

БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 615.33:577.152.321].03:582/232].015.4
DOI 10.17816/pmj36367-71

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ЛИЗОЦИМА НА КИНЕТИКУ РОСТА ГРИБКОВ *CANDIDA ALBICANS*

*А.П. Годовалов**, *Д.М. Пастухов*

Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера, Россия

CHARACTERISTIC FEATURES OF LYSOCIM INFLUENCE ON GROWTH KINETICS OF *CANDIDA ALBICANS* FUNGI

*A.P. Godovalov**, *D.M. Pastukhov*

E.A. Vagner Perm State Medical University, Russian Federation

Цель. Проведена оценка кинетики роста и биопленкообразующей активности штаммов *Candida albicans* при культивировании в питательной среде с разными концентрациями лизоцима.

Материалы и методы. Кинетику роста штаммов определяли по изменению оптической плотности суспензии при 620 нм, а биопленки выявляли по их окрашиванию фуксином. Результаты регистрировали на фотометре.

Результаты. Лизоцим меняет кинетику роста *C. albicans*, сокращая продолжительность экспоненциальной и удлиняя стационарную фазы роста. Установлено, что повышенная концентрация лизоцима положительно влияет на пролиферативную активность грибов. При повышении концентрации лизоцима увеличивается и биопленкообразующая активность *C. albicans*.

Выводы. В целом повышенный уровень лизоцима способствует переходу грибов в планктонную форму роста, что необходимо учитывать при проведении лечения пациентов с кандидозом.

Ключевые слова. Лизоцим, *Candida albicans*, биопленка.

Aim. To assess the growth kinetics and biofilm-forming activity of *Candida albicans* strains when cultivated in nutrient medium with different concentrations of lysocim.

Materials and methods. Growth kinetics of strains was determined by changes in optic density of suspension at 620 nm, and biofilms detected them by their staining with fuchsin. The results were registered on photometer.

Results. Lysocim changes the growth kinetics of *C. albicans*, reducing the duration of exponential and prolonging the stationary phases of growth. It was established that increased lysocim concentration positively in-

© Годовалов А.П., Пастухов Д.М., 2019

тел.: +7 912 981 51 00

e-mail: AGodovalov@gmail.com

[Годовалов А.П. (*контактное лицо) – кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии; Пастухов Д.М. – студент стоматологического факультета].

fluences the proliferative activity of the fungi. As lysocim concentration is increased, *C. albicans* biofilm-forming activity is elevating.

Conclusions. Thus, the increased level of lysocim contributes to transition of fungi into the plankton form of growth that should be taken into consideration when treating patients with candidiasis.

Key words. Lysocim, *Candida albicans*, biofilm.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день носительство грибов *Candida albicans* встречается среди 25 % людей. Известно, что *Candida spp.* являются условно-патогенным микроорганизмом и входят в состав резидентной микрофлоры полости рта. При снижении иммунитета, например при продолжительном употреблении антибиотиков, цитостатиков, кортикостероидов и некоторых других соматических заболеваниях, происходит увеличение их пролиферативной активности, что приводит к кандидозу. Заболевание имеет различные клинические проявления, наиболее частыми из них являются появление белесоватого творожистого налета на слизистой полости рта, губ, задней стенки глотки. Кроме косметических недостатков, заболевание проявляется дискомфортом и жжением в области поражения. Чаще всего, при кандидозе полости рта встречается вид *C. albicans* [4, 5].

Антимикотической активностью обладает ротовая жидкость, которая представляет совокупность слюны, продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, десневой жидкости, слущенного эпителия, остатков пищи. Ведущую роль в реализации протективной функции играет ферментный состав, например амилаза, лизоцим и другие [1]. Лизоцим (мурамидаза) – фермент, который принад-

