



Изучение способности к формированию биоплёнок клиническими штаммами *Candida albicans* при взаимодействии с экстрактом *Fusarium solani* в целях прогнозирования тяжести атопического дерматита

Светлана Анатольевна Лисовская^{1,2}, Рита Илнуровна Валиева^{1,2},
Алсу Акрамовна Шарифуллина^{1,3}, Елена Владимировна Файзуллина²,
Ирина Мансуровна Хисматуллина², Елена Владимировна Халдеева¹,
Гузель Шавхатовна Исаева^{1,2}

¹Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия;

²Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

³Казанский (Приволжский) федеральный университет,
г. Казань, Россия

Реферат

Цель. Оценить способность к формированию биоплёнок клиническими штаммами дрожжевых грибов *Candida albicans*, выделенных от больных хроническим рецидивирующим атопическим дерматитом в стадиях обострения и ремиссии, под влиянием экстракта микромицета *Fusarium solani* и в его отсутствие.

Методы. Объекты: штаммы *C. albicans* (n=70) и *F. solani* (n=1). Формирование биоплёнок грибов проводили по методу Ramage. Оптическую плотность биоплёнок регистрировали на ридере с использованием светофильтра 620 нм. Для изучения влияния грибов-ассоциантов на биоплёнкообразующие свойства штаммов *C. albicans* в работе использовали экстракт из условно-патогенных грибов *F. solani*.

Результаты. Наибольшее биоплёнкообразование отмечено у штаммов, выделенных в стадии ремиссии заболевания. Штаммы, выделенные в острый период, уступали им в способности формировать биоплёнки (средние значения плёнкообразования составили 0,143 и 0,087 ед. соответственно). Совместное культивирование штаммов *C. albicans* с экстрактом гриба *F. solani* выявило наличие стимулирующего действия на биоплёнкообразующие свойства штаммов *C. albicans* в концентрации 1:10.

Вывод. Возможен синергизм *C. albicans* и *F. solani* при полимикробных инфекциях кожи, показано увеличение одного из факторов патогенности *C. albicans* под влиянием продуктов жизнедеятельности *F. solani*; возможность оценки стимулирующего влияния грибов-ассоциантов на вирулентность одного из участников инфекционного процесса позволит прогнозировать развитие тяжести заболевания.

Ключевые слова: *Candida albicans*, *Fusarium solani*, биоплёнки, атопический дерматит, симбиоз, микробные ассоциации.

Для цитирования: Лисовская С.А., Валиева Р.И., Шарифуллина А.А. и др. Изучение способности к формированию биоплёнок клиническими штаммами *Candida albicans* при взаимодействии с экстрактом *Fusarium solani* в целях прогнозирования тяжести атопического дерматита. *Казанский мед. ж.* 2020; 101 (3): 337–341. DOI: 10.17816/KMJ2020-337.

Studying of biofilm formation by clinical strains of *Candida albicans* in interaction with *Fusarium solani* to predict the severity of atopic dermatitis

S.A. Lisovskaya^{1,2}, R.I. Valieva^{1,2}, A.A. Sharifullina^{1,3}, E.V. Fayzullina², I.M. Khismatullina², E.V. Khaldeeva¹, G.Sh. Isaeva^{1,2}

¹Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia;

²Kazan State Medical University, Kazan, Russia;

³Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

Abstract

Aim. To assess the ability to form biofilms by clinical strains of the yeast *Candida albicans* isolated from patients with atopic dermatitis in exacerbation and remission stages under the effect of *Fusarium solani* micromycete and its absence.

Methods. The study included 70 strains of *C. albicans* and one strain of *F. solani*. Fungal biofilms formed according to the method of Ramage. The optical density of the biofilms measured using a micro plate reader at 620 nm. The effect of associated fungi on the biofilm-forming properties of *C. albicans* strains was studied by an extract from opportunistic *F. solani* fungi.

Results. The greatest biofilm formation was observed in strains isolated at the remission stage. The strains isolated in the acute period were inferior to them in the ability to form biofilms (average values of film formation were 0.143 and 0.087, respectively). Co-cultivation of *C. albicans* strains with *F. solani* fungus extract stimulated biofilm formation of *C. albicans* strains at a concentration of 1:10.

Conclusion. This study showed a possible synergism between *C. albicans* and *F. solani* in polymicrobial skin infections, because the products of the fungus *F. solani* increase one of the virulence factors of the fungus *C. albicans*; the possibility to assess of a stimulating effect of associated fungi on the virulence one of an agent of infectious disease process will allow predicting the disease severity.

