

На правах рукописи

Александрова Наталья Александровна

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭНТЕРОКОККОВ, КАНДИД И
МУКОЗАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ
СИСТЕМАХ**

03.02.03 - микробиология

Автореферат

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Нижний Новгород - 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Заславская Майя Исааковна

Официальные оппоненты:

Ильин Вячеслав Константинович - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, отдел санитарно-гигиенической безопасности человека в искусственной среде обитания и лаборатория микробной экологии человека, заведующий

Стоянова Лидия Григорьевна - доктор биологических наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра микробиологии, лаборатория физиологии и биохимии микробов, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится « ____ » февраля 2018 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10., <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Ольга Юрьевна Борисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время отмечается широкая распространенность оппортунистических инфекций, вызываемых грибами рода *Candida*, в особенности, мукозального кандидоза (Ордянец И.М. и соавт., 2015; Goncalves V. et al., 2016; Mills B.V., 2017). Для лечения кандидоза слизистых оболочек применяют антисептики и антимикотики (Глембоцкая Т.Г. и соавт., 2010; Макаров И.О., Шешукова Н.А., 2012; Пустотина О.А., 2015; Sobel J.D., 2016). Последние обладают рядом побочных эффектов, в частности, относительно высокой токсичностью (Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В., 2008; Страчунский Л.С., Козлов С.Н., 2009), что накладывает ограничение на длительность их приема. Еще одной проблемой использования антифунгальных препаратов является приобретенная резистентность к ним кандид, которая в последнее время носит глобальный характер и имеет тенденцию к прогрессированию (Донгак Д.А. и соавт., 2013; Иванова Л.В. и соавт., 2011; World Health Organization, 2014; Arendrup M.C., 2014; Kok E.T. et al., 2015; Sobel J.D., 2016). Устойчивость микромицетов к противогрибковым препаратам часто отмечается при хроническом кандидозе слизистых оболочек (Mohamadi J. et al., 2014; Ng S.M. et al., 2017), что приводит к дополнительным затратам на лечение, а также существенному снижению качества жизни пациента. Вагинальный кандидоз, имеет, как правило, хроническое рецидивирующее течение (Matheson A., 2017). Несмотря на множество предложенных схем лечения данной патологии, эффективность их недостаточно высока (Фролова Д.Д. и соавт., 2014). Это свидетельствует, в первую очередь, о многофакторности патогенеза заболевания. Способность микромицетов к клинически-значимой персистенции на уровне слизистых оболочек является также отражением взаимодействия кандид с представителями микробиоценоза и факторами колонизационной резистентности макроорганизма. В связи с этим, идет постоянный поиск новых антифунгальных препаратов (Ostrowski-Zeichner L. et al., 2010; Vriens K. et al., 2016; Ng S.M. et al., 2017), где особое внимание уделяется исследованию антагонистических взаимоотношений между микроорганизмами-резидентами биотопа и применению пробиотиков для интравагинального использования (Hanson L. et al., 2016). Также, в настоящее время отмечается повышенный интерес к применению метабиотиков, сконструированных на основе структурных компонентов клеток, метаболитов и сигнальных молекул пробиотических штаммов микроорганизмов (Шендеров Б.А. и соавт., 2017). В связи с вышеизложенным, исследования, посвященные изучению антифунгальной активности бактерий рода *Enterococcus* в отношении кандид, реализуемых в системах с мукозальными эпителиоцитами, являются своевременными и актуальными.

Степень разработанности темы исследования

В состав пробиотических препаратов, используемых для лечения (совместно с антимикотиками) и профилактики вагинального кандидоза,

чаще всего входят лактобациллы (Качалина Т.С. и соавт., 2008; Еланкова Н.Н., 2011; Аполихина и соавт., 2015; Hanson L. et al., 2016; Matsubara V.H. et al., 2016) или их ассоциация с другими микроорганизмами (Кривцова Д.Д. и соавт., 2013; Ya W. et al., 2014). Однако, известно, что лактобациллы в вагинальном биоценозе не всегда способны противодействовать чрезмерному росту кандид *in vivo* (Крупейченко В.В., Барановская Е.И., 2009). В связи с этим, представляется логичным поиск потенциальных пробиотических штаммов других видов бактерий, которые смогли бы подавить жизнедеятельность *Candida spp.* на уровне вагинального биотопа.

Среди представителей факультативной микробиоты полости рта и мочеполовой системы человека часто обнаруживаются бактерии рода *Enterococcus*, обладающие выраженной антимикробной активностью (Ермоленко Е.И., 2009; Красная Ю.В. и соавт., 2014; Gilmore M. S. et al., 2014; Graham C. E. et al., 2017). Энтерококки присутствуют в составе пробиотических препаратов, используемых для коррекции дисбиоза кишечника (Гончар Н.В. и соавт., 2013; Ермоленко Е.И. и соавт., 2013), но их антифунгальный потенциал ранее не был протестирован на уровне вагинального биотопа.

Существуют различные методы и алгоритмы отбора пробиотических штаммов микроорганизмов, в том числе, по их воздействию на биопленки (Лахтин и соавт., 2013). В то же время, при рассмотрении антагонистических взаимоотношений микроорганизмов внутри биотопа не учитывается их взаимодействие с мукозальным эпителием, что может привести к несоответствию результатов, полученных *in vitro* и *in vivo*. Эпителиоциты играют существенную роль в обеспечении колонизационной резистентности слизистых (Лукова О.А., 2015; Ross K.F., Herzberg M.C., 2016) и способны влиять на результат конкурентной борьбы между представителями микробиоты, регулируя активность своего адгезивного аппарата, а также синтезируя различные антимикробные пептиды вследствие активации Toll-подобных рецепторов - TLRs (Tsai P.V. et al., 2011; Hardy H. et al., 2013; Moyes L.D. et al., 2015). Таким образом, при тестировании микроорганизмов, обладающих потенциальной антифунгальной активностью, необходимо ориентироваться не только на результаты в системе «бактерии - кандиды», но и на их контакты с эпителиоцитами слизистых оболочек.

Цель: изучить механизмы взаимодействия энтерококков и кандид, а также их влияние на рецептор-зависимую активность буккальных эпителиоцитов.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние продуктов метаболизма энтерококков на адгезивность и жизнеспособность кандид в экспериментальных системах *in vitro*.
2. Исследовать влияние метаболитов энтерококков на рецептор - зависимую активность эпителиоцитов *in vitro*.
3. Изучить TLR-зависимую активность буккальных эпителиоцитов при кандидозе полости рта.

4. Оценить характер взаимоотношений энтерококков и кандид на уровне вагинального биотопа.

Научная новизна

Разработан метод оценки экспрессии Toll-подобных рецепторов TLR-2 и TLR-4 на буккальных эпителиоцитах с использованием проточной цитофлуориметрии, что позволяет оценить выраженность воспалительного процесса при хроническом кандидозе полости рта у людей, а также потенциальную патогенность штаммов микроорганизмов.

Впервые определено изменение уровня экспрессии TLR-2 и TLR-4 под влиянием продуктов метаболизма *Enterococcus spp.* и установлено, что направленность и уровень изменений экспрессии TLRs зависят от состава секреторных продуктов отдельных штаммов энтерококков.

Дана интегральная оценка антифунгальной активности ряда штаммов *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*, включающая в себя редукцию адгезии кандид на мукозальном эпителии и подавление метаболизма микромицетов. Впервые получены данные об антиадгезивном эффекте продуктов метаболизма различных штаммов энтерококков, содержащих в своем составе бактериоцины и ферменты, преимущественно, с молекулярной массой 3-10 кДа, в отношении грибов рода *Candida* в системах с буккальными эпителиоцитами.

Установлена обратная корреляционная зависимость между титрами энтерококков и кандид в вагинальном биотопе у женщин репродуктивного возраста, что позволяет оценить вклад минорных представителей микробиоты в поддержании колонизационной резистентности урогенитального тракта.

Показано, что комплекс секреторных продуктов энтерококков является самодостаточной субстанцией с выраженной антикандидозной активностью на уровне вагинального биотопа.

Теоретическая и практическая значимость

Разработанные методологические подходы изучения функциональной активности буккальных эпителиоцитов по их способности к экспрессии Toll-подобных рецепторов TLR-2 и TLR-4 открывают перспективы для оценки степени воздействия микроорганизмов, их секреторных компонентов и медиаторов воспаления на клетки мукозального эпителия.

