
БИОЛОГИЧЕСКАЯ КИНЕТИКА ПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *CANDIDA ALBICANS*, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХОЛЕГОЧНЫМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ ПРИ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СПИННОГО МОЗГА

В.Ю. Ульянов, В.В. Щуковский, И.А. Норкин

Отдел инновационных проектов в нейрохирургии и вертебрологии
ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России
ул. Чернышевского, 148, Саратов, Россия, 410002

С.В. Определенцева

Отдел фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований
ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России
ул. Чернышевского, 148, Саратов, Россия, 410002

Г.А. Дроздова

Кафедра общей патологии и патологической физиологии
Медицинский факультет
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Макляя, 6, Москва, Россия, 117198

В статических условиях культивирования планшетным способом на 1-е, 2-е, 3-и, 4-е и 5-е сутки изучена интенсивность образования биопленок 10 клиническими штаммами *C. albicans*, выделенными у больных с бронхолегочными осложнениями в раннем периоде травматической болезни спинного мозга. Установлено, что жизненный цикл *C. albicans* носит фазный характер и характеризуется количественными изменениями интенсивности образования биопленки.

Ключевые слова: спинной мозг, травматическая болезнь, инфекционно-воспалительные осложнения, *C. albicans*, биопленка.

Важной клинической проблемой при лечении пациентов с бронхо-легочными осложнениями, развивающимися в раннем периоде травматической болезни спинного мозга, является активация грибковой микрофлоры на фоне прогрессирующей иммуносупрессии и длительной антибактериальной терапии. Наиболее частым возбудителем поверхностных и инвазивных микозов, сопровождающихся поражением трахеобронхиального дерева в посттравматическом периоде, являются грибы рода *Candida spp.*, в том числе *C. albicans*. Патогенность *C. albicans* обусловлена не только их высокой способностью к пенетрации в эпителиальную ткань респираторного тракта, но и формированием биопленок. Последние образуются в результате конверсии от планктонного фенотипа существования к возникновению микробного сообщества, жизненный цикл которого характеризуется фазностью изменений количества образуемой биомассы, что определяет ее устойчивость к действию факторов внешней среды, в том числе антимикотических препаратов [1—3].

Образование *C. albicans* микробной биопленки и последующая ее дисперсия при достижении критической массы определяют возможность не только увеличения площади колонизируемых поверхностей трахеобронхиального дерева, но и генерализацию инфекционного процесса за счет вновь образуемых планктонных

форм. Это может приводить к возникновению полиорганной дисфункции/недостаточности и определять неблагоприятный исход травматической болезни [4; 5].

Целью настоящего исследования явилось изучение интенсивности формирования микробных биопленок клиническими штаммами *C. albicans*, выделенными у пациентов с бронхолегочными осложнениями в раннем периоде травматической болезни спинного мозга.