Keywords: *Candida albicans*, *Fusarium solani*, biofilms, atopic dermatitis, symbiosis, microbial associations.

For citation: Lisovskaya S.A., Valieva R.I., Sharifullina A.A. et al. Studying of biofilm formation by clinical strains of *Candida albicans* in interaction with *Fusarium solani* to predict the severity of atopic dermatitis. *Kazan medical journal*. 2020; 101 (3): 337–341. DOI: 10.17816/KMJ2020-337.

Актуальность. В последнее время, особенно в индустриально развитых государствах, атопический дерматит — лидирующая кожная патология. Среди аллергических заболеваний удельный вес атопического дерматита достигает более 60% [1]. Сопровождается данное заболевание длительным воспалительным процессом на коже, развитие которого связано с комплексным процессом. Морфологические изменения кожного покрова при этом способствуют колонизации на коже бактериальной и грибковой микробиоты, которая может приводить к развитию инфекционных осложнений. Так, микроскопические грибы, часто обнаруживаемые у иммунокомпрометированных пациентов, усугубляют тяжесть течения атопического дерматита за счёт индукции аллерген-специфических иммуноглобулинов E, развития сенсибилизации и т.д. [1,2].

У многих пациентов с атопическим дерматитом, особенно при длительном течении заболевания, в микробиологических посевах встречаются грибы, относящиеся к различным группам. Результаты обследования пациентов, обратившихся в лабораторию микологии Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии (КНИИЭМ), показывают, что дрожжеподобные грибы бывают одними из наиболее часто обнаруживаемых представителей микробиоценоза кожи. Частота обнаружения грибов *Candida albicans* в организме человека за период с 2017 по 2019 гг. составила, по данным наших исследований, около 64%. В 45% случаев совместно

с *C. albicans* выделяли и различные виды мицелиальных грибов. Так, наряду с дерматомицетами (*Trichophyton spp.*) высевались и плесневые грибы (*Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Rhizopus spp.*, *Penicillium spp.* и т.д.). Причём наиболее часто такую картину наблюдали на фоне длительного поражения кожи [3].

В литературе появляется всё больше сообщений о том, что огромную роль в патогенезе микотических осложнений играют факторы патогенности самих грибов. Более 65% всех инфекционных заболеваний обусловлено микроорганизмами, существующими в форме биоплёнок (высокоупорядоченных сообществ микроорганизмов внутри образованного ими полисахаридного матрикса) [4]. Известно, что грибы *C. albicans* — главные грибковые агенты, способные образовывать биоплёнки [5–7]. Это клинически значимая способность, поскольку повышается устойчивость клеток микроорганизмов к традиционным противогрибковым препаратам. Биоплёнки могут противостоять иммунным защитным механизмам хозяина.

Цель. В связи с этим целью нашей работы было определение способности к формированию биоплёнок клиническими штаммами дрожжевых грибов *C. albicans*, выделенных от больных хроническим рецидивирующим атопическим дерматитом в стадиях обострения и ремиссии, и влияния метаболитов микромицетов *Fusarium solani* на процесс биоплёнкообразования.

Материал и методы исследования. Объектами исследования служили штаммы *C. albi-*

cans (n=70) и *F. solani* (n=1), выделенные с поверхности кожи пациентов с клиническими признаками поверхностной микотической инфекции, находящихся на амбулаторном лечении, с хроническим рецидивирующим течением в стадиях обострения и ремиссии. В исследование были включены пациенты с хроническим рецидивирующим атопическим дерматитом, проходившие амбулаторное лечение у дерматолога. Диагноз «атопический дерматит» был поставлен на основании критериев, указанных в Федеральных клинических рекомендациях по дерматовенерологии 2015 г. [8]. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора (протокол №2 от 09.09.2019).

Материал для исследования брали с помощью стерильного ватного тампона с последующим смывом дистиллированной водой по периметру наиболее свежих поражений. Затем тампон помещали в стерильную пробирку с 2 мл дистиллированной водой. Посев смыва проводили на агаризованную среду Сабуро в две чашки Петри, причём в одну чашку добавляли ципрофлоксацин в количестве 50 ЕД/мл среды. Производили расчёт численности клеток грибов в смыве с 1 тампона в 1 мл дистиллированной воды. Культуры грибов выращивали на среде Сабуро при температуре 30 °С в течение 2–5 сут (для дрожжевых и мицелиальных форм соответственно) [9].

