±56,9	19,3±7,7*	43,8±8,2	3,4*	12,0
203	20,8	41,0*	60,9*	23,7*	64,6±6,4*	90,6±4,5	47,8±8,7	39,82±16,6	22,7*	11,9

Примечание: * — $p < 0,05$

9 — ритмометрические значения показателя через 9 пересевов культур на питательной среде Сабуро.

18 — ритмометрические значения показателя через 18 пересевов культур на питательной среде Сабуро.

В спектральном составе у культуры *S. albicans* 463 преобладал ультрадианный вклад ритма, у варианта 203 сохранялся циркадианный ритм. У клинического изолята 463 достоверно снизились значения амплитуды колебания при неизменных среднесуточных значениях пролиферации. У культуры 203, наоборот, достоверно снижались значения мезора, при пролиферации наблюдалась в 3.40 и 23.00 часов. Перестройка ритма — начало процесса успешной адаптации микроорганизма к условиям культивирования на питательной среде.

Через полгода культивирования *in vitro* у 18 поколения обеих клинических штаммов *C. albicans* суточный ритм пролиферативной активности четко не отличался от ритма *C. albicans* 24433 АТСС (табл. 2). Акрофаза регистрировалась в дневное время — 12.00, стабильными были значения мезора (критерий Манна-Уитни $T=60$, $p<0,05$) и амплитуды, достоверно преобладал ультрадианный вклад ритма. Профиль ритма всех трех культур представлен на рис. 2.

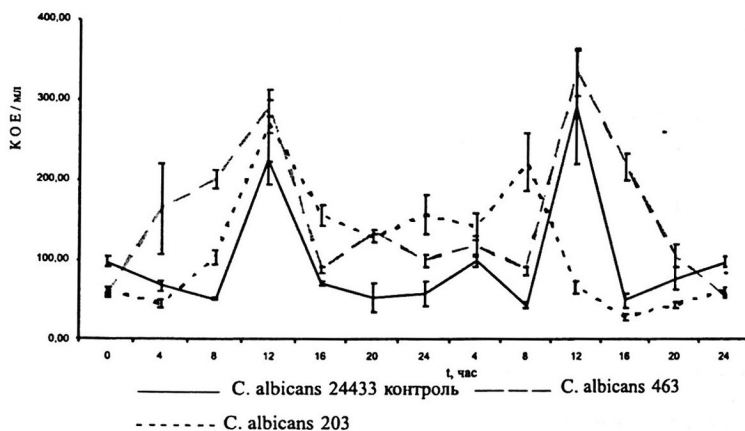


Рис. 2. Суточная динамика пролиферативной активности *C. albicans* музейного штамма и клинических изолятов через 18 пассажей культивирования *in vitro*

Таким образом, данный факт позволяет говорить о преобладании ультрадианных колебаний пролиферативной активности *C. albicans* и является типовым признаком временных рядов. Периодичность этих изменений, по-видимому, наследственно закреплена естественным отбором и связана с циклическими изменениями геофизических факторов. Вероятно, 12-часовые ритмы — внутренние «биологические часы» *C. albicans*. Однако под влиянием ритмов-регуляторов макроорганизма и экзогенных продуктов обмена веществ ассоциативной микробиоты они теряют стабильность своего периода и превращаются в околосуточные.

Смоделированное в эксперименте влияние экзометаболитов на биологические свойства музейного штамма *C. albicans* позволит, на наш взгляд, объяснить «поведение» грибов в системе ассоциативных взаимоотношений, формирующихся в макроорганизме. В ходе экспериментов установлено, что наибольшее влияние на динамику скорости роста микромицетов оказывали экзометаболиты *S. aureus*. В присутствии супернатантов данного микроорганизма у грибов увеличивалось число циркадианных ритмов, нарушалась синфазность, снижился мезор (критерий Уилкоксона $W=29$, $p<0,05$) и амплитуда колебаний, то есть наблюдался десинхроноз — один из механизмов успешной адаптации. Продукты жизнедеятельности *S. aureus* активировали перестройку ультрадианного биоритма на околосуточный ритм, характерный

для клинических культур. Метаболиты грамотрицательной микробиоты не изменяли основные параметры пролиферации *C. albicans* в течение суток. Данные представлены на рис. 3.