Материалы и методы. В исследование были включены 10 клинических штаммов *C. albicans*, выделенных из респираторных субстратов у больных с бронхолегочными осложнениями в раннем периоде травматической болезни спинного мозга. Группу сравнения составили эталонные штаммы *C. albicans* ATCC 885-653. В качестве контроля использовали 200 мкл 0,9% раствора натрия хлорида с оптической плотностью 0,1 по МакФарланду (Densi-La-Meter, Lachema, Чехия). Взятие биологического материала в объеме до 5 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида осуществляли до начала антимикотической терапии в ходе диагностической фибробронхоскопии с использованием защищенных катетеров и аспирационных банок. В соответствии с приказом МЗ СССР от 22.04.1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» из образцов трахеальных аспиратов приготавливали мазки, окрашивали их по Граму с последующей микроскопией для оценки общей картины микрофлоры, ее морфологических и тинкториальных свойств. Посев биологического материала осуществляли на среду Chromagar™ *Candida* (Chromagar, Франция) путем равномерного распределения по поверхности питательной среды с использованием дозаторов с последующей инкубацией в суховоздушном термостате ТС-1/80 СПУ в течение 72 часов при температуре 22 °С. Из материала изолированных колоний, отобранных по культурально-морфологическим признакам, выделяли чистые культуры. Биохимическую идентификацию штаммов осуществляли на микробиологическом анализаторе Multiscan FC (Германия). Для количественного учета интенсивности пленкообразования из суточных культур исследуемых штаммов из 100 мкл питательного бульона Сабуро и 100 мкл стерильного 0,9% раствора натрия хлорида готовили бактериальные суспензии с начальной концентрацией бактерий 10^5 КОЕ/мл и оптической плотностью 0,5 по МакФарланду (Densi-La-Meter, Lachema, Чехия). Бактериальную суспензию в количестве 200 мкл вносили в ячейки плоскодонных стерильных культуральных полистирольных планшетов. Бактериальную суспензию инкубировали в суховоздушном термостате при температуре 22 °С в течение 5-ти суток (статические условия культивирования). Планктонные бактерии в дни исследования удаляли аспирацией, ячейки планшетов осторожно промывали с помощью автоматического многофункционального промывателя для микропланшет, добавляли соответствующий объем 1%-го водного раствора красителя кристаллического фиолетового, экспонировали при комнатной температуре 10 минут, удаляли раствор и осторожно троекратно промывали планшеты водой. Связавшийся с биопленками краситель растворяли в 200 мкл смеси ацетон: этанол (20 мл : 80 мл) и определяли на спектрофотометре оптическую плотность при длине волны 420 нм. Образование биопленок эталон-

ными и клиническими штаммами микроорганизмов оценивали по величине связывания ими кристаллического фиолетового в стерильных плоскодонных культуральных полистирольных планшетах.

Полученные результаты экспериментальных и клинических исследований обрабатывали статистически экспресс-методом (Р.Б. Стрелков, 1998) с вычислением средней арифметической (M), среднеквадратической ошибки средней арифметической (m) и показателя вероятности (p).

Результаты исследования. При культивировании биоупленки, образованной эталонными штаммами *C. albicans*, отмечали последовательное увеличение микробной биомассы по сравнению с контролем на 2-е сутки в 6,3 раз ($p < 0,05$), на 3-и сутки — в 38,6 раз ($p < 0,05$) и на 4-е сутки — в 59, 1 раз ($p < 0,05$). Затем на 5-е сутки фиксировали тенденцию к уменьшению количества микробной биомассы, однако оно превышало контрольные значения в 31,4 раз ($p < 0,05$) (табл. 1).

Таблица 1

Динамика величин связывания кристаллического фиолетового микробными биоупленками, образованными эталонными и клиническими штаммами *C. albicans* ($n = 10$)

Наименование штаммов	Динамика величин связывания кристаллического фиолетового микробными биоупленками, ед.					
	Контроль	Сутки наблюдения				
		1-е	2-е	3-и	4-е	5-е
	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
1	2	3	4	5	6	7
Эталонные	$0,038 \pm 0,001$	$0,045 \pm 0,003$ $p > 0,05$	$0,242 \pm 0,068$ $p < 0,05$ $p_1 > 0,05$	$1,469 \pm 0,232$ $p < 0,05$ $p_2 > 0,05$	$2,248 \pm 0,283$ $p < 0,05$ $p_3 < 0,05$	$1,194 \pm 0,066$ $p < 0,05$ $p_4 > 0,05$
Клинические	$0,038 \pm 0,001$	$0,072 \pm 0,008$ $p > 0,05$	$0,361 \pm 0,042$ $p < 0,05$ $p_1 > 0,05$	$1,577 \pm 0,361$ $p < 0,05$ $p_2 < 0,05$	$2,411 \pm 0,213$ $p < 0,05$ $p_3 < 0,05$	$1,375 \pm 0,119$ $p < 0,05$ $p_4 < 0,05$

Примечание: средняя арифметическая (M), среднеквадратическая ошибка средней арифметической (m), p — по сравнению с контролем, p_1 — по сравнению с 1-ми сутками, p_2 — по сравнению с 2-ми сутками, p_3 — по сравнению с 3-ми сутками, p_4 — по сравнению с 4-ми сутками, n — количество наблюдений.