Установлено участие секреторных продуктов *Enterococcus spp.* в модуляции экспрессии TLR-2 и TLR-4, что расширяет понимание механизмов взаимодействия эпителия слизистых оболочек и микробиоты, а также дает представление о вкладе метаболитов энтерококков в регуляцию колонизационной резистентности эпителия через TLR-зависимую активацию буккальных клеток.

Разработанный метод оценки экспрессии TLRs под действием продуктов метаболизма энтерококков на буккальных эпителиоцитах может быть использован как для оценки патогенного потенциала штамма, так и для отбора штаммов, обладающих пробиотическим/метабиотическим потенциалом, на основании их уровня комплементарности мукозальному

эпителию.

Доказана антагонистическая активность *Enterococcus spp.* в отношении грибов рода *Candida* в вагинальном биотопе и раскрыты основные механизмы антифунгального действия энтерококков, что может служить теоретической базой при создании пробиотиков/метабиотиков для коррекции вагинального дисбиоза дрожжевого генеза.

Используемая в работе экспериментальная тест-система «кандиды - буккальные эпителиоциты» может быть применена для интегральной оценки антикандидозной активности пробиотических штаммов.

В ходе работы собрана рабочая коллекция штаммов *Enterococcus spp.* и *Candida spp.*, которая будет использована в дальнейших исследованиях кафедры микробиологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения России по изучению антагонистических взаимоотношений между микроорганизмами разных видов.

Усовершенствованная методика моделирования экспериментального вагинального кандидоза у крыс дает возможность оценить взаимоотношения энтерококков и микромицетов на уровне вагинального биотопа.

Разработанные методы и алгоритмы применяются в научно-исследовательской работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России (акт внедрения от 28.08.2017). Материалы диссертации используются при создании учебных программ по микробиологии и иммунологии, а также чтении лекций и проведении семинаров для студентов лечебного, педиатрического, стоматологического, фармацевтического факультетов, а также клинических ординаторов различных специальностей на кафедре микробиологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России (акт внедрения от 15.06.2017).

Методология и методы исследования

Методология исследования спланирована в соответствии с задачами диссертационного исследования. Предметом исследования были взаимоотношения между энтерококками и кандидами, а также их взаимодействие с рецепторным аппаратом эпителиоцитов. Работа выполнялась с использованием классического микробиологического исследования и современных молекулярных методов. Эксперименты проводились *in vitro* и *in vivo*. Полученные данные обрабатывались статистическими методами.

Материалы для исследования

Объекты исследования

1. Штаммы микроорганизмов. В работе использовали *C. albicans* 601, *C. glabrata* 44-1, *C. krusei* 583, *C. tropicalis* 127, *C. kefir* 17, *E. faecalis* 2482, *E. faecalis* 682, *E. faecalis* 651, *E. faecalis* 179-2, *E. faecalis* 671, *E. faecium* 173-5,

E. faecalis 4304, *E. faecalis* 4276, *E. faecalis* 4306, *E. faecalis* 4314, *E. faecalis* 208, *E. faecium* 174-3 (из коллекции кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава РФ, г. Н. Новгород), а также *E. faecium* L3 (из коллекции отдела молекулярной биологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург).

2. Буккальные эпителиоциты. Клетки получали от здоровых доноров 18-45 лет на базе кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «НижГМА» Минздрава РФ (г. Н. Новгород) и от пациентов с хроническим оральным кандидозом на базе стоматологической поликлиники ФГБОУ ВО «НижГМА» Минздрава РФ (г. Н. Новгород). В экспериментах использовали буккальные эпителиоциты в концентрации 1×10^6 кл/мл в забуференном физиологическом растворе (ЗФР).

3. Лабораторные животные. Для моделирования вагинального кандидоза использовались белые крысы (самки) породы Вистар (36 шт., 200-270 г.) из вивария ФГБОУ ВО «НижГМА» Минздрава РФ.

4. Содержимое влагалища женщин. Клинический материал был получен врачами-гинекологами ООО «Клиника современных технологий «Садко»» (г. Н. Новгород) при стандартном обследовании на дисбиоз влагалища и исследовался на базе бактериологической лаборатории того же медицинского учреждения в соответствии с Приказом Министерства Здравоохранения СССР №535 от 22.04.1985г.

Объем исследований

Исследовано свыше 950 препаратов искусственной колонизации буккальных эпителиоцитов (93 серии экспериментов), проведено бактериологическое исследование вагинального содержимого 552 женщин. Было проведено 3 серии экспериментов *in vivo* на лабораторных животных (36 белых беспородных крыс). Проведено свыше 1350 бактериологических исследований по изучению антагонистической активности энтерококков и кандид *in vitro*. Выполнено 4 серии экспериментов с использованием проточного цитофлуориметра.

Методы исследования

Микробиологические методы исследования

Чистую культуру микромицетов получали на агаре Сабуро (37°C, 24 ч) (Приказ Минздрава СССР №535 от 22.04.1985г.). Энтерококки культивировали при 37°C в разных режимах: на 5% кровяном агаре, мясо-пептонном агаре (МПА), энтерококкагаре (ФБУН ГНЦ ПМБ «Оболенск», Россия) или TSB (Soybean-Casein Digest broth, B&D, USA). Идентификацию кандид проводили с использованием пластины для биохимической идентификации (Auchacolor, BioRad, India). Для идентификации энтерококков использовали биохимические микротест-системы EN-COCCUStest (Erba Lachema s.r.o., Чехия). Штаммы, тестируемые в экспериментах по изучению антагонистической активности в отношении кандид, дополнительно типировали методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (MALDI TOF Autoflex speed, Bruker Daltonik GmbH, Germany) с использованием компьютерной программы Bruker MALDI Biotyper.

Для получения продуктов метаболизма энтерококков и их отдельных фракций энтерококки культивировали в бульоне TSB (Dickenson and Company, USA). Супернатанты отделяли от микробных клеток центрифугированием (2000g, 15 мин), фильтровали через бактериальные фильтры с диаметром пор 20 мкм (Corning, Germany). Полученный фильтрат метаболитов энтерококков фракционировали (6000g, 40 мин) в пробирках с микрофильтром (Amicon® Ultra-15, Germany) с диаметром пор 3 кДа, 10 кДа или 30 кДа.

Искусственную колонизацию кандид на буккальных эпителиоцитах проводили по методике, ранее разработанной в нашей лаборатории (Махрова Т.В. и соав., 2005; Лукова О.А., 2015). Суспензию кандид (5×10^7 кл/мл) инкубировали (30 мин, 37°C) в ЗФР с взвесью буккальных эпителиоцитов (1×10^6 кл/мл). Эпителиоциты отмывали от несвязавшихся кандид (40g, 5мин), из осадка клеток готовили мазок, окрашенный азуром А (Sigma-Aldrich, USA). Показатель искусственной колонизации определяли как среднее количество адгезированных кандид в перерасчете на один эпителиоцит (Махрова Т.В. и соав., 2004).

Совместное культивирование кандид и энтерококков проводили на двухслойном агаре в чашках Петри. На первый слой МПА (ФБУН ГНЦ ПМБ «Оболенск», Россия) засеивали энтерококк «сплошным газоном» (0,1 мл, 10^9 кл/мл), наслаивали 2-й слой МПА, охлажденный до 40°C. На поверхность 2-го слоя МПА засеивали суспензию кандид методом «сплошного газона» (0,1 мл, 1×10^3 кл/мл) либо методом секторных посевов (1×10^8 кл/мл). В экспериментах с использованием метода отсроченного антагонизма (Пегушина и соав., 2016) энтерококки (0,1 мл, 1×10^9 кл/мл) культивировали на МПА (24 ч, 37°C), через 24 ч на поверхность МПА с суточной культурой энтерококка наслаивали агар Сабуро и засеивали кандиды «сплошным газоном». Контролем служил двухслойный агар без посева энтерококков. Учитывали количество и размер колоний кандид на поверхности агара после инкубации (24 ч, 37°C), используя счетчик колоний микроорганизмов СКМ-2 (Stegler, Россия).

Для оценки влияния метаболитов энтерококков на жизнеспособность кандид суспензию микромицетов (1×10^4 кл/мл в ЗФР) разливали в пробирки по 1 мл. Метаболиты суточной бульонной культуры энтерококка в TSB (1 мл), очищенные от микробных клеток (20 мкм, Corning, Germany), добавляли к осадку кандид. В контроле вместо метаболитов использовали TSB. Пробы термостатировали (37°C) 1, 2 или 24 часа, из которых готовили серию 10-ти кратных разведений в ЗФР. Делали высевы из каждого разведения (по 0,1 мл) на агар Сабуро. Подсчитывали количество колоний кандид на агаре после инкубации (24 ч, 37°C).