лежит к классу гидролаз и обладает способностью к гидролизу β -1-4-гликозидной связи между остатками N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмураминовой кислотами пептидогликана клеточной стенки бактерий. Доказана эффективность лизоцима против вирусов путем активация интерферона, а также против некоторых бактериальных токсинов. В ряде исследований показано, что фермент особенно эффективен против грамположительных бактерий, которые в составе клеточной стенки имеют β -1,4-гликозидной связи, а ее мукопептиды связаны с тейхоевыми кислотами [3]. Компоненты клеточной стенки *C. albicans* можно отнести к факторам патогенности, так как они активно участвуют в клеточном метаболизме, а также содержат полисахариды, которые обладают антигенными свойствами. Маннанопротеины клеточной стенки грибов *Candida* играют основную роль в процессах колонизации, адгезии и инвазии. Благодаря клеточной стенке и плотной микрокапсуле грибы рода *Candida* защищены от воздействия лекарственных веществ, что в определенной степени может быть причиной недостаточной эффективности проводимой антимикотической терапии. Хитин представляет собой полимер с β -1,4-связанными остатками N-ацетилглюкозамина и может быть мишенью действия лизоцима. Примерно 90 % этого соединения находится в области образо-

вания и отделения дочерних клеток. В этой зоне хитин участвует в построении первичной перегородки – септы между материнской и дочерней клетками – и образует жесткое кольцо, защищающее канал между ними. В латеральной клеточной стенке локализовано примерно 10 % хитина [2].

В связи со сложным строением клеточной стенки дрожжеподобных грибов влияние лизоцима на них остается до конца не выясненным.

Цель исследования – оценить динамику роста *S. albicans* и их биопленкообразующую активность при разной концентрации лизоцима.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования было выделено два клинических штамма *S. albicans* из ротовой полости клинически здоровых людей. Штаммы выделяли на среде Сабуро. Суспензию тест-штаммов вносили в лунки плоскодонного планшета, заливали бульоном Сабуро и культивировали при температуре 37 °С в течение 24 ч. Каждый час производилась регистрация оптической плотности при длине волны 620 нм, что отражает число микроорганизмов. Удельная скорость роста культуры рассчитывается по данным концентрации биомассы в фазах активного роста культуры по формуле

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{T_1 - T_0},$$

где X_0 и X_1 – значения биомассы, соответствующие времени роста T_0 и T_1 .

В опытные лунки вносили лизоцим в концентрации 40 мкг/мл, что соответствует нормальному значению фермента в слюне [6], а также 0,2 мг/мл, что значительно превышает уровень здоровых лиц.

Биопленки формировали в планшетах для иммуноферментного анализа, куда вносили бульонные культуры тест-штаммов и лизоцим в соответствующих концентрациях. В контрольные лунки помещали физиологический раствор NaCl. Планшеты инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Затем лунки промывали и окрашивали 1%-ным спиртовым раствором основного фуксина с последующей спиртовой экстракцией связанного красителя. Детекцию окрашенных экстрактов биопленок осуществляли на планшетном ридере при длине волны 492 нм. Толщину биомассы пленки, сформированной микроорганизмами, оценивали по методу [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Длительность лаг-фазы грибов в условиях нормального содержания лизоцима составляет 4 ч, после чего наступает продолжительная логарифмическая фаза, которая длится 20 ч и заканчивается максимальной стационарной фазой, когда уровень биомассы грибов достигает 0,474 усл. ед. оптической плотности, а скорость роста штамма – 0,081 усл. ед. оптической плотности в час. При повышении концентрации лизоцима лаг-фаза удлиняется и составляет 5 ч, фаза экспоненциального роста – 6 ч, после чего наступает фаза замедленного роста, продолжающаяся 1 ч. Последняя

сменяется стационарной фазой, когда происходит гибель части популяции клеток. Эта фаза продолжается 10 ч. Количество *C. albicans* по истечении 24 ч культивирования составляет 0,468 усл. ед. оптической плотности, а скорость роста – 0,180 усл. ед. оптической плотности в час ($p < 0,05$). В целом скорость роста грибов в условиях повышенной концентрации лизоцима значительно превосходит скорость роста при его нормальном уровне. Однако по истечении 24 ч количество грибов в обоих штаммах имеет незначительные отличия. Можно предположить, что такое проявление активности лизоцима против дрожжеподобных грибов объясняется наличием в их клеточной стенке маннанопротеина и плотной капсулы.

