**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования**
**«Нижегородская государственная медицинская академия»**
**Министерства здравоохранения Российской Федерации**

***На правах рукописи***

**Александрова Наталья Александровна**

# ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭНТЕРОКОККОВ, КАНДИД И МУКОЗАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

03.02.03 - микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Заславская М. И.

Нижний Новгород – 2017

О Г Л А В Л Е Н И Е

# ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования**

В настоящее время отмечается широкая распространенность оппортунистических инфекций, вызываемых грибами рода *Candida,* в особенности, мукозального кандидоза: вагинального и полости рта [10, 73, 127, 138, 164, 182]. Для лечения кандидоза слизистых оболочек применяют антисептики и антимикотики [15, 24, 78, 57, 84, 101, 207, 208]. Последние обладают рядом побочных эффектов, в частности, относительно высокой токсичностью [74, 92, 96], что накладывает ограничение на длительность их приема. Еще одной проблемой использования антифунгальных препаратов является приобретенная (вторичная) резистентность к ним кандид, которая в последнее время носит глобальный характер и имеет тенденцию к прогрессированию [17, 29, 111, 112, 152, 207]. Устойчивость микромицетов к противогрибковым препаратам часто отмечается при хроническом кандидозе слизистых оболочек [77, 165, 180, 208], что приводит к дополнительным затратам на лечение, а также существенному снижению качества жизни пациента.

Вагинальный кандидоз, имеет, как правило, хроническое рецидивирующее течение [101, 160]. Несмотря на множество предложенных схем лечения данной патологии, эффективность их недостаточно высока [24, 102]. Это свидетельствует, в первую очередь, о многофакторности патогенеза заболевания, который не следует рассматривать лишь через призму потенциальной патогенности кандид. Способность микромицетов к клинически-значимой персистенции на уровне слизистых оболочек (в частности, полости рта и вагинальной полости) является также отражением взаимодействия кандид с представителями микробиоценоза и факторами колонизационной резистентности макроорганизма. В связи с этим, идет постоянный поиск новых антифунгальных препаратов [157, 180, 186, 224], где в попытке взять под контроль кандида-ассоциированный дисбиоз, особое внимание уделяется исследованию антагонистических взаимоотношений между микроорганизмами-резидентами биотопа и применению пробиотиков для интравагинального использования [142].

Также, в настоящее время, отмечается повышенный интерес к применению метабиотиков, сконструированных на основе структурных компонентов клеток, метаболитов и сигнальных молекул пробиотических штаммов микроорганизмов [107]. В связи с вышеизложенным, исследования, посвященные изучению антифунгальной активности бактерий рода *Enterococcus* в отношении кандид, реализуемой в системах с мукозальными эпителиоцитами, являются своевременными и актуальными.

**Степень разработанности темы исследования**

Нормальная микробиота является одним из факторов, обеспечивающих колонизационную резистентность слизистых оболочек, направленную на защиту мукозальных эпителиальных клеток от адгезии и колонизации патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. Изучению роли отдельных представителей нормальной микробиоты в подавлении потенциальных патогенов, в том числе кандид, и поддержании баланса в мукозальных микробиоценозах посвящено значительное количество работ.

В последнее время большое внимание уделялось лактобациллам – облигатным представителям микробиоты кишечника и влагалища. Они или их ассоциация с другими микроорганизмами входят в состав многих пробиотических препаратов, используемых для лечения (совместно с антимикотиками) и профилактики вагинального кандидоза [2, 18, 33, 40, 132, 142, 161, 231]. Однако, известно, что при хронической рецидивирующей форме вагинального кандидоза общее число лактобацилл может сохраняться [42]. Более того, элиминация лактобацилл из вагинальной полости не обязательно ведет к увеличению количества кандид и развитию кандидоза [21, 42]. Это означает, что лактобациллы в вагинальном биоценозе не всегда способны противодействовать чрезмерному росту кандид *in vivo*. В связи с этим, представляется логичным поиск штаммов других видов бактерий с потенциальной антикандидозной активностью, 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 [20, 23, 38, 137, 139], что делает их реальными кандидатами на роль антагонистов кандид [206, 221]. Энтерококки присутствуют в составе пробиотических препаратов, используемых для коррекции дисбиоза кишечника [16, 22], но их антифунгальный потенциал ранее не был протестирован на уровне вагинального биотопа. Для изучения антагонистических взаимоотношений между микроорганизмами чаще всего используются классические бактериологические методики, а также исследования на уровне биопленок [44, 98]. Так, в ряде работ говорится о способности энтерококков подавлять рост грибов рода *Candida*, при этом не рассматривается воздействие энтерококков на рецепторный аппарат микромицетов, участвующий в процессе адгезии кандид к эпителиоцитам [98, 139] .

При рассмотрении антагонистических взаимоотношений микроорганизмов внутри биотопа также не учитывается реакция самого эпителия на присутствие микроорганизмов, что может привести к несоответствию результатов, полученных *in vitro* и *in vivo*.