Уровень экспрессии Toll-подобных рецепторов на буккальных эпителиоцитах и жизнеспособность клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии (Лукова О.А., 2015). Взвесь буккальных клеток в ЗФР (1×10^8 кл/мл) пропускали через фильтры CellTricks с диаметром пор 100 мкм (Partec, Germany), помещали в центрифужные пробирки. Клетки осаждали

(40 г, 5 мин), к осадку добавляли 0,5 мл среды 199 с солями Хэнкса и глутамином (ПанЭко, Россия). В ряде экспериментов к эпителиоцитам добавляли 0,5 мл метаболитов энтерококков (30 мин, 37°C), в контроле использовали равный объем TSB. Эпителиоциты отмывали ЗФР (40 г, 5 мин), к осадку клеток добавляли 100 мкл жидкости «Cell wash». Материал в пробирках ресуспендировали, к эпителиоцитам (100 мкл) добавляли 20 мкл 7-AAD (BD Pharmingen, USA) для выявления нежизнеспособных клеток (Сырцова М.А. и соав., 2014), инкубировали 15 минут. В контроле использовали жидкость «Cell wash». В пробы добавляли по 5 мкл антител CD282 и CD284 (Лукова О.А., 2015). Измерения проводили на BD FACS Canto II System with Fluidics Cart (6-color, blue/red, USA).

Анализ взаимоотношений энтерококков и кандид *in vivo*. Вагинальное содержимое (10^{-1} мл в ЗФР) женщин засеивали на среду Сабуро (0,1 мл) и энтерококкагар (0,05 мл) «сплошным газоном», а также на среду MRS (0,5 мл из разведений 10^{-3} , 10^{-5} нативного материала) для определения титра лактобактерий. Посевы инкубировали (48 ч, 37°C), подсчитывали количество колоний и вычисляли титр кандид и энтерококков в 1 мл нативного материала. Для оценки титра лактобактерий из осадка бульонных культур готовили мазки, которые окрашивали по методу Грама.

Моделировали вагинальный кандидоз путем введения 0,2 мл суспензии *C. albicans* штамм 601 (1×10^9 кл/мл) в вагинальную полость крыс. На 3-и сутки после заражения животным вводили в вагинальную полость 0,1 мл очищенного супернатанта бульонной культуры *E. faecium* L-3 (группа № 1) или суспензию живых энтерококков (10^9 кл/мл) (группа № 2). В контрольной группе животных (группа № 3) использовали стерильный TSB. Процедуру повторяли в течение 7 дней. Каждые 2 суток осуществляли забор содержимого вагины стерильным тампоном. Материал ресуспендировали в ЗФР, затем засеивали на агар Сабуро (0,1 мл). Посевы инкубировали (24 ч, 37°C), производили подсчет выросших колоний *C. albicans* на чашках Петри, затем вычисляли титр кандид в 1 мл нативного материала.

Статистическую обработку проводили по общепринятой методике с использованием компьютерных программ Microsoft Excel 2007 и Statistica 6.1.. Данные каждой выборки проверяли на нормальность распределения. Межгрупповые различия анализировались параметрическими или непараметрическими методами. В зависимости от типа распределения был использован критерий Стьюдента или Вилкоксона-Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Взаимосвязь параметров оценивали методом корреляционного анализа, определяя коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s). Силу корреляционной связи определяли по значению r_s : ниже 0,3 считали слабой, от 0,3 до 0,7 – средней и от 0,7 до 1,0- сильной.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в составлении плана исследования, проведении аналитического обзора литературы, выполнении микробиологических исследований, экспериментов по искусственной колонизации буккальных

эпителиоцитов, а так же экспериментов на лабораторных животных. Самостоятельно проведен анализ полученных данных, статистическая обработка и обобщение полученных результатов. Работа на проточном цитофлуориметре выполнялись совместно с к.б.н. Кропотовым В.С. и к.б.н. Луковой О.А. на базе ФГУ "Нижегородский НИИ детской гастроэнтерологии" Минздрава РФ. Буккальный эпителий от больных оральным кандидозом был предоставлен главным врачом стоматологической поликлиники ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава РФ, к.м.н. Китаевой Е.В. Определение видовой принадлежности энтерококков методом MALDI-TOF проводились на базе ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора (Н. Новгород) совместно с к.м.н. Беловой И.В. Работы по изучению вагинального содержимого женщин проводились на базе ООО «Клиника современных технологий «Садко»» (Н. Новгород), совместно с врачом-бактериологом Вахромовой М.В. и врачами-гинекологами Пономаревой И.В., Лукьяновой Н.М., Терещенко С.В..

Положения, выносимые на защиту:

1. Энтерококки проявляют выраженный антагонизм в отношении *Candida spp.*, снижая способность кандид разных видов к адгезии на эпителиальных клетках, а также подавляют размножение микромицетов *in vitro* и на уровне вагинального биотопа.

2. Экспрессия TLR2 и TLR4 на буккальных эпителиоцитах изменяется на фоне кандидоза ротовой полости, а также при воздействии продуктов метаболизма энтерококков на буккальные клетки.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности материалов исследований свидетельствует достаточное количество выборок (образцов) и большой объем проведенных экспериментов, использование стандартных микробиологических методик, а также высокоточных приборов. Результаты исследований, проведенных *in vivo*, соответствуют данным экспериментов *in vitro*, что подтверждает достоверность полученных результатов.

Диссертация апробировалась на расширенном заседании кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава РФ (г. Нижний Новгород) 30 июня 2017 г; протокол № 12.

Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на: конференции "Probiotics and Health" (Армения, Ереван; 2010); XIV, XV, XVI, XVIII научно-практических конференциях по медицинской микологии (Санкт-Петербург; 2011, 2012, 2013, 2015); 3-ем съезде Микологов России (Москва, 2012); Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной (Нижний Новгород, 2014); на III Санкт-Петербургском международном экологическом форуме «Инфекция и иммунитет» (Санкт-Петербург, 2014); международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2016).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 4 – в рецензируемых изданиях, 10 – в материалах и сборниках конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 124 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, шести глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка литературных источников. Диссертация содержит 14 таблиц и 19 рисунков. Библиографический указатель включает 232 источника литературы, в том числе - 110 отечественных и 122 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Влияние продуктов метаболизма энтерококков на адгезивность кандид в экспериментальной тест-системе с буккальными эпителиоцитами

Адгезия кандид на эпителиоцитах и последующая колонизация являются обязательными этапами развития кандидозной инфекции (Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В., 2001; Капустина О.А., Карташова О.Л., 2013; Mayer F. L. et al., 2013). На адгезивные взаимодействия кандид с мукозальными эпителиоцитами могут оказывать влияние различные факторы, в том числе, представители нормальной микробиоты (Махрова, 2004; Лукова, 2015).

Проведено исследование влияния продуктов метаболизма энтерококков на способность кандид к адгезии на буккальных эпителиоцитах. Обработка кандид бактериальными метаболитами в большинстве случаев снижала адгезивность кандид. При этом, достоверное снижение ($p < 0,05$) индекса адгезии *C. albicans* на эпителиоцитах наблюдалось после обработки метаболитами следующих штаммов: *E. faecium* L3, *E. faecalis* 4314, *E. faecalis* 4306, *E. faecalis* 179-2 (Таблица 1). Были также проведены эксперименты с другими видами кандид, в которых клетки *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* и *C. kefir* подвергали обработке метаболитами *E. faecium* L3 (штамм, показавший высокую антиадгезивную активность в отношении *C. albicans*).

Было установлено, что метаболиты энтерококков подавляли адгезию *C. glabrata* 44-1, *C. krusei* 583 и *C. tropicalis* 127 к эпителиоцитам, при этом индекс искусственной колонизации достоверно снижался в $1,77 \pm 0,29$, $1,63 \pm 0,22$ и $1,25 \pm 0,09$ раз, соответственно ($p < 0,05$) (Таблица 2). В то же время, обработка метаболитами энтерококков *C. kefir* 17 существенно не влияла на адгезивность микромицетов, что, отчасти, могло быть связано с исходно низкой способностью исследуемого штамма к адгезии на эпителиальных клетках. Снижение адгезивности не могло быть связано с гибелью кандид под действием продуктов метаболизма энтерококка, поскольку ранее было доказано отсутствие существенных различий ($p > 0,05$) в адгезивности живых и инактивированных клеток *C. albicans* (Махрова Т.В.,

2004). Поскольку энтерококки являются продуцентами молочной кислоты (Бондаренко В.М., Суворов А.Н., 2007; Ермоленко Е.И., 2009; Gilmore M.S. et al., 2014), то подавление адгезивных свойств микромицетов могло быть обусловлено повреждением их рецепторного аппарата лактатом.