Идентификацию грибов проводили общепринятыми микроскопическими и биохимическими методами. В работе использовали селективные хромогенные среды CandiSelect 4 (Bio-Rad) и коммерческие тест-системы, основанные на исследовании ауксанограммы Auhacolor 2 (Bio-Rad).

Формирование биоплёнок грибов проводили по методу Ramage и соавт. [10]. Культуру грибов засекали в жидкую среду Сабуро и инкубировали в орбитальном шейкере (180 об./мин.) при 30 °С в течение 1 сут. Затем культуру осаждали центрифугированием при 3000 об./мин в течение 3 мин, промывали 2 раза стерильным фосфатным буфером и ресуспендировали в жидкой среде Сабуро с конечной плотностью $1,0 \times 10^6$ клеток/мл. Суспензию клеток в количестве 100 мкл вносили в 96-луночные плоскодонные полистироловые микропанели и инкубировали в течение 2 сут при 37 °С. После образования биоплёнки планшеты промывали 3 раза стерильным фосфатным буфером. Степень или количество формирования биоплёнок оценивали колориметрическим способом. В лунки со сформированными биоплёнками до-

бавляли 125 мкл водного раствора 1% кристаллического фиолетового и инкубировали 20 мин при 37 °С. После удаления избытка красителя и промывки лунок добавляли 95% этанол в количестве 125 мкл, оптическую плотность (D) регистрировали на ридере с вертикальным лучом света с использованием светофильтра 620 нм [6].

Для изучения влияния грибов-ассоциантов на биоплёнокообразующие свойства штаммов *C. albicans* в работе использовали экстракт из условно-патогенных грибов *F. solani*, полученный по методу, разработанному лабораторией микологии КНИИЭМ в соответствии стандартам ВФС 42-93-88. Культуру грибов выращивали на жидкой среде Сабуро в течение 5–7 сут при температуре 30 °С. Затем мицелий отделяли от культуральной жидкости и растирали в ступке до однородной массы. После этого измельчённый мицелий смешивали с культуральной жидкостью и фильтровали через асбестовые фильтры. Ингибирующее или стимулирующее действие исследовали (оценивали) методом острого опыта [11]. Культуру клеток *C. albicans* засекали в жидкую питательную среду Сабуро (150 мкл), разлитую в 96-луночные плоскодонные полистироловые микропанели, в которые также вносили 15, 30 или 60 мкл соответствующего экстракта. Посевы культивировали в течение 48 ч при температуре 37 °С. Затем определяли уровень биоплёнокообразования, как описано выше. В качестве контроля исследовали культуру клеток *C. albicans*, выросшую без добавления экстрактов.

Статистический анализ обработки результатов проводили с помощью программы Bio-stat 4.03, вычисляли среднюю арифметическую величину (M) и ошибку средней арифметической (m). Достоверность различий определяли с помощью доверительного коэффициента Стьюдента (t), различия рассматривали как достоверные при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Анализ биоплёнокообразования грибами *C. albicans* проводили на сформированных двух группах штаммов:

1) выделенные от больных в острый период, где количество грибов в микробиологическом посеве превышало 10^3 КОЕ/мл¹;

2) выделенные от больных с хроническим рецидивирующим течением в стадии ремиссии, в отсутствие ярко выраженных клинических признаков грибкового поражения, количество грибов в микробиологическом посеве не превышало 10^2 КОЕ/мл.

¹КОЕ — колониеобразующие единицы.

Таблица 1. Биоплёнкообразование клинических штаммов *C. albicans*, выделенных у пациентов с атопическим дерматитом с хроническим рецидивирующим течением в стадиях обострения и ремиссии

Локализация штамма	Штаммы <i>C. albicans</i> , выделенные в стадии обострения		Штаммы <i>C. albicans</i> , выделенные в стадии ремиссии	
	n	Количество сформированной биоплёнки (M±m)	n	Количество сформированной биоплёнки (M±m)
Поверхность гладкой кожи	35	0,087±0,01 (0,046–0,112)	35	0,143±0,031 (0,1–0,326)

Примечание. Даны значения D_{620} (за вычетом фона) поглощения красителя в лунках микропанели. Различия значений между группами штаммов *C. albicans*, выделенных в стадии обострения и ремиссии, достоверны, $p < 0,05$ ($p = 0,039$).