Эпителиоциты играют существенную роль в обеспечении колонизационной резистентности слизистых [55, 62, 196] 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 [143, 168, 216]. Таким образом, при изучении антагонистических взаимоотношений энтерококков и кандид мы посчитали необходимым учитывать не только прямое воздействие бактерий на микромицеты, но и их взаимодействия в экспериментальных системах 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 Российской Федерации 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. 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» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Методология 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 буккальных эпителиоцитов. Основными объектами исследования являлись микромицеты рода *Candida*, бактерии рода *Enterococcus* и буккальные эпителиоциты человека. По теме исследования был собран и проанализирован большой объем научной литературы, включающий в себя

отечественные и иностранные источники. Работа выполнялась с использованием классического микробиологического исследования и современных молекулярных методов. В работе использовалось современное оборудование для проведения проточной цитофлуориметрии и протеомного анализа. Эксперименты проводились в системах *in vitro* и *in vivo* (лабораторные животные). Полученные данные обрабатывались статистическими методами.

## Материалы и методы исследования

### Объекты исследования

**1. Штаммы микроорганизмов**

В работе использовали штаммы микромицетов рода *Candida: C. albicans* 601, *C. glabrata* 44-1, *C. krusei* 583, *C.tropicalis* 127, *C. kefir* 17 (из коллекции кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава РФ, г. Н. Новгород).

В ходе работы были выделены чистые культуры клинических изолятов следующих штаммов энтерококков: *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, а также штамм *E. faecium* L3, полученный из коллекции отдела молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Института экспериментальной медицины» г. Санкт-Петербурга.

**2. Буккальные эпителиоциты**

Для исследования адгезивных взаимоотношений в системе «кандида-эпителиоциты» использовали буккальные клетки, полученные от здоровых некурящих доноров-добровольцев 18-35 лет на базе кафедры микробиологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Н. Новгород.

Для изучения экспрессии TLRs на буккальных эпителиоцитах при кандидозе полости рта, эпителиальные клетки получали от пациентов с

хроническим оральным кандидозом на базе стоматологической поликлиники Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**3. Лабораторные животные**

Для моделирования вагинального кандидоза в системе *in vivo* использовались белые крысы (самки) породы Вистар (36 шт.) с массой тела в 200-270 г. из вивария Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**4. Содержимое влагалища женщин**

Для изучения корреляционной зависимости между титрами кандид, энтерококков и лактобацилл в вагинальном биотопе исследовали вагинальное содержимое женщин репродуктивного возраста. Клинический материал был получен врачами-гинекологами ООО «Клиника современных технологий «Садко»» 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**

В работе было исследовано свыше 950 препаратов искусственной колонизации буккальных эпителиоцитов человека (93 серии экспериментов). Исследована TLR-зависимая активность эпителиоцитов, полученных от 11 больных с кандидозом полости рта и 16 здоровых доноров.

Проведено бактериологическое исследование вагинального содержимого 552 женщин, а также свыше 1350 бактериологических исследований, включающих 7 серий экспериментов по изучению антагонистической активности энтерококков и кандид *in vitro* и 3 серии *in vivo*. Было проведено более 100 посевов в экспериментах с чистыми культурами микроорганизмов, а также более 470

посевов вагинального содержимого, полученного от женщин детородного возраста.

Для моделирования вагинального кандидоза использовали 36 белых беспородных крыс.

Выполнено 4 серии экспериментов на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II System with Fluidics Cart (6-color, blue/red, USA).

**Методы исследования**

**Микробиологические методы исследования**

Чистую культуру микромицетов получали на агаре Сабуро ($37^0$, 24ч) согласно Приказу Министерства Здравоохранения СССР №535 от 22.04.1985г. [72]. Предварительную идентификацию кандид проводили с помощью посева на хромогенную среду HiChrome candida agar (HiMedia, India). Для финального типирования использовали пластины для биохимической идентификации (Auxacolor, BioRad, France) согласно инструкции фирмы - производителя.

Чистую культуру энтерококков выделяли на 5% кровяном агаре согласно Приказу Министерства Здравоохранения СССР №535 от 22.04.1985г. [72]. Для предварительной идентификации использовали хромогенную среду энтерококкагар (ФБУН ГНЦ ПМБ «Оболенск», Россия). Окончательное определения видовой принадлежности клинических изолятов энтерококков производили с использованием микротест-системы EN-COCCUStest (Erba Lachema s.r.o., Чехия)

Штаммы энтерококков, тестируемые в экспериментах по изучению антагонистической активности в отношении кандид, типировали по спектру белков бактерий (белковое профилирование), используя метод MALDI-TOF (Времяпролетная Матрично-Активированная Лазерная Десорбция/Ионизация) масс-спектрометрии (MS) [199]. Анализ проводили согласно инструкции фирмы-производителя. Колонии полученной чистой культуры помещали на стальную мишень и сверху наслаивали матрицу, после чего мишень загружали в масс-спектрометр MALDI TOF Autoflex speed (Bruker Daltonik GmbH, Germany). Затем