Биопленкообразующая активность штаммов, культивируемых при повышенной концентрации лизоцима, составила 0,616 усл. ед., а при нормальной – 0,114 усл. ед. ($p < 0,05$). В условиях повышенной концентрацией лизоцима происходит увеличение образования

биопленки, что, вероятно, обусловлено усиленной пролиферацией *C. albicans*.

Показано, что лизоцим оказывает влияние на кинетику роста и его действие зависит от pH среды. При изучении активности фермента в среде с pH 5,0 установлено, что рост *C. albicans* резко снижается, т.е. можно предположить бактерицидное действие фермента. При pH среды 7,0 лизоцим также проявляет свою бактерицидную активность, однако в меньшей степени. Аналогичная зависимость активности лизоцима выявлена и при изучении биопленкообразования штаммами *C. albicans*.

Выводы

Таким образом, лизоцим меняет кинетику роста *C. albicans*, сокращая продолжительность экспоненциальной и удлиняя стационарную фазы роста. Кроме этого, повышенный уровень лизоцима способствует переходу грибов в планктонную форму роста, что необходимо учитывать при проведении лечения пациентов с кандидозом.

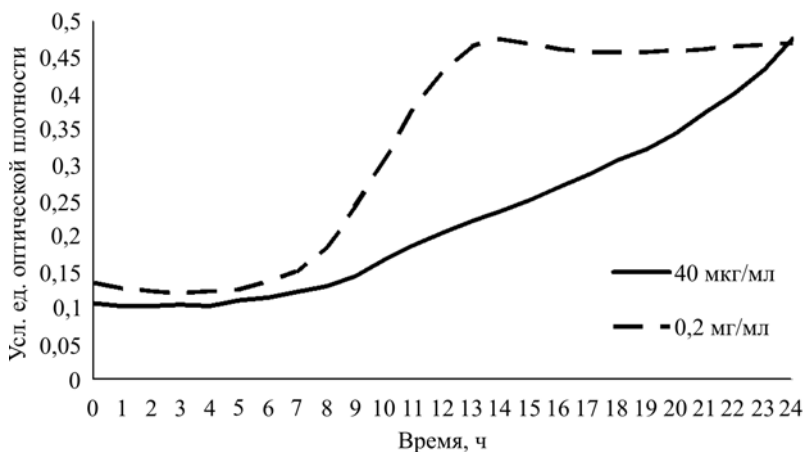


Рис. Кинетика роста *Candida albicans* при различных концентрациях лизоцима

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Замбрыцкий О.Н., Езепчик Ю.И., Герасимук М.О.* Оценка состояния неспецифической резистентности организма по иммунологическим показателям слюны и кожи. *Здоровье и окружающая среда* 2012; 21: 73–77.
2. *Калбина Т.С., Кулаев И.С.* Роль белков в формировании молекулярной структуры клеточной стенки дрожжей. *Успехи биологической химии* 2001; 41: 105–107.
3. *Мозговая Л.А., Яковлев М.В., Батог К.А., Годовалов А.П.* Влияние некоторых ферментов слюны на биопленкообразующую активность условно-патогенных микроорганизмов. *Современная стоматология: от традиций к инновациям: материалы Международной научно-практической конференции.* Тверь 2018; 264–268.
4. *Пастухов Д.М.* Особенности влияния *Candida spp.* на бактерии полости рта. *Международный студенческий научный вестник* 2018; 1: 5–8.
5. *Пастухов Д.М.* Влияние изменения рН на динамику роста грибов рода *Candida albicans*, выделенных при воспалительных заболеваниях полости рта. *Современная стоматология: от традиций к инновациям: материалы международной научно-практической конференции.* Тверь 2018; 275–279.
6. *Халатов В.А., Гулин А.В., Невзорова Е.В.* Иммунологические показатели слюны у жителей Липецкой области. *Вестник ТГУ* 2015; 20 (2): 354–356.
7. *O'Toole G.A.* Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp* 2011; 47: 2437.

Материал поступил в редакцию 26.03.2019