При изучении темпов прироста микробной биомассы эталонными штаммами *C. albicans* между отдельными сутками культивирования достоверное увеличение в 1,53 раза выявляли только лишь на 4-е сутки по сравнению с предыдущим сроком ($p < 0,05$) (табл.).

При культивировании биоупленки, образованной клиническими штаммами *C. albicans*, также обнаруживали увеличение микробной биомассы по сравнению с контрольными показателями на 2-е сутки в 9,5 раз ($p < 0,05$), на 3-и сутки — в 41,5 раз ($p < 0,05$) и на 4-е сутки — в 63,4 раза ($p < 0,05$). На 5-е сутки фиксировали уменьшение количества микробной биомассы, однако оно превышало контрольные значения в 36,1 раз ($p < 0,05$) (табл. 1).

При изучении темпов прироста микробной биомассы клиническими штаммами *C. albicans* между отдельными сутками культивирования достоверное увеличение фиксировали на 3-и сутки по сравнению с предыдущими сроками в 4,36 раза ($p < 0,05$), на 4-е сутки — в 1,52 раза по сравнению с 3-ми сутками ($p < 0,05$). На 5-е сутки культивирования выявляли уменьшение темпов прироста микробной биомассы в 1,75 раз по сравнению с 4-ми сутками ($p < 0,05$) (табл.).

Таким образом, жизненный цикл биопленки, образованной как эталонными, так и клиническими штаммами *C. albicans*, характеризовался последовательным увеличением прироста микробной биомассы в сроки с 1-х по 4-е сутки культивирования и снижением ее количества к 5-м суткам.

Обсуждение полученных результатов. Согласно данным литературы [1; 6; 7] биопленки способны образовывать более 90% микроорганизмов, что диктует необходимость их исследования среди наиболее распространенных и этиологически значимых для человека микроорганизмов, одними из которых являются *C. albicans*. Нами было выявлено, что все исследуемые эталонные и клинические штаммы *C. albicans* обладали высокой способностью к пленкообразованию.

Изучение кинетики роста биомассы исследуемых штаммов свидетельствовало об увеличении накопления кристаллического фиолетового в периоды инкубации с 1-х по 4-е сутки культивирования, что, вероятно, может соответствовать фазам созревания и дифференцировки биопленки. Полученные нами сведения сопоставимы с данными [2; 8] о зависимости роста и выраженности дифференцировки микробной биопленки от наличия микронутриентов в питательном бульоне, используемом для культивирования в статических условиях.

Достижение биопленкой, образованной эталонными и клиническими штаммами *C. albicans* критической массы и истощение питательного бульона для культивирования приводят, на наш взгляд, к дисперсии биопленки, что проявляется *in vitro* уменьшением ее способности к накоплению кристаллического фиолетового.

Наши данные также свидетельствуют о большей, чем описано в работах [3; 9; 10], продолжительности жизненного цикла биопленки, образуемой эталонными и клиническими штаммами *C. albicans*.

Изученные закономерности кинетики роста биопленки, образуемой эталонными и клиническими штаммами *C. albicans*, количественно отражают ее полный жизненный цикл от момента адгезии до момента дисперсии.

Выводы

1. Важным фактором патогенности клинических штаммов *C. albicans* является их высокая способность к пленкообразованию, имеющая существенное значение в патогенезе бронхолегочных осложнений, развивающихся в условиях иммуносупрессии в раннем периоде травматической болезни спинного мозга.

2. Кинетика роста микробной биопленки, образуемой клиническими штаммами *C. albicans* в пределах одного жизненного цикла, характеризуется нарастанием биомассы в период с 1-х по 4-е сутки культивирования в статических условиях с последующим уменьшением к 5-м суткам.

