

Контроль территории кандидами: прогностическая оценка поведения клинических изолятов в присутствии антимикробных факторов

А.В. Караулов, М.В. Лахтин, В.А. Алёшкин, В.М. Лахтин, С.С. Афанасьев, Ю.В. Несвижский, А.Л. Байракова, Е.А. Воропаева, А.В. Алёшкин

Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова² Россия

Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского¹, Россия

Control of territory by *Candida*: prognostic evaluation of clinical isolate behavior in the presence of antimicrobial agents

A.V. Karaulov, M.V. Lakhtin, V.A. Alyoshkin, V.M. Lakhtin, S.S. Afanasyev, U.V. Nesvizskiy, A.L. Bajrakova, E.A. Voropaeva, A.V. Alyoshkin

G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology; RUF, Moscow.

Аннотация

Обобщены собственные результаты в рамках предложенной концепции поведения кандид в условиях стресса. Выявлены особенности кофункционирования кандид (как единого коммуникативного тела) и лектинов пробиотических бактерий на территории, контролируемой микрогрибом. Отмечены перспективы синергистического антикандидного действия пробиотических лектинов и антибиотиков в приближенных к *in vivo* условиях.

Ключевые слова

Кандиды, лектины, антибиотики, пробиотическое действие, кофункционирование, стресс.

Summary

The summary of own results according to proposed conception of *Candida* behavior in conditions of stress is given. The features of co-functioning of *Candida* (as a whole body) and lectin-containing preparations on the microfungus controlled territory are revealed. Prospects of anti-*Candida* probiotic lectins and antibiotics in conditions of similarity to that of *in vivo* are underlined.

Key words

Candida, lectins, antibiotics, probiotic action, co-functioning, stress.

Системный кандидоз развивается в пристеночном слое в виде биопленок как микст-инфекция с вовлечением широкого ряда условно-патогенных микроорганизмов биотопа. Для него характерен охват больших территорий – кровных площадей слизистых гениталий, кожи и ротовой полости. При этом вирулентность кандид определяется не только выраженностью продукции гидролаз, но и непосредственно способностью заселять биотопные поверхности слизистых с образованием смешанных биопленок. В настоящее время не все факторы

Quorum Sensing, осуществляющие надзор за поведением микробиоценозов в организме человека, известны или в достаточной степени изучены [1, 2, 3, 4, 5]. Кроме того, известно, что хотя азоловые антибиотики зарекомендовали себя в качестве эффективных антифунгальных средств, однако в последние годы участились случаи выявления резистентных к ним (в том числе к флюконазолу) клинических изолятов кандид, что связано, с возрастанием устойчивости кандид в условиях распространения антибиотикотерапии. Это требует поиска альтернатив-

ных антифунгальных средств, которыми могут быть и лектины пробиотических микроорганизмов (ЛПМ) [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9].

Цель работы – сформулировать стратегию и тактику поведения микрогриба на контролируемой им территории на примере клинических изолятов кандид и во взаимосвязи с действием антимикробных факторов.

Материалы и методы

Клинически значимые штаммы кандид выделяли и идентифицировали как описано ранее [4, 6, 9]. Посев кандид на агаре *Сабуро* проводился штриховым или сплошным способом в стандартных условиях [4, 5, 6]. Оценку роста кандид на агаре и в суспензионных культурах, в том числе в присутствии антимикробных факторов, проводили через 1-2 суток роста при оптимизированной температуре, в течение 2-4 недель при комнатной температуре и затем – при пониженных температурах в условиях длительного стресса [4, 5, 6, 9]. Влияние лектинов и антибиотиков на кандиды оценивали на агаре диск-диффузионным методом и в процессе совместного культивирования лектинов с суспензией гриба [4, 5, 6, 9].

Результаты и их обсуждение

Посев (сплошной или штриховой) микрогриба функционировал как единое коммуникативное тело. Коммуникационное функционирование тела кандид наблюдалось в феномене волноподобного направленного вдоль периметра круга в чашке лизиса непрерывного массива гриба под влиянием ЛПМ в периферической и центральной областях чашки, причем волна лизиса исчезала при достижении на своем пути разрыва грибного массива [9]. Волна не наблюдалась в междисковом периферическом пространстве из-за естественного восприятия дисков как мест прерывания тела микрогриба. Результаты указывают на то, что кандиды чувствуют территорию, участвует в создании образов как рефлексов изменений окружающей среды и таким образом реагируют на сигналы стресса. При пролонгированном действии ЛПМ сеть образующихся зон нарушенного массива кандид (60-80% в зависимости от типа лектинов) не нарушала непрерывность остаточной сети биомассы гриба. Следовательно, ключевым и естественным является поведение кандид как единого мультипопуляционного коммуникативного тела, способного контролировать занимаемую территорию и обеспечивать выполне-

ние стратегической задачи – выживания и продолжения вида.