прибор автоматически проводил операции по сбору исходных спектров исследуемых образцов. Для получения одиночного масс-спектра использовали 40 импульсов лазера (частота 60 Гц), анализируемый диапазон масса/заряд составил 2000 - 20000 Да. С каждой лунки мишени снимался исходный спектр, представляющий собой сумму шести одиночных спектров (240 импульсов лазера). Для получения достоверных результатов идентификации с каждого образца получали не менее пяти исходных спектров. Автоматическая идентификация была проведена с помощью программы Bruker MALDI Biotyper на основании сравнения собранных исходных спектров с референсными спектрами базы данных.

**Получение продуктов метаболизма энтерококков и их отдельных фракций**

Штаммы энтерококков *E. faecalis* и *E. faecium* культивировали в бульоне TSB (Soybean-Casein Digest broth, Becton, Dickenson and Company, USA, France). Супернатанты отделяли от клеток микроорганизмов центрифугированием (2000g, 15 мин), затем пропускали через бактериальные фильтры с диаметром пор 20 мкм (Sterile syringe filter, Corning, Germany).

Для фракционирования растворимых продуктов метаболизма энтерококков полученный фильтрат центрифугировали (6000g, 40мин) в пробирках со встроенным микрофильтром (Amicon® Ultra-15, Germany) с диаметром пор 3кДа, 10кДа или 30 кДа. Полученные после центрифугирования фракции бактериальных метаболитов с диаметром молекул менее 3кДа, 10кДа или 30 кДа, использовали в дальнейших экспериментах.

**Оценка адгезии кандид на буккальных эпителиоцитах**

**1. Получение клеточной суспензии *Candida spp.***

Культуру кандид получали в дрожжевой фазе на декстрозном агаре Сабуро (HiMedia, India) (24 ч, 37°C). Посевы смывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР, pH 7,2-7,4), трижды отмывали десятикратным объемом ЗФР

(1000g, 15 мин), затем ресуспендировали в ЗФР в концентрации $10^7$ кл/мл [55, 59, 60].

**2. Получение буккальных эпителиоцитов**

Буккальные эпителиоциты получали от здоровых доноров 18-45 лет, а также от больных кандидозом полости рта, утром, натощак, путем соскоба с внутренней поверхности щеки согласно методу, разработанному ранее в нашей лаборатории [56, 59, 60]. Эпителиальные клетки трижды отмывали от слюны ЗФР (40g, 5 мин), готовили взвесь с концентрацией $10^6$ кл/мл [55, 56, 59, 60]. Концентрацию эпителиоцитов определяли путем измерения оптической плотности суспензии на денситометре DEN-1 (ООО «Biosan», Латвия). В каждой серии экспериментов использовали эпителиоциты, полученные не менее чем от трех доноров [55].

**3. Искусственная колонизация *Candida spp.* на эпителиоцитах**

Искусственную колонизацию *Candida spp.* на эпителиоцитах проводили по методике, ранее разработанной в нашей лаборатории [25, 55, 59, 61]. Кандиды, полученные в дрожжевой фазе ($5 \cdot 10^7$ кл/мл), инкубировали в равных объемах (по 0,5 мл) с взвесью буккальных эпителиоцитов ($10^6$ кл/мл) в ЗФР (30 мин, 37°С), встряхивая каждые 5 мин [55, 59, 61].

В ряде экспериментов эпителиоциты или кандиды предварительно обрабатывали различными веществами (цитокины, метаболиты энтерококков), инкубируя суспензию клеток с испытуемыми реагентами в равных объемах (по 1,0 мл) в течение 30 мин при 37°С. После чего клетки дважды отмывали ЗФР и проводили совместное культивирование кандид и эпителиоцитов как указано в предыдущем абзаце.

Эпителиоциты трехкратно отмывали от неприкрепившихся клеток *Candida spp.* (40g, 5 мин), из осадка клеток (0,2 мл) готовили мазок, который фиксировали этанолом (10 мин) и окрашивали 0,25% водным раствором азура А (Sigma-Aldrich, USA) [55, 59]. Показатель (индекс) искусственной колонизации определяли как среднее количество прикрепившихся (адгезированных) кандид в перерасчете на

одну эпителиальную клетку при микроскопии не менее 100 эпителиоцитов [25, 55, 59] (Рисунок 1).