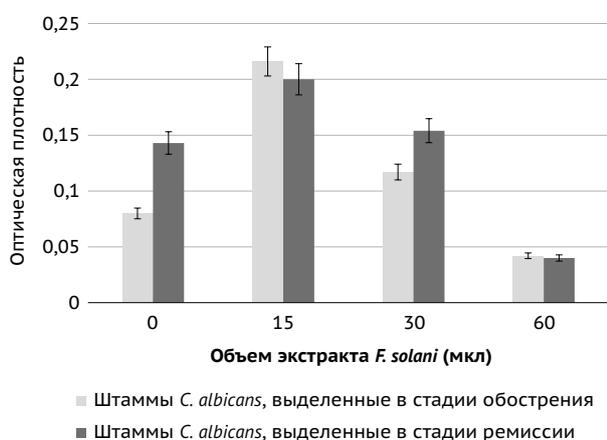


Рис. 1. Оптическая плотность биоплёнок, сформированных грибами *Candida albicans* при совместном культивировании с экстрактом гриба *Fusarium solani* в различных объёмах

В ходе исследования установлена способность всех штаммов грибов *C. albicans* формировать биоплёнку. Эффективность биоплёнкообразования клинических штаммов грибов *C. albicans* оценивали по оптической плотности, диапазон значений которой варьировал от 0,046 до 0,326 ед. Наибольшее биоплёнкообразование отмечено у штаммов, выделенных в хроническую фазу заболевания, в то время как штаммы, выделенные в острый период, существенно (в 1,5 раза) уступали им в способности формировать биоплёнки. Средние значения плёнкообразования составили 0,143 и 0,087 ед. соответственно (табл. 1). При этом максимальные значения биоплёнкообразования у штаммов, выделенных в хроническую фазу заболевания, достигали значений оптической плотности 0,326 ед., тогда как у штаммов в острый период — 0,112 ед.

Низкие значения биоплёнкообразования штаммов, выделенных в острый период, вероятно, обусловлены воздействием внешних условий, которое оказывает возможное влияние на индукцию ряда других факторов патогенности: комплекс внеклеточных протеолитиче-

ских ферментов, обладающих способностью разрушать белки кожных покровов и обеспечивающих пенетрацию в ткани макроорганизма, гифообразование и т.д. [12]. Однако следует отметить, что и в группе штаммов, выделенных в хроническую фазу заболевания, у 5 штаммов отмечены низкие значения биоплёнкообразования, что может свидетельствовать о возможных начавшихся морфологических изменениях клеток от дрожжеподобных форм к гифам, что обеспечивает инвазию (распространение) возбудителя в ткани и, как следствие, обострение инфекционного процесса.

Совместное культивирование штаммов *C. albicans* с экстрактом гриба *F. solani* выявило наличие стимулирующего действия на биоплёнкообразующие свойства штаммов *C. albicans*. Эффект достигался только при культивировании штаммов с минимальным объёмом экстракта 15 мкл, плотность биоплёнки увеличивалась в 1,5 раза по сравнению с биоплёнкой, сформированной в отсутствие экстракта (рис. 1). Добавление 60 мкл экстракта оказывало выраженное ингибирующее действие на рост штаммов *C. albicans*. Однако внесение 30 мкл экстракта при культивировании грибов приводило к активации формирования у клеток *C. albicans* трубок прорастания (гифообразование). Таким образом, стимулирующее действие экстракта гриба *F. solani* на биоплёнкообразующие свойства штаммов *C. albicans* наблюдали при совместном культивировании в соотношении 1:10.

В клинической практике следует помнить о том, что низкий уровень обсеменённости организма грибами при хронических формах заболевания может свидетельствовать о развитии биоплёночной структуры — одной из основных стратегий выживания микроорганизма в организме человека. Изучение особенностей формирования микробных ассоциаций, а также взаимного влияния микроорганизмов в ассоциациях позволит прогнозировать развитие инфекционного процесса.

ВЫВОДЫ

1. Существует корреляция между биоупленкообразованием штаммов и течением кожного микотического заболевания.

2. Высокая степень пленкообразования характерна для штаммов, выделенных от больных с хроническим рецидивирующим течением в стадии ремиссии заболевания.

3. Возможен синергизм *C. albicans* и *F. solani* при грибковых инфекциях кожи. Показана возможность увеличения одного из факторов патогенности гриба *C. albicans* под влиянием продуктов жизнедеятельности гриба *F. solani*.