Через 5 месяцев холодового стресса, действие которого усугублялось отсутствием пищевых внешних ресурсов в условиях продолжающегося доступа кислорода, на площади сплошного посева (тела) кандид в чашках Петри отчетливо вырисовывалась остаточная разметка территории. При этом учитывалось и положение распределенных на подконтрольной микрогрибу территории чужеродных дисков. Разметка границы в периферической области-секторе (от периферически расположенных дисков до наружной кольцевой стенки чашки) - внешняя (по кругу) непрерывная пограничная линия в виде гребня. Диски распознавались микрогрибом как элементы пограничной линии, которая была шире (толще) и физически соединяла диски с краевой границей. Выявлялись такие особенности межпопуляционных коммуникаций в периферической области как быстрота ответа, преимущественная сигнализация вдоль периметра территории (условно – по «часовой» стрелке и «против» часовой стрелки), повышенная чувствительность к стрессовым сигналам любого типа (физическим, химическим, биологическим). Типичный ответ микрогриба включал образование узкой протяженной вдоль периметра границы краевой зоны (зон). Пограничная линия, по-видимому, выстраивалась как коммуникационная в самые первые моменты роста грибных колоний (как выстроенная система коммуникационных клеток и колоний надзора за границей, надзора за стрессом), а ее видимость стимулировалась плотностью выросших колоний и их слиянием на фоне пролонгированного стресса. Тактика поведения тела микрогриба в периферической области в присутствии диск-супрессоров наиболее сильно варьировала в зависимости от особенностей всех участников кофункционирования (природы клинического изолята кандид и типа лектинов). Эта область, как наиболее распознаваемая микрогрибом, максимально чувствительная к внешним сигналам и в достаточной степени визуально регистрируемая, наиболее подходит для конструирования и анализа ландшафтных (образных, имэджевых) поведенческих ответов микрогриба на присутствие лекарств и антимикробных композиций (с целью их скрининга и оценки синергизма). Разметка границы в центральной области-секторе (от периферически расположенных дисков до центра круга чашки) проявлялась уже в пределах

двухнедельной инкубации при комнатной температуре. В присутствии периферически размещенных дисков и центрального диска с эффекторами в массиве микрогриба формировались осевые соединяющие с центром круга междисковые линии. Такая разметка отражала преимущественные диаметральные (центробежные-центростремительные) межпопуляционные коммуникативные связи и соответствовала направлению градиента роста биомассы тела от периферии к центру. Линии создавали секторную симметрию круга первого типа. Линия разметки первого типа начиналась от края периферии как продолжение пограничного гребня края периферии до начала периферического диска [4, 9]. В результате достигалась физическая разметка круговой территории на секторах – зоны субконтроля микрогрибом в чашке. Описанный выше конечный (остаточный, сохраненный) результат разметки территории – результат первоначальной ранней разметки (более раннего периода роста биомассы гриба), по-видимому, не зависящий от стресса (запрограммированный результат самоорганизации и самоконтроля микрогриба), Симметрия второго типа (возникающая позже после симметрии первого типа) учитывала вклад поведения стрессового фактора - ЛПМ и проявлялась тоже как секторная - с расположением диаметрально направленных осей между периферически расположенными дисками (действие ЛПМ соседних периферических дисков нарушало симметрию секторов). Симметрия второго типа являлась диагностической и прогностической, а формируемые секторы этого типа отражали кофункционирование гриба с пробиотик-имитирующими агентами лектинового типа - метаболомобиотиками [4, 9]. Очевидно, по степени нарушения секторной симметрии второго типа можно судить о выраженности вкладов ЛПМ, влияющих на кандиды (например, судить о выраженности антикандидозного синергизма).