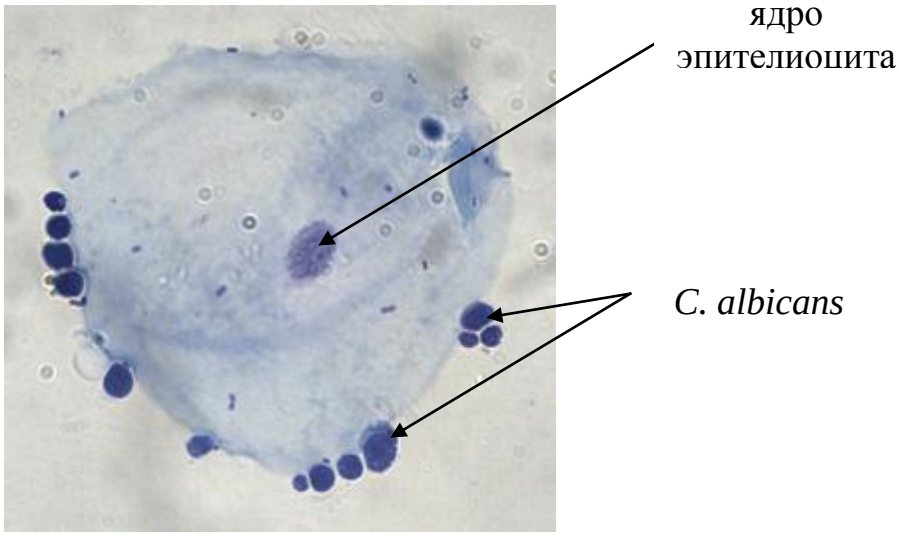



Рисунок 1 – Искусственная колонизация буккальных эпителиоцитов *C. albicans* (×800, Leica DM 4000B, USA)

В некоторых экспериментах, кандиды ($5 \cdot 10^7$ кл/мл), после инкубации с метаболитами энтерококков, трижды отмывали десятикратным объемом ЗФР для удаления нековалентно связанных частиц и смешивали в равных объемах (0,5 мл) с 0,1% водным раствором додецилсульфата натрия (ДДС) при постоянном перемешивании ($20^0$С, 10 мин, 6×100 мин$^{-1}$) на термомиксере (“Eppendorf”, USA), затем отмывали и ресуспендировали в ЗФР [25, 55, 59, 61]. Контролем служили интактные клетки, обработанные ДДС.

**Определение уровня экспрессии Toll-подобных рецепторов (TLR) буккальных эпителиоцитов методом проточной цитофлуориметрии**

Определяли уровень экспрессии TLR на буккальных эпителиоцитах по методу, разработанному в нашей лаборатории совместно с Луковой О. А. [55].

Взвесь эпителиоцитов ресуспендировали в ЗФР (концентрация $10^8$ кл/мл), пропускали через фильтры CellTricks с диаметром пор 100 мкм (Partec, Germany) и переносили в пробирки для цитофлуориметра [55]. Клетки осаждали центрифугированием (40g, 5мин), к осадку добавляли 0,5 мл среды 199 с солями

Хэнкса и глутамином (ПанЭко, г. Москва)» [55]. В ряде экспериментов к эпителиоцитам добавляли 0,5 мл метаболитов энтерококков, в контроле использовали равный объем TSB. Пробы инкубировали (30 мин, 37°С). Эпителиоциты из всех проб дважды отмывали ЗФР (40 g, 5 мин), к осадку клеток добавляли 100 мкл жидкости для цитофлуориметра «Cell wash». Материал в пробирках перемешивали на механическом шейкере (Вортекс V3, Elmi Латвия). Для выявления нежизнеспособных клеток [97] к буккальным эпителиоцитам (100 мкл) добавляли 20мкл 7-AAD (7-амино-актиномицин D) (BD Pharmingen, USA), выдерживали 15 минут в защищенном от света месте. Затем, в каждую пробу добавляли смесь антител CD282 (5мкл) и CD284 (5мкл) для обнаружения мембранных TLR-2 и TLR-4 на эпителиоцитах, соответственно. В образец для определения спонтанного окрашивания (негативный контроль) добавляли 20 мкл жидкости «Cell wash». Эксперименты каждой серии ставили в трех повторах [55].

Исследование проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II System with Fluidics Cart (6-color, blue/red, USA). Для калибровки прибора использовали программы BD Cytometer Setup and Tracking Beads (BD CS&T).

В результатах эксперимента учитывалась группа жизнеспособных буккальных эпителиоцитов, которую отбирали на основании параметров бокового (SSC) и прямого (FSC) светорассеивания: эпителиоциты с низкой гранулярностью (регион низкого светорассеяния) [36, 103, 104].

Результаты обрабатывали с помощью компьютерной программы FacsDiva 4.1. и вычислялись в процентах, как отношение числа эпителиоцитов, презентирующих на своей поверхности TLR-2 или TLR-4 к общему количеству жизнеспособных клеток в пробе [55].