3. Знание кинетических характеристик роста микробных биопленок, образованных клиническими штаммами *C. albicans*, может быть использовано для разработки новых режимов антимикотической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Бакиров А.Б., Веселов А.В., Власенко А.В. [и др.] Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Российские национальные рекомендации / Под ред. Н.Н. Климки. М.: ООО «Компания „Боргес“», 2010. С. 9—10.
- [2] Климки Н.Н. Микозы: диагностика и лечение: Рук-во для врачей. М.: Ви Джи Групп, 2008.
- [3] Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. СПб.: СпецЛит, 2012. С. 608—630.
- [4] Тец В.В. Микроорганизмы и антибиотики. Нозокомиальные инфекции. СПб.: КЛЕ-Т, 2007. С. 31—37.
- [5] Лещенко В.М. Лабораторная диагностика грибковых заболеваний. М.: Медицина, 1977.
- [6] Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции: Руководство для врачей. М.: Бинном-пресс, 2003.
- [7] Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Кандидоз: природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение. М.: Триада-Х, 2001.
- [8] Хмельницкий О.К., Хмельницкая Н.М. Патоморфология микозов человека. СПб.: Изд. дом СПбМАПО, 2005.
- [9] Барышевская Л.А. Лабораторная диагностика кандидоза верхних дыхательных путей // Российская оториноларингология. 2005. № 5. С. 32—37.
- [10] Степанова Ж.В. Кандидоз слизистых оболочек и гладкой кожи // Русский медицинский журнал. 2001. № 4. С. 173—175.

REFERENCES

- [1] Bakirov A.B., Veselov A.V., Vlasenko A.V. et al. Diagnostics and treatment of mycoses in resuscitation and intensive care units. Russian national recommendations / Edited by N.N. Klimko // Moscow, ООО “Kompaniya “Borges”, 2010. P. 9—10.
- [2] Klimko N.N. Mycoses: diagnostics and treatment: Guidance for doctors. Moscow, VG Group, 2008.
- [3] Korotyayev A.I., Babichev S.A. Medical microbiology, immunology and virology. Saint-Petersburg, SpetsLit, 2012. P. 608—630.
- [4] Tets V.V. Microorganisms and antibiotics. Hospital-acquired infections. Saint-Petersburg, KLE-T, 2007. P. 31—37.
- [5] Leshchenko V.M. Laboratory diagnostics of fungal diseases. Moscow, Meditsina, 1977.
- [6] Sergeev A.Yu., Sergeev Yu.V. Fungal infections: Guidance for doctors. Moscow, ООО “Binom-Press”, 2003.
- [7] Sergeev A.Yu., Sergeev Yu.V. Candidosis: infectious nature, aggression and protection mechanisms, laboratory diagnostics, clinics and treatment. Moscow, Triada-X, 2001.
- [8] Khmelniyskiy O.K., Khmelniyskaya N.M. Pathomorphology of human mycoses. Saint-Petersburg, SPbMAPO Publishing house, 2005.
- [9] Baryshevskaya L.A. Laboratory diagnostics of upper respiratory airways candidosis // Russian otorhinology. 2005. № 5. P. 32—37.
- [10] Stepanova Zh.V. Mucous membrane and glabrous skin candidosis // Russian medical journal. 2001. № 4. P. 173—175.

**BIOLOGICAL KINETICS OF *CANDIDA ALBICANS*
CLINICAL STRAINS FILMFORMING IN PATIENTS
WITH BRONCHOPULMONARY COMPLICATIONS
OF TRAUMATIC SPINAL CORD DISEASE**

V.Yu. Ul'yanov, V.V. Shchukovskiy, I.A. Norkin

FBSI Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopaedics
Department of neurosurgical and vertebrological innovations
Chernyshevskoiy str., 148, Saratov, Russia, 410002

S.V. Opredeletseva

FBSI Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopaedics
Department of basic, clinical and experimental research
Chernyshevskiy str., 148, Saratov, Russia, 410002

G.A. Drozdova

Peoples' Friendship University of Russia
Department of General Pathology and Pathophysiology
Miklukho-Maklay str., 6, Moscow, Russia, 117198

The intensity of 10 *C. albicans* clinical strains filmforming in patients with bronchopulmonary complications of early traumatic spinal cord disease was studied in statistic condition of flatbed culture on the 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th days. It was specified that life cycle of *C. albicans* has phase character and is characterized by quantitative changes in the intensity of its filmforming.

Key words: spinal cord, traumatic disease, inflammatory and infectious complications, *C. albicans*, biofilm.