Кофункционирование микрогриба с лектин-содержащими препаратами в рамках размеченной территории происходило и внутри секторов - в периферической и центральной их частях. Антикандидозное действие фитолектины-содержащего препарата было отчетливо ограничено сектором с расположенным в нем диском-эффектором и распространялось практически на весь сектор [4]. При этом выход эффекта за пределы сектора не наблюдался (был исключен), что указывало на автономность (са-

мостоятельность) кофункционирования микрогриба с локализованным в секторе стрессовым биологическим фактором. Аналогичными были события и соответствующие им картины в соседних секторах с дисками ЛПМ. В результате наблюдались территориальные вклады в синергизм антикандидозного действия соседних периферических диск-лектинов по локализации эффекта в центральной области одного или другого сектора [4, 9]. Вдоль «разметочной» линии, соединяющей в секторе периферический и центральный диски-эффекторы, была возможна оценка синергического вклада в антикандидозное действие каждого из диск-лектинового препарата, а также мультисинергизма центрального диска [4]. В центральной части сектора лектины лактобацилл (ЛЛ) проявляли выраженное отдаленное во времени (позднее по сравнению с проявлением действия лектинов бифидобактерий - ЛБ) антикандидозное действие [4, 9], в результате чего тело кандид сокращалось изнутри [9]. В периферической части сектора с диск-лектиновым препаратом наблюдались более выраженные по площади антикандидозные эффекты, усиливающиеся в условиях стресса [4, 6, 9, 10]. Чувствительность оценки синергизма пары антикандидозных дисков заметно повышалась при их размещении в непосредственной близости между собой и от периферической границы (границы агара в чашке Петри). В периферической области чашки Петри максимально проявлялись ответы гриба на присутствие биологического антикандидозного стрессового фактора (фитолектин, ЛПМ, антибиотик), которые усиливались по мере пролонгирования стресса [4, 9]. В конечном результате в секторах с диск-лектинами и в целом круговом массиве (теле) наблюдалась мозаичная ассиметричная картина максимально измененного (нарушенного и сокращенного в размерах) тела кандид.

Следует ожидать, что в приближенных к *in vivo* условиях в объемной проекции микробиоценозной территории, контролируемой кандидами, ЛПМ (как менее проницаемые агенты, чем антибиотики) и пробиотики (клетки полезных микроорганизмов) в периферической области микробиоценоза слизистых макроорганизма будут нарушать функционирование ассоциатов кандид синергично (подобно синбиотикам): ЛБ и пробиотические бифидобактерии – в пограничных областях (окружающих ассоциаты кандид), а ЛЛ и пробиотические лактобациллы – в направлении вглубь ассоци-

атов кандид при пролонгированных условиях контакта. Фитолектин-содержащие препараты способны проявлять антикандидозные эффекты, подобные ЛБ и ЛЛ. В то же время антибиотики антимикотики будут способствовать разрушению микрогрибной сердцевинки биоценоза. Очевидно, сочетание всех упомянутых типов антикандидозных препаратов (по составу, дозам, инкапсуляции, высвобождению во времени, последовательности воздействия) должно повысить эффективность результирующего действия против идентифицированного патогена.

Установлено взаимодополняющее антикандидозное фунгистатическое и фунгицидное действие анионных и катионных ЛПМ с вовлечением различных механизмов. Они эффективны в низких сигнальных/физиологических концентрациях в течение длительного контакта с кандидами, способны сочетаться с другими антикандидозными препаратами и изменять направленность микробных метаболомов и влиять на этапы микробного онтогенеза (проявлять свойства метаболомобiotических свойств лектинов свидетельствуют данные о способности одного и того же типа лектина взаимодействовать с широким рядом важных и ключевых для метаболома продуктов жизнедеятельности микрогрибов, в том числе патогенных [11].

Таким образом, имеет место кофункционирование кандид как единого тела с имитирующими пробиотики лектинсодержащими препа-

ратами, которые в субцитоагглютинирующих дозах оказывают устойчивое антикандидозное действие на контролируемой микрогрибом территории. Пограничная область территории кандид является максимально чувствительной для проживания микрогриба, а вся территория – уязвимой для выживания кандид в присутствии ЛПМ. Низкие сигнальные физиологические концентрации ЛПМ инициируют разнообразное по механизму действия ЛПМ-индуцируемое антикандидозное действие. ЛПМ при этом выступают как еще один класс сигнальных молекул системы Quorum Sensing микроорганизмов. ЛПМ функционируют как образ-распознающие молекулы [12]. Аналогично TLR-2, TLR-4 и TLR-6, выполняющими функции надзора за гликоконъюгат-содержащими образцами [1], ЛПМ выполняют надзорные функции в микробиоценозах. Такое кофункционирование пробиотиков и врожденных надзорных систем человека, очевидно, способствует повышению стабильности нормального статуса микробиоты в любом биотопе человека. Приведенные выше данные о поведении кандид в нормальных и стрессовых условиях (воздействие антикандидозных препаратов) могут быть использованы при оценке и разработке новых альтернативных антикандидозных средств, процедур и методологий с учётом особенностей урогенитального, ротоглоточного, легочного, кишечного биотопов и перспективных для практической медицины.