Таблица 1 - Влияние продуктов метаболизма энтерококков на адгезию *C. albicans* штамм 601 к буккальным эпителиоцитам, $M \pm m$

Штаммы энтерококков-продуценты метаболитов	Индекс адгезии (канд/эпит)		Кратность снижения индекса адгезии относительно контроля (количество раз)
	Контроль: кандиды, обработанные TSB	Кандиды после обработки метаболитами энтерококков	
<i>E. faecium</i> L3	5,79±0,87	3,37±0,39 *	1,72±0,16*
<i>E. faecium</i> 173-5	3,99±0,35	3,81±0,49	1,16±0,16
<i>E. faecium</i> 174-3	9,89±1,36	8,20±0,96	1,20±0,13
<i>E. faecalis</i> 2482	2,39±0,47	1,90±0,12	1,20±0,17
<i>E. faecalis</i> 682	2,39±0,47	1,90±0,15	1,19±0,15
<i>E. faecalis</i> 651	4,09±0,84	3,50±0,49	1,17±0,17
<i>E. faecalis</i> 179-2	3,19±0,51	2,19±0,35*	1,47±0,11*
<i>E. faecalis</i> 4304	3,18±0,43	3,32±0,18	0,95±0,11
<i>E. faecalis</i> 4276	3,18±0,43	3,56±0,32	0,90±0,14
<i>E. faecalis</i> 4306	10,19±1,13	6,61±0,68*	1,60±0,36*
<i>E. faecalis</i> 4314	10,19±1,13	8,28±0,62*	1,26±0,14*
<i>E. faecalis</i> 208	9,89±1,30	7,47±0,58	1,36±0,26

Примечание:

* – достоверность отличий относительно контроля ($p < 0,05$)

Таблица 2 - Влияние продуктов метаболизма *Enterococcus faecium* L3 на адгезию *Candida spp.* к буккальным эпителиоцитам, $M \pm m$

Виды кандид	Индекс адгезии (канд/эпит)		Кратность снижения индекса адгезии относительно контроля (количество раз)
	Контроль: кандиды, обработанные TSB	Кандиды, обработанные метаболитами энтерококка	
<i>C. albicans</i> 601	5,79 ± 0,87	3,37 ± 0,39 *	1,72 ± 0,16 *
<i>C. glabrata</i> 44-1	5,79 ± 0,86	3,45 ± 0,39 *	1,77 ± 0,29 *
<i>C. krusei</i> 583	2,33 ± 0,43	1,67 ± 0,37 *	1,63 ± 0,22 *
<i>C. tropicalis</i> 127	3,07 ± 0,42	2,57 ± 0,27 *	1,25 ± 0,09 *
<i>C. kefir</i> 17	0,76 ± 0,05	0,82 ± 0,13	0,94 ± 0,06

Примечание:

* – статистически значимые различия показателей относительно контроля ($p < 0,05$)

Для подтверждения/опровержения данной гипотезы, был проведен ряд экспериментов по оценке адгезивности кандид в присутствии молочной кислоты. Эксперименты показали, что закисление среды молочной кислотой приводило к повышению адгезивности кандид в 1,15 раз ($p < 0,05$). В то же время, супернатант бульонной культуры энтерококков с таким же значением рН среды (6,6) снижал адгезивность кандид в 1,26 раз ($p < 0,05$). Таким образом, антиадгезивный эффект метаболитов энтерококка не был обусловлен присутствием в них лактата.

Снижение адгезивности кандид могло быть следствием либо экранирования их адгезивных молекул, либо структурных изменений адгезинов под действием ферментативной активности метаболитов энтерококков. Для проверки данного предположения был выполнен ряд экспериментов. Клетки кандид после обработки метаболитами *E. faecium* L3 отмывали додецилсульфатом натрия (ДДС) для удаления нековалентно связанных частиц (Махрова Т.В, 2004; Заславская М.И., 2009). Однако, это не приводило к восстановлению исходной адгезивной активности *C. albicans*, что указывало на необратимые конформационные изменения адгезивных молекул кандид под действием ферментов энтерококков. Для установления молекулярной массы метаболитов энтерококков, обладающих наибольшим подавляющим эффектом в отношении адгезивного аппарата кандид, клетки микромицетов обрабатывали отдельными фракциями, содержащими продукты метаболизма *E. faecium* L3 с молекулярной массой менее 30, 10 и 3 кДа. Было выявлено, что метаболиты энтерококка, содержащие белки и пептиды (Ермоленко Е.И., 2009; Ness I. F. et al., 2014) с молекулярной массой менее 30 кДа и менее 10 кДа, снижали способность *C. albicans* к адгезии на буккальных эпителиоцитах в 1,41 и 1,36 раз, соответственно ($p < 0,05$). При этом, существенных различий по действию компонентов данных фракций на адгезивный аппарат кандид не наблюдалось ($p > 0,05$) (Рисунок 1). Метаболиты с молекулярной массой менее 3 кДа, наоборот, повышали адгезивность кандид в 1,25 раза ($p < 0,05$). Исходя из полученных данных, было сделано заключение, что продукты метаболизма энтерококков, обладающие выраженной способностью подавлять адгезивность *C. albicans*, имеют молекулярную массу в пределах 3-10 кДа. В данной фракции, очевидно, могут присутствовать и бактериоцины энтерококков, молекулярная масса которых находится в диапазоне от 2 до 35 кДа (Ермоленко Е.И., 2009).

Дополнительные эксперименты показали, что метаболиты энтерококка не приводили к десорбции кандид, ранее адгезированных на клетках буккального эпителия ($p > 0,05$). Таким образом, метаболиты энтерококков способны модифицировать только свободные (не связанные с субстратом) молекулы адгезии кандид.

При воспалительных процессах, в частности, кандидозе слизистых оболочек, повышается продукция провоспалительных цитокинов: ИЛ-6, ИЛ-8 и др., (Хаитов Р.М. и др., 2009; Москалёв А.В., 2015). Эксперименты показали, что воздействие ИЛ-6 или ИЛ-8 на буккальные эпителиоциты *in vitro*

повышало их восприимчивость в отношении *C.albicans*, и увеличивало колонизацию кандид на эпителиоцитах в $1,51 \pm 0,26$ и $1,42 \pm 0,25$ раза, соответственно ($p < 0,05$) (Рисунок 2).

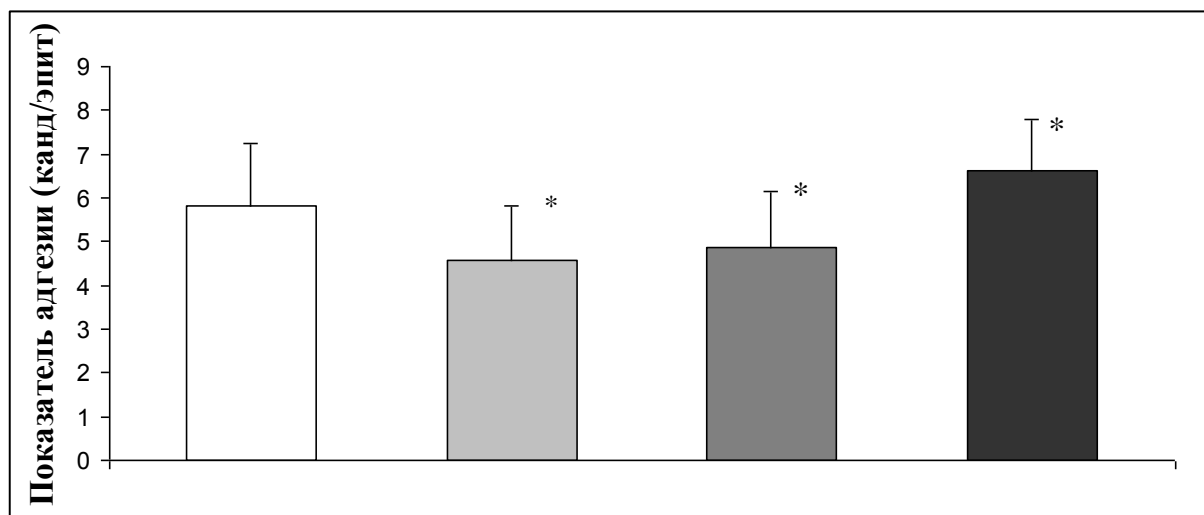


Рисунок 1 – Влияние различных фракций продуктов метаболизма энтерококков на адгезивность *C. albicans* 601 в тест-системе с эпителиоцитами