Участие авторов. С.А.Л. и Р.И.В. проводили исследования; А.А.Ш., Е.В.Ф. и И.М.Х. отвечали за подбор групп пациентов и анализ результатов; Е.В.Х. и Г.Ш.И. отвечали за сбор и анализ результатов, С.А.Л. — руководитель работы.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №20-04-00247.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гурбанова М.Г., Гулордава М.Д., Чилина Г.А. и др. Клинические особенности атопического дерматита, осложнённого микозами кожи. *Пробл. мед. микол.* 2012; 14 (4): 43–46. [Gurbanova M.G., Gulordava M.D., Chilina G.A. et al. Clinical peculiarities of atopic dermatitis complicated by skin mycoses. *Problemy meditsinskoj mikologii.* 2012; 14 (4): 43–46. (In Russ.)]

2. Glatz M., Bosshard P., Schmid-Grendelmeier P. The role of fungi in atopic dermatitis. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2017; 37 (1): 63–74. DOI: 10.1016/j.iaac.2016.08.012.

3. Файзуллина Е.В., Хисматулина И.М., Лисовская С.А., Гордеева А.М. Современные особенности течения акне: результаты собственных исследований. *Пробл. мед. микол.* 2019; 21 (3): 35–38. [Fayzullina E.V., Khismatulina I.M., Lisovskaya S.A., Gordeeva A.M. Modern features of the course of acne: the results of own researches. *Problemy meditsinskoj mikologii.* 2019; 21 (3): 35–38. (In Russ.)]

4. Голуб А.В. Бактериальные биопленки — новая цель терапии? *Клин. микробиол., антимикробная химиотерап.* 2012; 14 (1): 23–29. [Golub A.V. Bacterial biofilms — a new therapeutic target? *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2012; 14 (1): 23–29. (In Russ.)]

5. Costa-Orlandi C.B., Sardi J.C.O., Pitangui N.S. et al. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. *J. Fungi (Basel).* 2017; 3 (2): 22. DOI: 10.3390/jof3020022.

6. Nikitina L.E., Lisovskaya S.A., Startseva V.A. et al. Development of novel effective agents against *Candida albicans* biofilms. *BioNanoScience.* 2019; 9: 539–544. DOI: 10.1007/s12668-019-00648-6.

7. Лисовская С.А., Халдеева Е.В., Глушко Н.И., Паршаков В.Р. Оценка способности к формированию биопленок клиническими штаммами *Candida albicans*, выделенными при острых и хронических формах кандидоза кожи и слизистых оболочек. *Пробл. мед. микол.* 2017; 19 (1): 31–33. [Lisovskaya S.A., Khaldeeva E.V., Glushko N.I., Parshakov V.R. Evaluation of biofilm formation ability of clinical strains of *Candida albicans* isolated at the acute and chronic forms of candidosis of the skin and mucous membranes. *Problemy meditsinskoj mikologii.* 2017; 19 (1): 31–33. (In Russ.)]

8. Федеральные клинические рекомендации. *Дерматовенерология 2015. Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путём.* Изд. 5-е, испр. и доп. М.: Деловой экспресс. 2016; 768 с. [Federal'nye klinicheskie rekomendatsii. *Dermatovenerologiya 2015. Bolezni kozhi. Infektsii, peredavaemye polovym putem.* (Federal clinical guidelines. *Dermatovenerology 2015. Diseases of the skin. Sexually transmitted infections.*) Ed. 5th ed. M.: Business Express. 2016; 768 p. (In Russ.)]

9. Клишко Н.Н. Диагностика и лечение кандидемии и острого диссеминированного кандидоза. *Инфекц. и антимикроб. терап.* 2002; 4 (1): 30–37. [Klimko N.N. Diagnosis and treatment of candidaemia and acute disseminated candidiasis. *Infektsionnaya i antimikrobnaya terapiya.* 2002; 4 (1): 30–37. (In Russ.)]

10. Ramage G., Walle K.V., Wickes B.L., Lopez-Ribot J.L. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2001; 45 (9): 2475–2479. DOI: 10.1128/aac.45.9.2475-2479.2001.

11. Лисовская С.А., Глушко Н.И., Халдеева Е.В. и др. Влияние экстрактов мицелиальных грибов на адгезивные свойства *Candida albicans*. *Пробл. мед. микол.* 2010; 12 (1): 34–37. [Lisovskaya S.A., Glushko N.I., Khaldeeva E.V. et al. The effect of mycelial fungi in the adhesion of *Candida albicans*. *Problemy meditsinskoj mikologii.* 2010; 12 (1): 34–37. (In Russ.)]

12. Naglik J.R., Challacombe S.J. *Candida albicans* secreted aspartil proteinases in virulence and pathogenesis. *Microw. Mol. Biol. Rev.* 2003; 67: 400–428. DOI: 10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003.