**Методы оценки взаимодействия энтерококков и кандид *in vitro***

**1 . Совместное культивирование энтерококков и кандид на двухслойном агаре**

Мясо-пептонный агар (МПА) (ФБУН ГНЦ ПМБ «Оболенск», Россия) разливали в чашки Петри. На первый слой агара (высота - 0,8 см) засевали

энтерококк по методу Дригальского («сплошным газоном») (по 0,1 мл, $10^9$ кл/мл). Затем, наслаивали второй слой МПА, предварительно остудив до $40^0$С (высота слоя - 0,8 см). Засевали кандиды на поверхность второго слоя агара двумя способами: метод «сплошного газона» (0,1 мл суспензии, $10^3$кл/мл) и метод секторных посевов (по *Gold*) (суспензия кандид $10^8$кл/мл). Посевы инкубировали 24 часа при 37°С, после чего подсчитали количество колоний кандид на чашках Петри, используя счетчик колоний микроорганизмов СКМ-2 (Stegler, Россия). Для контроля роста кандид использовали посев на двухслойный агар без предварительного посева энтерококков.

В ряде экспериментов использовали метод отсроченного антагонизма энтерококков и кандид [76]. Энтерококки засевали на слой МПА и инкубировали (37ºС, 24 ч). На выросшую культуру *Enterococcus spp.* наслаивали агар Сабуро (0,8 см), давали среде остыть. Затем, на поверхность агара Сабуро засевали микромицеты «сплошным газоном». Инкубировали посев при 37ºС, 24 часа. Для контроля роста энтерококков использовали двухслойный агар без посева грибов рода *Candida*. Для контроля роста кандид использовали двухслойный агар без посева энтерококков. Подсчитывали количество выросших на чашках Петри колоний микромицетов (КОЕ) при помощи счетчика колоний микроорганизмов СКМ-2 (Stegler, Россия).

**2. Оценка жизнеспособности кандид после обработки метаболитами энтерококков *in vitro***

Метаболиты *E. faecium* L3 получали при культивировании бактерий на TSB и очищали от микробных клеток при помощи бактериального фильтра с диаметром пор 20 мкм (Sterile syringe filter, Corning, Germany).

Кандиды выращивали на агаре Сабуро (37°С, 24 ч.), отмывали ЗФР от культуральной среды (5 мин, 40g), от клеточных агрегатов освобождали центрифугированием (2 мин, 40g) и доводили до концентрации $10^4$ кл/мл в ЗФР и разливали по 1 мл в центрифужные пробирки. Осаждали клетки кандид в суспензии центрифугированием (5 мин, 40g), супернатант удаляли. К осадку кандид добавили полученный очищенный фильтрат бульонной культуры,

содержащий метаболиты энтерококка (1мл). В контроле вместо метаболитов использовали 1мл стерильной среды TSB. Пробы ресуспендировали и термостатировали (37°С) в течение 1, 2 или 24 часов. Затем готовили серию 10-ти кратных разведений взвеси кандид в ЗФР, из которых делали высевы (по 100 мкл из каждого разведения) на агар Сабуро. Посевы инкубировали (24 ч, 37°С), затем подсчитывали количество колоний кандид на агаре.

**Методы оценки взаимоотношений энтерококков и кандид в системах *in vivo***

1. **Определение содержания микроорганизмов (энтерококков, кандид, лактобактерий) в вагинальном содержимом у женщин**

Проводили посев содержимого влагалища женщин (18-35 лет) согласно приказу Минздрава СССР № 535 от 22 апреля 1985 г. [72] на базе женского центра (гинекологического отделения) ООО КСТ «Садко». Содержимое влагалища забирали ложкой Фолькмана в стерильную пробирку с 1мл стерильного ЗФР. Полученный клинический материал засевали на энтерококк агар (0,05 мл) и агар Сабуро (0,1мл) «сплошным газоном», а также на жидкую среду MRS в пробирках, куда вносили по 0,5 мл из разведений ($10^{-3}$ и $10^{-5}$) нативного ($10^{-1}$) материала. Посевы термостатировали (37°С, 48ч), после чего подсчитывали количество выросших колоний энтерококков и кандид, затем ретроспективно рассчитывали количество КОЕ в 1мл нативного материала по формуле $x=a\times10^{n+1}$, где а - количество выросших колоний, х - количество микроорганизмов в 1мл нативного материала, n - степень разведения.

Для определения титра (степень обсемененности) лактобацилл в вагинальном содержимом, оценивали наличие роста бактерий в пробирках с MRS с различным разведением нативного материала $10^{-3}$ и $10^{-5}$ (полуколичественный анализ), для чего из осадка бульонных культур готовили мазки, которые окрашивали по методу Грама. Видовую идентификацию кандид и энтерококков, выделенных от пациенток, проводили с помощью биохимических тестов Auxacolor (BioRad, France) и EN-COCCUStest (Erba Lachema s.r.o., Чехия) соответственно, согласно инструкциям фирм-производителей.

В статистическом корреляционном анализе участвовали лишь те образцы вагинального содержимого, которые соответствовали какому-либо из критериев: 1) наличие кандид 2) наличие энтерококков 3) наличие кандид и энтерококков.