Примечание: - контроль (стерильный TSB);
 - метаболиты с молекулярной массой менее 30 кДа;
 - метаболиты с молекулярной массой менее 10 кДа;
 - метаболиты с молекулярной массой менее 3 кДа

* – достоверность отличий относительно контроля ($p < 0,05$)

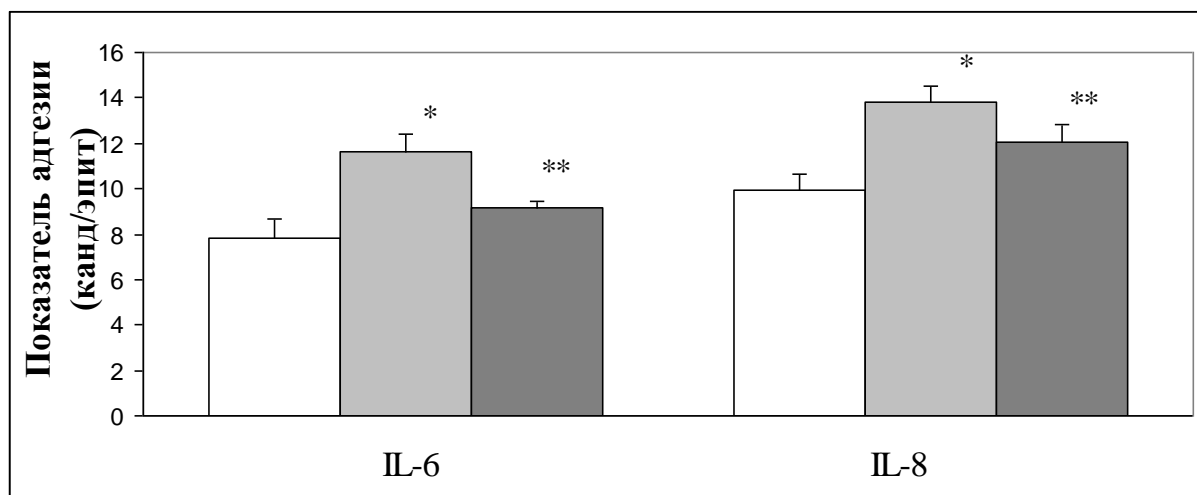


Рисунок 2 - Влияние IL-6, IL-8 и метаболитов *E. faecium* L3 на адгезию в экспериментальной тест-системе «*C. albicans* -эпителиоциты»

Примечание: - контроль: интактные эпителиоциты + интактные кандиды;
 - эпителиоциты, обработанные IL-6 или IL-8 + интактные кандиды;
 - эпителиоциты, обработанные IL-6 или IL-8 + кандиды, обработанные метаболитами *E. faecium* L3

* – достоверность отличий относительно контроля ($p < 0,05$);

** - достоверность отличий относительно эпителиоцитов, обработанных цитокином с интактными кандидами ($p < 0,05$)

Для оценки совместного действия интерлейкинов и метаболитов энтерококков на взаимодействие в системе «*C. albicans*-эпителиоциты» был проведен ряд экспериментов. Эпителиоциты стимулировали IL-6, («Sigma-Aldrich», USA; 10^{-12} г/мл) или IL-8 («Sigma-Aldrich», USA; 10^{-12} г/мл), инкубировали с кандидами, ранее обработанными метаболитами энтерококка (30 мин, 37°C). В качестве позитивного контроля использовали тест-систему «буккальные эпителиоциты, обработанные цитокином (IL-6 или IL-8) - интактные кандиды». Негативным контролем служила тест-система «интактные эпителиоциты - интактные кандиды».

Было выявлено, что адгезия кандид в тест-системе «*C.albicans*, обработанные метаболитами энтерококка - буккальные эпителиоциты, обработанные IL-6 или IL-8» была значительно ниже адгезии в системе «интактные кандиды - обработанные цитокинами эпителиоциты» ($p<0,05$) и, приближалась к показателям в тест-системе «интактные кандиды - интактные эпителиоциты» (негативный контроль) (Рисунок 2). Это показало, что негативный эффект от воздействия провоспалительных цитокинов на эпителий может быть нейтрализован предварительной обработкой кандидат продуктами метаболизма энтерококков.

Таким образом, снижение адгезивности *Candida spp.* под действием метаболитов энтерококков в экспериментальной тест-системе с буккальными эпителиоцитами носило штамм-зависимый характер. В то же время, продукты метаболизма культивируемых энтерококков не приводили к десорбции уже адгезированных на эпителиоцитах кандидат. Метаболиты энтерококков преимущественно с молекулярной массой 3-10 кДа вызывали конформационные изменения адгезивных структур кандидат. Воздействие IL-6 и IL-8 на буккальные клетки повышало уровень искусственной колонизации в тест - системе «эпителиоциты - *C.albicans*», при этом предварительная обработка кандидат метаболитами энтерококков нивелировала данный эффект.

Влияние метаболитов энтерококков на жизнеспособность и рецептор - зависимую активность буккальных эпителиоцитов

Эпителиоциты играют активную роль в процессах адгезии и колонизации микроорганизмами слизистых оболочках (Величко Е.В., 2003; Лесовой В.С. и др., 2003; Маянский А.Н., 2005). Было исследовано влияние продуктов метаболизма энтерококков на адгезивность эпителиоцитов. Было установлено, что метаболиты энтерококков принципиально не влияли на адгезивность буккальных эпителиоцитов в отношении кандидат ($p>0,05$).

Микроорганизмы способны регулировать активность эпителиальных клеток через контакт с Toll-подобными рецепторами, взаимодействие с которыми запускает каскад иммунных реакций (Бондаренко В. М., 2010; Rachmilevitz D., 2004). Влияние метаболитов разных штаммов энтерококков на экспрессию Toll-подобных рецепторов буккальных эпителиоцитов оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Среди интактных эпителиоцитов у здоровых доноров, общее количество TLR2- позитивных клеток было всегда ниже, чем TLR4-позитивных клеток и составляло 29,8%

и 55,0% от общего числа эпителиальных клеток. После контакта с метаболитами энтерококков процентное соотношение TLR-2 и TLR-4 – позитивных эпителиоцитов менялось. Выраженность и направление TLR – зависимых изменений зависели от физико-химических свойств (состава) метаболитов определенного штамма (Таблица 3). В то же время, изменения экспрессии TLR-2 не коррелировали с направлением и выраженностью экспрессии TLR-4 (Таблица 3) ($r_s=0,17$). Количество TLR-2/4- негативных эпителиоцитов сильно варьировало и находилось в диапазоне от 25% до 78%. При этом, действие метаболитов лишь некоторых штаммов приводило к существенному снижению процента TLR-2 и TLR-4 – позитивных эпителиоцитов, по сравнению с интактными клетками.

Таблица 3 - Субпопуляции буккальных эпителиоцитов, экспрессирующие TLR-2 и TLR-4 до и после обработки метаболитами энтерококков *in vitro* $M \pm m$

Штаммы энтерококков - продуценты метаболитов	Процент буккальных эпителиоцитов, экспрессирующих TLR-2 и TLR-4 в популяции (%)				
	только TLR-2	только TLR-4	TLR-2 и TLR-4	всего TLR-2-позитивных клеток	всего TLR-4-позитивных клеток
Контроль (бульон TSB)	0,4±0,03	25,6±5,87	29,4±7,22	29,8±5,10	55,0±8,91
<i>E. faecium</i> L3	1,85±0,03	17,0±5,12	37,9±3,95	39,75±6,80	54,9±6,22
<i>E. faecium</i> 174-3	16,88±2,30*	0,6±0,02*	5,9±2,02*	22,78±2,03	6,5±1,36*
<i>E. faecalis</i> 651	0,53±0,01	8,46±2,75*	53,76±4,30*	54,29±4,61*	62,22±5,81
<i>E. faecalis</i> 179-2	0,4±0,01	12,96±3,12	48,5±9,83	48,9±7,11	61,46±5,37
<i>E. faecalis</i> 208	7,6±0,80*	8,29±2,34*	15,86±4,03	23,44±4,31	24,13±2,89
<i>E. faecalis</i> 682	7,76±0,23*	10,59±3,41	20,25±3,61	28,01±3,86	30,84±4,45
<i>E. faecalis</i> 2482	13,52±3,76*	1,47±0,07*	7,1±1,10*	20,62±2,91	8,57±1,76*
<i>E. faecalis</i> 4276	0,31±0,13	32,6±3,8	25,0±3,27	25,31±5,84	57,7±5,32
<i>E. faecalis</i> 4304	0,18±0,01	49,2±7,92	23,9±0,06	24,08±3,05	73,1±7,03*
<i>E. faecalis</i> 4306	0,15±0,03	44,2±5,01	23,4±2,97	23,19±2,46	67,6±6,09
<i>E. faecalis</i> 4314	0,05±0,06	53,1±3,66*	21,7±3,74	21,75±4,00	74,8±5,61*

Примечание:

* – достоверность отличий относительно контроля в группе факторов ($p < 0,05$)

Одновременно, было установлено, что продукты метаболизма энтерококков не влияли на жизнеспособность эпителиальных клеток: количество витальных клеток в экспериментах не снижалось, по сравнению с

контролем и составляло от 94% до 99,9% ($p > 0,05$). Статистический анализ подтвердил отсутствие корреляции между изменениями адгезивных свойств эпителиоцитов и уровнем экспрессии TLR-2 ($r_s = 0,1$) или TLR-4 ($r_s = 0,3$) при действии на клетки метаболитов энтерококков разных штаммов.