Работа выполнена в рамках гранта Совета по грантам Президента РФ (НШ-3482.2010.7)

Литература

1. Бондаренко В.М. Молекулярно-клеточные механизмы терапевтического действия пробиотических препаратов. Фарматека, 2010; № 2: 26-32.
2. Лахтин М.В., Алешкин В.А., Лахтин В.М., Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Поспелова В.В. Роль лектинов пробиотических микроорганизмов в жизнеобеспечении макроорганизма. Вестник РАМН, 2010; № 2: 3-8.
3. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Алешкин А.В. Лектины и ферменты в биологии и медицине.-М.: Изд-тво «Династия», 2010, 480 с.
4. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Пожалостина Л.В., Поспелова В.В., Корсун В.Ф. Фито- и пробиотические лектины – синергичные антипатогены. Практ. фитотер., 2010; № 1: 5-11.
5. Лахтин М.В., Байракова А.Л., Лахтин В.М., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Корсун В.Ф. Пролонгированное антигрибковое действие пробиотических лектинов в условиях совместного культивирования с клиническими изолятами. Практ. фитотер., 2011; № 1.
6. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Пожалостина Л.В., Поспелова В.В., Корсун В.Ф. Противогрибковый потенциал лектиновых пробиотических и фитопрепаратов: типы, механизмы и факторы действия против патогенных грибов человека. Практ. фитотер., 2009; № 4: 17-25.
7. Lakhtin V.M., Lakhtin M.V., Pospelova V.V., Shenderov B.A. Lactobacilli and bifidobacteria lectins as possible signal molecules regulating intra- and interpopulation bacteria-bacteria and host-bacteria relationships. Part I. Methods of bacterial lectin isolation, physico-chemical characterization and some biological activity investigation. Microb. Ecol. Health. Dis., 2006.; V. 18: 55-60.
8. Lakhtin V.M., Lakhtin M.V., Pospelova V.V., Shenderov B.A. Lectins of lactobacilli and bifidobacteria. II. Probiotic lectins of lactobacilli and bifidobacteria as possible signal molecules regulating inter- and intrapopulation relationships between bacteria and between bacteria and the host. Microb. Ecol. Health. Dis., 2007; V. 19: 153-157.

9. Lakhtin M.V., Alyoshkin V.A., Lakhtin V.M., Afanasyev S.S., Pozhalostina L.V., Pospelova V.V. Probiotic lactobacillus and bifidobacterial lectins against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* clinical strains: New class of pathogen biofilm destructors. *Probiotics & Antimicro. Prot.*, 2010; V. 2: 186-196.
10. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Кахановская Н.А., Пожалостина Л.В., Корсун В.Ф. Лечебный и пробиотический потенциал лектинсодержащих фитопрепаратов. *Практ. фитотер.*, 2009; № 1: 5-12.

11. Lakhtin V.M. Lectin sorbents in microbiology. In: *Lectin-Microorganism Interactions* / R.J. Doyle, M. Slifkin (eds). New York: Marcel Dekker., 1994: 249-298.

12. Лахтин В.М., Лахтин М.В., Черепанова Ю.В., Пospelова В.В., Шендеров Б.А. Новые распознающие содержащие GalNAc антигены системы лектинов культуральных жидкостей пробиотических штаммов лактобацилл и бифидобактерий. *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга*, 2009; №4: M22.

Сведения об авторах:

Александр Викторович Караулов², член-корреспондент РАМН, профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии; Михаил Владимирович Лахтин¹, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории готовых лекарственных форм; Владимир Андрианович Алёшкин¹, заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор биологических наук, директор; Владимир Михайлович Лахтин¹, доктор биологических наук, заведующий лабораторией готовых лекарственных форм; Станислав Степанович Афанасьев¹, заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора; Юрий Владимирович Несвижский², профессор, доктор медицинских наук, декан медико-профилактического факультета; Ирина Валентиновна Евсегнеева², профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии, доктор медицинских наук Александра Львовна Байракова¹, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии; Елена Александровна Воропаева¹, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией; Андрей Владимирович Алёшкин¹, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории готовых лекарственных форм
Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова²
Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2
Тел. (495)248-71-07, E-mail: drkaraulov@mail.ru
Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского¹
Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10
Тел. (495)708-02-62, E-mail: info@gabrich.com

Поступила 18.02.2011 г.