**2. Моделирование и оценка вагинального кандидоза у крыс**

В работе использовали чистую культуру *E. faecium* L-3 и супернатант бульонной культуры (24ч, 37ºС) того же штамма, *C. albicans* штамм 601 в дрожжевой фазе получали на агаре Сабуро (24ч, 37ºС). Моделировали вагинальный кандидоз путем введения 0,2 мл суспензии кандид ($10^9$ кл/мл) в вагинальную полость белых беспородных крыс. Из зараженных животных отбирали для дальнейшего исследования тех, у кого (спустя сутки) была выявлена существенная обсемененность вагины, и титр кандид в вагинальном содержимом был в диапазоне $5 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. В дальнейшем, динамику развития экспериментального вагинального кандидоза оценивали у 36-и крыс (3 группы по 12 животных: контрольную и две экспериментальные). На фоне ежедневного введения энтерококков или их метаболитов проводили бактериологический посев содержимого влагалища крыс на агар Сабуро и ретроспективно вычисляли количество КОЕ в 1мл нативного материала по формуле $x=a \times 10^{n+1}$, где x - количество кандид в 1мл нативного материала, a - количество выросших колоний, n - степень разведения.

**Статистическая обработка результатов**

Статистическую обработку проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel 2007 и Statistica 6.1. Данные каждой выборки проверяли на нормальность распределения и представляли в таблицах (с указанием количества экспериментов - n) в виде группового среднего арифметического (M) и стандартной ошибки среднего – m (SEM). Межгрупповые различия анализировались параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения.

В качестве параметрического критерия был использован критерий Стьюдента. В качестве непараметрического критерия – критерий 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**

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 Федерального бюджетного учреждения науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н.Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Нижний Новгород) совместно с к.м.н. Беловой И.В. Работы по изучению вагинального содержимого женщин проводились на базе ООО «Клиника современных технологий «Садко»» (Нижний 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 экспериментальных образцов (свыше 950 препаратов в экспериментах по искусственной колонизации буккальных эпителиоцитов кандидами, более 500 образцов вагинального содержимого женщин), и большой объем проведенных экспериментов (проведено более 1000 бактериологических посевов, 4 серии экспериментов на проточном цитофлуориметре). В ходе работы использовались стандартные микробиологические методики для изучения микрофлоры вагинального содержимого (Приказ № 535 от 22.04.86), а также современные высокоточные приборы для исследования экспрессии Toll-подобных рецепторов на буккальных эпителиоцитах, а также идентификации энтерококков. Кроме того, результаты исследований, проведенных *in vivo,* соответствуют данным экспериментов *in vitro*, что подтверждает достоверность полученных результатов.

Диссертация апробировалась на расширенном заседании кафедры микробиологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Нижний Новгород) 30 июня 2017 г; протокол № 12.

Основные результаты диссертации были доложены 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.

**Объем и структура 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.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Морфо-функциональные особенности кандид и факторы, влияющие на развитие кандидоза

Кандиды - микроскопические полиморфные дрожжеподобные грибы, относящиеся к аскомицетам [19]. Род *Candida* насчитывает более 180 видов [81], которые рассматриваются как сапрофиты и, одновременно, как комменсалы человека и животных [24].

Дрожжевые клетки *Candida* имеют круглую, овальную или вытянутую (удлиненную) форму от 1,5 до 10 мкм [19, 24, 81]. Псевдомицелий (цепочка из нескольких удлиненных клеток) у кандид может быть хорошо развитым, рудиментарным или вовсе отсутствовать; некоторые виды грибов образуют истинный мицелий (Рисунок 2).