Таким образом, метаболиты энтерококков способны регулировать экспрессию TLR-2 и TLR-4 на эпителиоцитах, не снижая жизнеспособности эпителиальных клеток. Изменение уровня экспрессии TLR-2 и TLR-4 под действием энтерококковых метаболитов носит штамм-специфический характер и не коррелирует с адгезивной активностью эпителиоцитов в отношении кандид.

Взаимодействие энтерококков с кандидами в экспериментах *in vitro*

Была исследована возможность энтерококков оказывать фунгицидное или фунгистатическое действие на грибы рода *Candida*. В качестве тест-культуры был взят штамм *E. faecium* L3, обладающий пробиотическими свойствами (Ермоленко Е.И. и соав., 2008). Было выявлено, что при одновременном совместном культивировании *C. albicans* 601 и *E. faecium* L3 на двухслойном агаре, количество колоний кандид достоверно не снижалось ($p > 0,05$), в то же время отмечалось уменьшение диаметра колоний микромицетов, что указывало на ингибирующий эффект метаболитов энтерококка в отношении кандид *in vitro*. Эксперименты с *C. glabrata* 44-1 показали сходный результат. В экспериментах с «отсроченным антагонизмом» (при накоплении метаболитов энтерококков в среде) было выявлено достоверное снижение размера колоний *C. albicans* 601 в 1,23 - 2,0 раза в зависимости от тестируемого штамма энтерококков ($p < 0,05$). Одновременно на двухслойном агаре с посевами *E. faecalis* 4314, *E. faecium* 173-5, *E. faecium* 174-3 наблюдалось снижение количества колоний кандид в 2,87; 2,28 и 2,63 раз, соответственно ($p < 0,05$). Таким образом, метаболиты исследуемых штаммов энтерококков обладали фунгистатическим эффектом, а у отдельных штаммов – фунгицидным эффектом.

В отдельной серии экспериментов суспензию кандид инкубировали (1, 2 или 24 часов, 37°C) с суточной бульонной культурой *E. faecium* L3. Засевали микромицеты на агар Сабуро. Преинкубация кандид с энтерококковыми метаболитами приводила к снижению КОЕ, в среднем, в 1,22-1,5 раза (Таблица 4). Наиболее стабильное снижение числа жизнеспособных кандид наблюдалось после 2 часов инкубации с продуктами метаболизма энтерококка; более длинная экспозиция не приводила к усилению эффекта, что, возможно, было связано с истощением активных субстанций.

Таким образом, все проведенные нами эксперименты показали, что энтерококки способны проявлять антагонизм в отношении кандид за счет продукции бактериальных секретов, которые могут оказывать фунгистатический и штамм-зависимый фунгицидный эффекты.

Таблица 4 - Влияние метаболитов *E. faecium* L3 на жизнеспособность кандид *in vitro*, $M \pm m$

Штаммы кандид	Время обработки кандид метаболитами энтерококка		
	1 ч	2 ч	24 ч
	Кратность снижения количества КОЕ кандид после обработки метаболитами энтерококка (количество раз)		
<i>C. albicans</i> 601	0,89±0,30	1,50±0,52	0,80±0,17
<i>C. glabrata</i> 44-1	0,99±0,44	1,29±0,33	1,80±0,59
<i>C. krusei</i> 583	1,46±0,61	1,36±0,27	1,23±0,35
<i>C. kefyr</i> 17	0,88±0,29	1,22±0,48	2,69±0,96

TLR - зависимая активность буккальных эпителиоцитов у больных кандидозом полости рта

Развитие кандидоза слизистых оболочек зависит не только от вирулентности штамма микромицетов, но и от эффективности факторов местной защиты, в том числе, от реактивности клеток эпителия (Сергеев А. Ю., Сергеев Ю.В., 2001; Величко Е.В., 2003; Махрова Т.В., 2004; Маянский А.Н., 2006). Одним из показателей функционального состояния эпителиоцитов является активность рецепторного аппарата клеток (Маянский А.Н. и соавт., 2005), в частности уровень экспрессии Toll - подобных рецепторов (TLR) (Ганковская и др., 2009).

Было произведено измерение экспрессии Toll-подобных рецепторов TLR-2 и TLR-4 на буккальных эпителиоцитах здоровых людей (16 человек), а также у пациентов с кандидозом полости рта (11 человек). Установлено, что у здоровых людей процент буккальных эпителиоцитов, экспрессирующих TLR-4 был больше, чем экспрессирующих TLR-2. В то же время, у пациентов с оральным кандидозом наблюдалось обратное соотношение: процент TLR-4 – позитивных клеток был ниже, чем TLR-2 – позитивных эпителиоцитов (Рисунок 3Б). При этом, у больных с оральным кандидозом количество TLR-4⁺ - эпителиоцитов снижалось в 9,6±2,8 раз, и составляло 4,5±1,6% от популяции. Количество TLR-2⁺ - эпителиоцитов также снижалось в 1,4±0,69 раза относительно показателей у здоровых и составляло 16,13±4,7% от популяции (Рисунок 3А). Одновременно, у больных с кандидозом полости рта отмечалось существенное увеличение процента буккальных клеток, в среднем до 82,8% не способных экспрессировать ни TLR-2, ни TLR-4 ($p < 0,05$). Это могло быть связано с димеризацией и/или потерей (шеддингом) TLRs. При этом, число жизнеспособных эпителиальных клеток у больных оральным кандидозом (99,7±0,24) не отличалось от аналогичного показателя у здоровых доноров (99,1±0,53) ($p > 0,05$).

Проведенные исследования показали, что кандид-индуцированный воспалительный процесс вызывает существенную перестройку в TLR-2 и TLR-4 - зависимом рецепторном аппарате буккальных клеток на фоне сохранения жизнеспособности клеток эпителия.

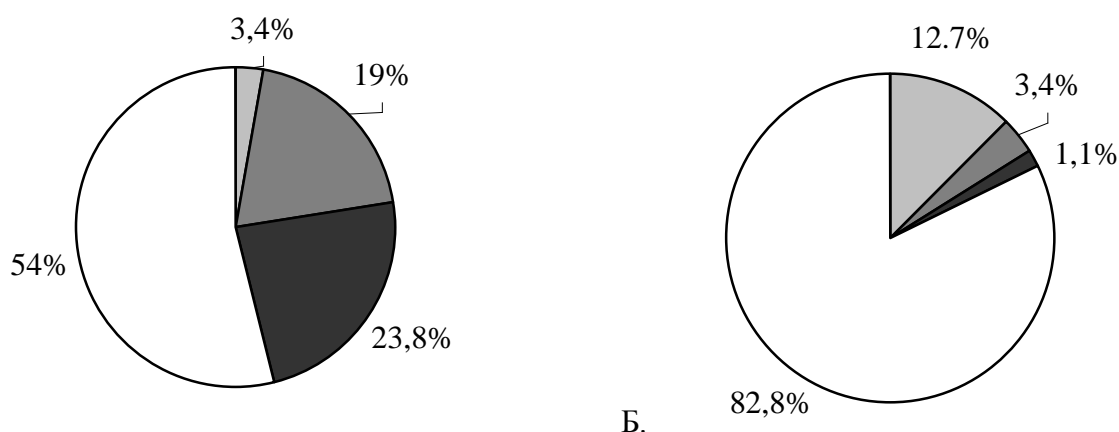


Рисунок 3 – Экспрессия TLR-2 и TLR-4 на буккальных эпителиоцитах
 А. - у здоровых доноров (контроль); Б. - у больных оральным кандидозом
 Примечание: □ - TLR-2/4 негативные клетки; ◻ - TLR-2 позитивные клетки; ◼ - TLR-2/4 позитивные клетки; ◼ - TLR- 4 позитивные клетки