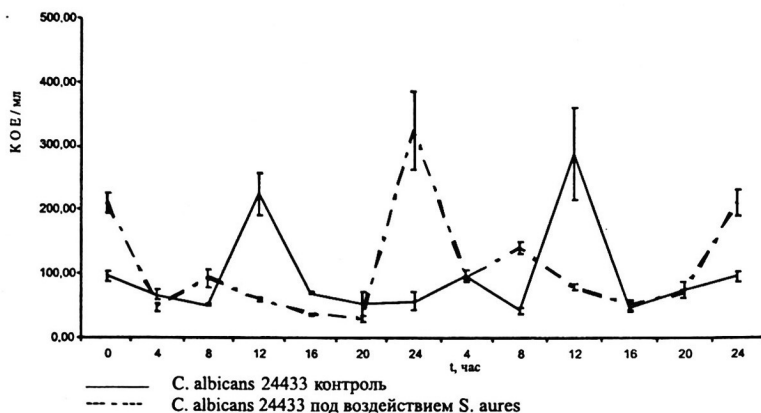


Рис. 3. Влияние метаболитов *S. aureus* на профиль ритма пролиферации *C. albicans*

Анализ полученных результатов позволяет предположить, что метаболиты *S. aureus*, изменяя биологические свойства *C. albicans*, способствуют заселению грибами различных биотопов. В процессе адаптации дрожжеподобных грибов *in vivo* отдельные группы бактерий играют одну из ключевых ролей. Поэтому изучение механизмов симбиотических взаимодействий является актуальным и перспективным направлением дальнейших исследований.

Выводы

1. При сапрофитном существовании в условиях внешней среды для *C. albicans* характерно преобладание ультрадианного ритма пролиферативной активности.
2. Изменение ритмометрических показателей скорости размножения клинических изолятов *C. albicans* можно считать проявлением фенотипической адаптации к условиям макроорганизма.
3. Временная самоорганизация грибной клетки обусловлена не только проявлением генетически детерминированных ритмов жизнедеятельности культуры, но и влиянием внешних управляющих параметров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Руководство «Хронобиология и хрономедицина» / Под ред. Ф.И. Комарова. М.: Медицина, 2002. 400 с.
2. Бреус Т.К. Влияние солнечной активности на биологические объекты: Автореф. дисс. ... д-ра физ.-мат. наук. М., 2003. 41 с.
3. Романов Ю.А. Теория биологических систем и проблема их временной организации // Проблемы хронобиологии. 1990. Т. 1. № 3-4. С. 105-122.
4. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. 2007. Т. 76. № 2. С. 149-163.

5. Термодинамика биологических систем / Под ред. проф. Мандрыко Е.С. СПб., 2006. 28 с.
6. Короткова Т.Н. Диагностика и лечение локального и генерализованного кандидоза. Автореф. дисс. ... канд мед. наук. Чебоксары, 2006. 17 с.
7. Зеленова Е.Г., Заславская М.И., Махрова Т.В. Кандиды: экология, морфофункциональные особенности и факторы патогенности // Нижегородский медицинский журнал. 2002. № 1. С.73-83.
8. Карпунина Т.И., Олина А.А., Машуров М.Г. Фосфолипаза оппортунистических грибов: их возможная роль в патогенезе и диагностике микозов // Проблемы медицинской микологии. 2006. Т.8. № 4. С.41-46.
9. Перунова Н.Б. Характеристика биологических свойств микроорганизмов в бактериально-грибковых ассоциациях кишечника. Автореф. дисс. ... канд мед. наук. Оренбург, 2003. 25 с.
10. Nelson, W., Tong, Y.L., Lee, J.K. et al. Methods for cosinorrhythmometry // Chronobiologia. 1979. Vol. 6. №. 4. P. 305-323.
11. Губин Д.Г., Губин Г.Д. Хроном сердечно-сосудистой системы на различных этапах онтогенеза человека. Тюмень, 2000. 176 с.
12. Ашофф Ю. Обзор биологических ритмов. Биологические ритмы / Под ред. Ю. Ашоффа / Пер. с англ. М.: Мир, 1984. Т. 1. С. 12-21.