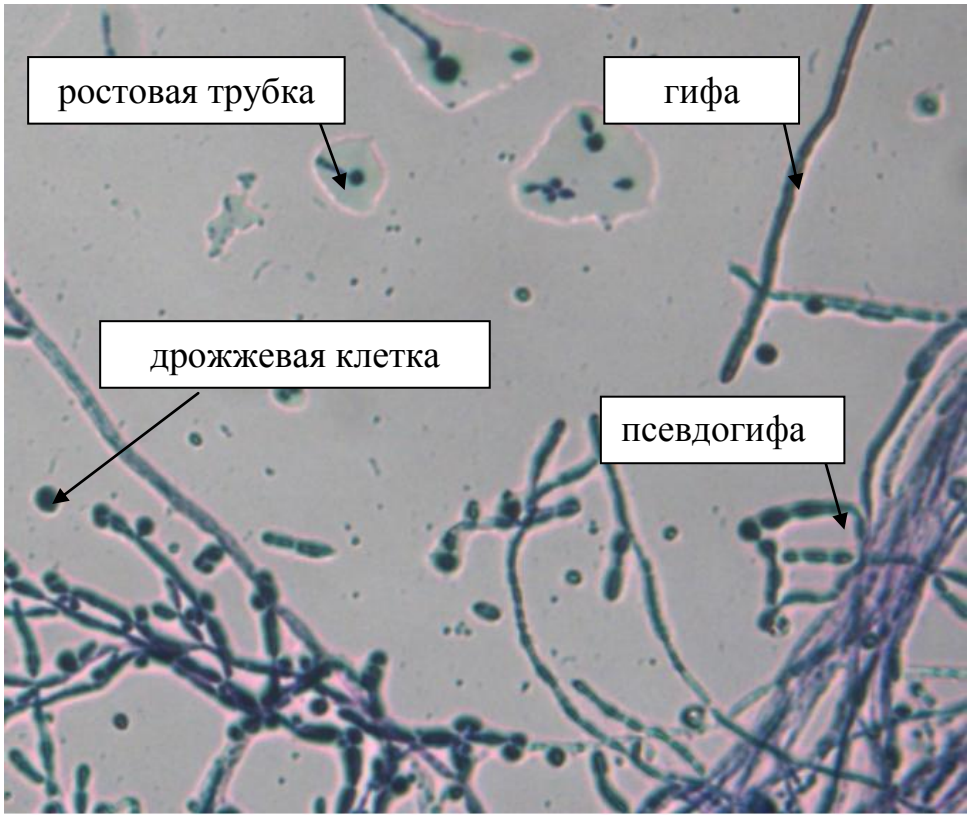



Рисунок 2 – Полиморфизм *Candida albicans:* дрожжевые клетки, гифы, псевдогифы, ростовая трубка (х 600, Leica DM 4000B, USA)

Кандиды – легко культивируемые микроорганизмы, хорошо растут на питательных средах, в особенности с добавлением углеводов, образуя крупные

белые или бело-кремовые гладкие пастообразные колонии [27]. Кандиды являются факультативными анаэробами, при этом гифальная форма в большей степени предпочитает анаэробные условия, чем дрожжевая. Оптимум pH - 5,8 - 6,5, однако могут культивироваться и при кислых значениях среды (pH - 2,5 - 3,0). Все представители рода *Candida* - мезофилы, оптимальная температура роста - 25-35$^{o}$C, но способны также расти и при температуре 37$^{o}$ C [27, 41].

Особенностью клеток данных микромицетов является наличие у них клеточной стенки, основными компонентами которой являются глюкан и маннан, находящиеся в тесной ассоциации с белком (маннопротеин), а также хитин (его концентрация выше у мицелиальных форм); минорными компонентами клеточной стенки являются липиды и полифосфаты [27, 41]. В клеточной стенке кандид могут присутствовать ферменты, большинство из которых являются гидролазами. Иногда на поверхности клеток *Candida spp.* обнаруживается дополнительный слой рыхлого, неструктурированного материала - полисахаридная микрокапсула.

Кандиды являются условно-патогенными микроорганизмами и могут стать причиной развития микозов человека. Основным возбудителем кандидоза (в 74-94% случаев) является *C. albicans.* Из других представителей рода наиболее часто кандидоз вызывают следующие виды *C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei, C. kefyr, C. (trulopsis) glabrata, C. guilliermondii, C. lusitaniae* [31, 41, 81, 90, 135].

Возможность развития инфекции зависит как от вирулентности штамма микроорганизма, так и от резистентности макроорганизма.

К факторам патогенности кандид относятся следующие:

1. Адгезивные молекулы (поверхностные протеины, фимбрии, маннопротеины клеточной стенки и пр.), которые обеспечивают адгезию и колонизацию микромицетов на тканях хозяина [75, 91, 127, 158];

2. Контаминация и колонизация поверхности также может быть связана с выраженной способностью кандид образовывать биопленки [30, 54, 181];

Микроорганизмы в составе биопленок более устойчивы к агрессивным воздействиям извне, в том числе, антибиотикам [79, 194. 214, 217]. Это позволяет кандидам стабилизировать процесс колонизации слизистых оболочек.

3. Ферменты инвазивности - такие как аспартил-протеиназы и фосфолипазы, вызывающие повреждение тканей хозяина и облегчающие попадание и распространение кандид в тканях [27, 75, 91, 158];

4. Морфологическая трансформация (дрожжевая – гифальная форма), полагают, что гифальная фаза более успешно способна проникать в ткани и избегать фагоцитоза [27, 91, 127, 158, 225];

5. Механизмы, обладающие способностью модулировать (часто - снижать активность) факторов иммунитета, в частности, опсонинов системы комплемента [155];

6. Наличие антиоксидантной и антилизоцимной активности [25, 30, 31, 85];

7. Токсигенность некоторых штаммов обеспечивается способностью продуцировать гемолизины и прочие токсины [176];

8. «Фенотипическая изменчивость, которая играет роль в процессах адаптации грибов к различным анатомическим нишам хозяина и приобретении резистентности к антифунгальным препаратам» [30, 211].

Следует понимать, что первым и ведущим фактором в развитии кандидозной инфекции являются адгезивные взаимодействия клеток кандид с эпителиоцитами и их способность закрепиться на слизистых оболочках, преодолевая факторы неспецифической резистентности [91, 158].