Взаимоотношение энтерококков и кандид в системах *in vivo*

1) Взаимоотношения энтерококков, кандид и лактобактерий на уровне вагинального биотопа у женщин репродуктивного возраста

Для анализа взаимоотношений энтерококков и кандид в системах *in vivo* были проведены исследования вагинального содержимого 552 женщин 18-35 лет с дисбиозом влагалища разной этиологии. Из них были отобраны и проанализированы 399 образцов, полученных от женщин, во влагалище которых присутствовала микробиота в одном из вариантов: а) кандиды; б) энтерококки; в) кандиды и энтерококки. Анализ данных показал, что с увеличением количества энтерококков во влагалище концентрация кандид снижалась (Таблица 5). При статистической обработке было установлено наличие обратной зависимости при средней силе корреляционной связи ($r_s = -0,66$) между интравагинальными популяциями энтерококков и кандид.

Таблица 5 - Процент встречаемости кандид в вагинальном содержимом обследованных женщин при различных титрах энтерококков, $M \pm m$

титр кандидат	отсутствие кандидат	до 10^4 КОЕ/мл («норма»)	$10^4 - 10^5$ КОЕ/мл	10^6 КОЕ/мл и выше
титр энтерококков				
отсутствие энтерококков		52,2±1,3%	39,0±1,9%	8,8±0,5%
до 10^3 КОЕ/мл	78,8±2,8%	13,5±1,1%	7,69±0,02%	0
свыше 10^3 КОЕ/мл	89,2±3,1%	5,92±0,7%	4,88±0,19%	0

Так, при отсутствии энтерококков в содержимом влагалища у 52,2% пациенток были выделены кандиды в концентрации, не превышающей нормальную (10^4 КОЕ/мл), у 47,8% – число кандид было выше нормы. При

обнаружении в вагинальном содержимом энтерококков в концентрации до 10^3 КОЕ/мл (норма) у 78,8% женщин кандиды отсутствовали, в 13,5% случаев число микромицетов не превышало 10^4 КОЕ/мл, и только у 7,69% пациентов количество кандид превышало норму. С другой стороны, при повышении количества энтерококков свыше 10^3 КОЕ/мл у 89,2% женщин кандиды отсутствовали, у 5,92% пациенток концентрация кандид не превышала норму, и лишь в 4,88% случаев число кандид было выше нормы (Таблица 5).

Таким образом, на уровне вагинального биотопа у женщин детородного возраста наблюдались антагонистические взаимоотношения между энтерококками и кандидами.

Поскольку доминирующей микрофлорой влагалища у женщин являются лактобактерии (Мусаева З.М., 2008; Прилепская В. Н., и др., 2009; Цизина Е.А., Ильина Н.А., 2011; Бондаренко К.Р. и соав. 2014; Соловьева И.В. и соав. 2014), мы посчитали необходимым дополнительно исследовать взаимоотношения кандид и энтерококков с *Lactobacillus spp.* в вагинальном эпителие. Были определены следующие титры лактобацилл в вагинальном содержимом: $<10^3$, 10^3-10^5 и $>10^5$ КОЕ/мл (норма). Статистический анализ данных показал отсутствие корреляционной связи между количеством кандид и титром лактобактерий в вагинальном содержимом: ($r_s=0,16$). Наличие энтерококков также не оказывало существенного влияния на титр лактобактерий в биотопе ($r_s= 0,25$). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии прямых антагонистических взаимоотношений между лактобактериями и минорными представителями вагинального биотопа - кандидами и энтерококками. Таким образом, наши исследования показали, что увеличение титра энтерококков негативно влияет на развитие популяции кандид в вагинальном биотопе, что, возможно, связано с продукцией бактериальных метаболитов, обладающих антифунгальной активностью.

2) Влияние энтерококков на развитие экспериментального вагинального кандидоза у крыс

Для оценки воздействия метаболитов энтерококков на *C. albicans* на уровне вагинального биотопа была проведена работа *in vivo* на крысах-самках с экспериментальным вагинальным кандидозом. В ходе исследования животные были разделены на 3 группы, которым на фоне вагинального кандидоза ежедневно интравагинально вводили субстанции: 1-й группе - метаболиты энтерококков; 2-й группе - живую чистую культуру энтерококков; 3-й группе - стерильный бульон TSB.

В группе животных, которым вводили продукты метаболизма энтерококков, наблюдалась заметная тенденция к снижению количества кандид в вагинальном содержимом: к концу 7-х суток эксперимента титр кандид не превышал $2,6 \cdot 10^4$ КОЕ/мл (Рисунок 4). У животных, которым вводилась суспензия живых энтерококков также наблюдалось некоторое снижение титра *C. albicans*, однако, данный эффект наступал позже и был менее стабилен. В контрольной группе титр кандид в вагинальном

содержимом, в большинстве случаев, снижался не существенно в течение эксперимента (Рисунок 4).

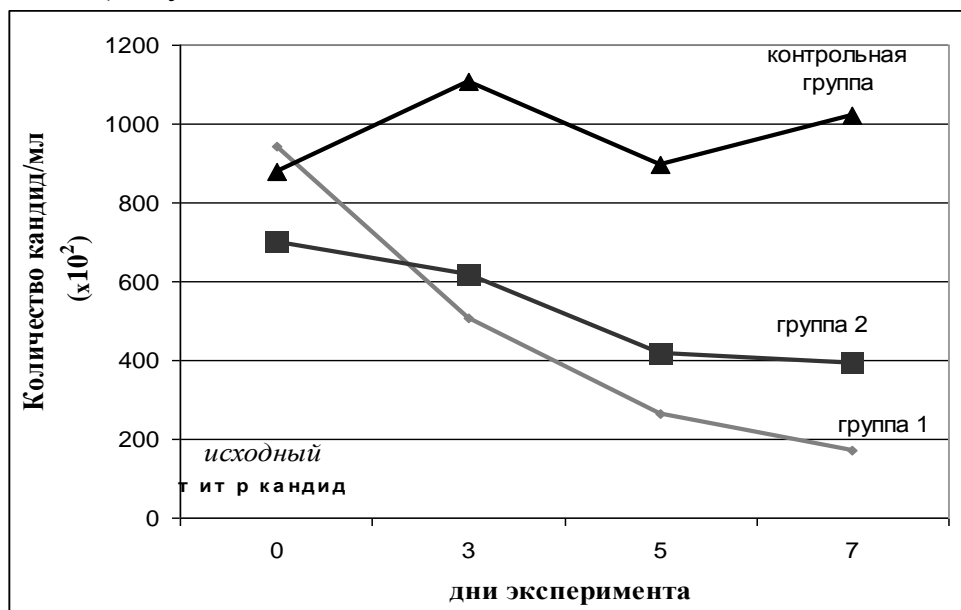


Рисунок 4 - Концентрация кандид в вагинальном содержимом крыс разных групп в динамике эксперимента

Таким образом, эксперимент *in vivo* на животных показал, что продукты метаболизма энтерококков способствуют снижению уровня колонизации вагинальной полости микромицетами и элиминации кандид. Скорость очищения вагинального эпителия от кандид напрямую зависит от концентрации энтерококковых метаболитов в вагинальной полости.

ВЫВОДЫ

1. Метаболиты *E. faecium* и *E. faecalis*, преимущественно, с молекулярной массой 3-10 кДа подавляют адгезию *Candida spp.* к буккальным эпителиоцитам *in vitro*, вызывая структурные изменения в рецепторном аппарате кандид. Продукты метаболизма энтерококков обладают фунгистатическим, а у отдельных штаммов - фунгицидным эффектом в отношении кандид разных видов.

2. Воздействие IL-6 и IL-8 на буккальные клетки повышает уровень искусственной колонизации в экспериментальной системе «эпителиоциты - *C. albicans*». В то же время, преинкубация кандид с метаболитами *E. faecium* L3 подавляет способность микромицетов прикрепляться к IL-6/IL-8-стимулированным эпителиоцитам.

3. Метаболиты *E. faecium* и *E. faecalis* способны изменять TLR-зависимую функциональную активность мукозальных эпителиоцитов, но не влияют на их адгезивность в отношении кандид.

4. При кандидозе ротовой полости у пациентов наблюдается повышение экспрессии TLR-2 и снижение экспрессии TLR-4 на буккальных клетках при одновременном увеличении процента TLR-2/4 – негативных эпителиоцитов.

5. Энтерококки проявляют выраженный антагонизм в отношении кандид в вагинальном биотопе у женщин репродуктивного возраста: повышение титра *Enterococcus spp.* сопровождается снижением титра *Candida spp.*.

6. Продукты метаболизма энтерококков способствуют ускорению элиминации кандид из вагинальной полости крыс с экспериментальным вагинальным кандидозом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Оценка экспрессии TLR-2 и TLR-4 на буккальных эпителиоцитах может использоваться в качестве объективного критерия воспалительного процесса в полости рта.

2. Интенсивность изменений уровня экспрессии TLR-2 и TLR-4 на буккальных эпителиоцитах при контакте с продуктами секреции микроорганизмов может служить одной их характеристик патогенности/агрессивности штамма.

3. Экспериментальная тест – система «искусственная колонизация кандид на буккальных эпителиоцитах» может быть использована как мишень при интегральном исследовании антикандидозной активности пробиотических штаммов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Предполагается продолжение оценки изменений уровня экспрессии TLRs на буккальных эпителиоцитах при различных патологических состояниях полости рта, что позволит сформировать четкие TLR- зависимые границы реактивности орального эпителия в «норме» и при патологии.

Дальнейшие исследования будут направлены на получение изолированных компонентов - продуктов метаболизма энтерококков - и изучение их воздействия на кандиды, с целью выявления вещества или группы веществ, обладающих антиадгезивной активностью в отношении микромицетов.

Планируется расширить исследование антикандидозной активности у различных минорных представителей нормальной микробиоты человека.

СПИСОК РАБОТ, ОБУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Ускова, Н.А.** Влияние метаболитов *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis* на взаимодействие *Candida albicans* с буккальными эпителиоцитами *ex vivo* / **Н.А. Ускова**, М.И. Заславская, Т.В. Махрова, А.Н. Суворов / Материалы научно-практической конференции по медицинской микологии (XIV Кашкинские чтения), 22-23 июня 2011, Санкт-Петербург. - Проблемы медицинской микологии. – 2011. – № 2. – С. 113.

2. **Ускова, Н.А.** Влияние внутривагинального введения *Enterococcus faecium* на развитие кандидоза у крыс / **Н.А. Ускова** / Материалы 3-го Съезда микологов России. Современная микология в России. Том 3, 10-12 октября 2012, Москва – М.: Национальная академия микологии, 2012. – С. 492.

3. **Ускова, Н.А.** Влияние *Enterococcus faecium* на развитие экспериментального кандидоза у крыс / **Н.А. Ускова**, Т.В. Махрова, А.Н. Суворов, М.И. Заславская // **Материалы научно-практической конференции по медицинской микологии (XV Кашкинские чтения).** 27-28 июня 2012, Санкт-Петербург. - Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14. – № 2. – С. 131.

4. **Александрова, Н.А.** Влияние метаболитов *Enterococcus faecium* на жизнеспособность *Candida spp.* / **Н.А. Александрова**, М.И. Заславская, Т.В. Махрова // **Материалы научно-практической конференции по медицинской микологии (XVI Кашкинские чтения).** 19-21 июня 2013, Санкт-Петербург. - Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т. 15. – № 2. – С. 52.

5. **Лукова, О.А.** Влияние женских половых гормонов и цитокинов на адгезивные взаимодействия эпителиальных клеток слизистых оболочек с *Candida albicans in vitro* / **О.А. Лукова, Н.А. Александрова, М.И. Заславская** // **Медицинский альманах.** – 2014. – № 5 (35). – С. 102-104.

6. **Лукова, О.А.** Значение нуклеарного фактора- kB и митоген-активированных киназ в регуляции адгезивных взаимодействий буккальных эпителиоцитов с *Candida albicans* / **О.А. Лукова, М.И. Заславская, Н.А. Александрова** // **Материалы всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной.** Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения, 28 мая 2014. – Нижний Новгород, 2014. – С. 200.

7. **Александрова, Н.А.** Влияние метаболитов энтерококков и стафилококков на межклеточную адгезию в системе «*Candida albicans* – буккальные эпителиоциты» / **Н.А. Александрова**, Т.В. Махрова, М.И. Заславская // **Материалы всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной.** Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения, 28 мая 2014. – Нижний Новгород, 2014. – С. 206.

8. **Александрова, Н. А.** Влияние различных фракций метаболитов *Enterococcus faecium* на адгезивную способность *Candida albicans* / **Н.А. Александрова**, М. И. Заславская, Суворов А.Н. // **Материалы Российско-китайской научно-практической конференции по медицинской и клинической микологии (XVIII Кашкинские чтения).** 9-11 июня 2015, Санкт-Петербург - Проблемы медицинской микологии. - 2015. - Т. 17. – № 2. - С. 36.

9. **Заславская, М.И.** Влияние продуктов метаболизма энтерококков на адгезию *Candida albicans* (Berkhout) к буккальным эпителиоцитам *in vitro* / **М.И. Заславская, Н.А. Александрова, О.А. Лукова, А.Б. Карасева, А.Н. Суворов** // **Проблемы медицинской микологии.** – 2016. - Т. 18. – № 3. – С. 55-59.

10. **Александрова, Н.А.** Взаимоотношения *Candida* с энтерококками на уровне вагинального биотопа / **Н.А. Александрова, М.И. Заславская** // **Проблемы медицинской микологии.** – 2016. – Т. 18. – № 4. – С. 53–55.

11. **Александрова, Н.А.** Антагонистические взаимоотношения энтерококков с кандидами на уровне вагинального биотопа и в

экспериментах *in vitro* / Н.А. Александрова, М.И. Заславская, М.В. Вахромова // Медицинский альманах. – 2016. – № 5. – С. 91-94.

12. Александрова, Н.А. Влияние метаболитов энтерококков на взаимодействие *Candida sp.* с буккальными эпителиоцитами / Н.А. Александрова, М.И. Заславская // Материалы международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. «Материалы и технологии XXI века», 20-23 сентября 2016. – Казань, 2016. – С. 8.

13. Zaslavskaya, M.I. Influence of *Enterococcus faecium* on *Candida albicans* ability to adhesion and colonization of mucosal epithelial cells / M.I. Zaslavskaya, N.A. Uskova, T.V. Makhrova, A.N. Maianky // Материалы конференции ISTC Targeted Initiative “Probiotics and Health” Workshop, 5-7 октября 2010. – Yerevan, 2010. – P.12.

14. Zaslavskaya, M.I. Expression of TLR-2 and TLR-4 by mucosal epithelial cells after exposition with metabolites of *Candida* and bacterial representatives of human microbiota / M.I. Zaslavskaya, O.A. Lukova, N.A. Alexandrova, V.S. Kropotov // Материалы III Санкт-Петербургского международного экологического форума. Инфекция и иммунитет, 21-24 сентября 2014. – Санкт-Петербург, 2014. - С. 60-61.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДДС	- додецилсульфат натрия
ЗФР	- забуференный физиологический раствор
КОЕ	- колониобразующая единица
МПА	- мясо-пептонный агар
TSB	- трипсинизированный соевый бульон (Tryptone Soya Broth)
CD	- маркёры клеточной дифференцировки (cluster of differentiation)
MRS	- среда de Man, Rogosa, Sharpe
IL	- интерлейкин (interleukin)
TLR	- Toll-подобный рецептор

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает признательность сотрудникам ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава РФ доцентам кафедры микробиологии и иммунологии, к.м.н. Махровой Т.В. и к.б.н. Кропотову В.С., ассистенту к.б.н. Луковой О.А. и главному врачу стоматологической поликлиники, к.м.н. Китаевой Е.В. за помощь в организации экспериментов. Автор благодарен заведующему отделом молекулярной микробиологии ФГБНУ «НИИ экспериментальной медицины, Северо-Западное отделение» РАМН (Санкт-Петербург), члену-корреспонденту РАН, д.м.н. Суворову А.Н. за предоставленный штамм *E. faecium* L3. Автор признателен заведующей лабораторией микробиома человека и средств его коррекции ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора (Н. Новгород), д.м.н. Соловьевой за предоставленную возможность проведения экспериментов с использованием масс-спектрометрии. Автор благодарит всех соавторов, принимавших участие в научном исследовании.