Грибы рода *Candida* могут использовать как специфическую (рецептор-зависимую), так и неспецифическую адгезию, осуществляющуюся за счет гидрофобных свойств клеточной стенки [220].

Неспецифические факторы адгезии на первом этапе позволяют грибам закрепиться и выжить на поверхности эпителиоцитов, при этом гликопротеиновые фибриллы клеточной стенки с гидрофобными центрами обеспечивают адгезию как к тканям хозяина, так и к различным полимерным материалам, используемым в трансфузионных системах, катетерах, эндопротезах. Специфическая адгезия определяется адгезинами (рецепторами адгезии) – участками клеточной стенки гриба, участвующими в прикреплении последних к

эпителиоцитам [30], другим микроорганизмам, а также абиотическим поверхностям [136].

Некоторые адгезины по своей структуре напоминают рецепторные белки макроорганизма, что, как полагают, не только увеличивает степень адгезии, но и способствует снижению иммунного ответа [75]. Адгезины *C. albicans* изучены лучше всего, т.к. данный микроорганизм является наиболее частой причиной кандидоза.

Специфическими адгезинами *C. albicans* могут быть поверхностные белки, интегриноподобные протеины, молекулы, участвующие в лектиноподобных контактах (например, белок, связывающий L-фукозу), а также фимбрии [91, 222]. В некоторых случаях в процессах адгезии участвуют углеводные части маннопротеинов клеточной стенки кандид. В настоящее время наиболее изученными адгезинами кандид являются агглютинин-подобные последовательности белковых молекул (ALS - agglutinin-like sequence proteins) [158]. Гены *als* кодируют гликозилфосфатидиднозитол (GPI)-связанные поверхностные гликопротеины [169]. Доказано, что экспрессия генов *als* усиливается при контакте кандид с эпителиоцитами полости рта и при вагинальном кандидозе [123, 171, 226, 232].

Вариант лиганда для адгезинов кандид зависит от типа клетки человека и наличия на ее поверхности фукозила, глюкозамина, фибронектина или мотива «аргинин-глицин-аспаргиновая кислота» [116, 119].

В адгезии и колонизации кожных покровов и слизистых принимают участие и некоторые ферменты кандид, например, аспартил-протеазы, способствующие формированию полостей вокруг адгезирующихся кандид [91, 131]. Отметим, что кандиды нередко используют опосредованные механизмы адгезии. Так, пролин-содержащие белки слюны способствуют адсорбции кандид на различных поверхностях ротовой полости [120, 174, 184].

Способность к адгезии у представителей различных видов *Candida* различается. Наиболее высокая адгезивность отмечается у *C. albicans, C. tropicalis, C. dubliniensis*, низкоадгезивными видами являются *C. glabrata* и *C.*

*krusei*. Обнаружено, что степень адгезивности коррелирует с патогенностью микромицетов для человека и животных и, в определенной степени, связана с проявлением диморфизма [30, 51]. Известно, что мутантные штаммы кандид со сниженной адгезивностью также проявляют низкую вирулентность *in vivo*. Адгезивные свойства микромицетов могут снижаться при пересевах на искусственных средах: у свежевыделенных изолятов грибов адгезивная способность в 1,5-3 раза выше [30]. В то же время адгезивность кандид может возрастать при воздействии на организм человека различных медикаментозных препаратов (антибиотиков, глюкокортикоидных гормонов, цитостатиков), а также воздействия других представителей микробиоценоза [30].

Важным запускающим фактором в реализации адгезивного потенциала кандид в системе "кандиды - эпителиоциты" является повышение адгезивности клеток эпителия. На способность эпителия контактировать с клетками грибов могут оказывать влияние различные факторы, такие как гормоны [37, 45, 55], наличие воспаления и уровень провоспалительных цитокинов [55, 65], а также состав секрета слизистой оболочки.

Результат взаимодействия кандид с эпителиальными клетками может иметь следующие последствия: клиренс слизистых оболочек и кожи (освобождения от кандид), длительная стабильная бессимптомная колонизация микромицетами (персистенция/кандиданосительство) или инфекция (болезнь). Развитие клинически-выраженной инфекции зависит от вирулентных качеств штамма, но, в большей степени – от снижения резистентности макроорганизма. Так, известно, что кандидоз чаще всего возникает при иммуносупрессивных состояниях различной этиологии: ВИЧ-инфекция, беременность, пожилой или неонатальный возраст, прохождение химиотерапии и т.д. [50, 90, 101].

В антикандидозной защите макроорганизма принимают участие факторы общего и местного иммунитета, при этом наиболее важную роль играют, прежде всего, фагоциты и Т–лимфоциты, а также антитела, система комплемента и NK-клетки [50, 91]. В поддержании устойчивости слизистых оболочек к кандидам большое значение придается не только факторам мукозального специфического

иммунитета – sIgA, но и различным фунгицидным компонентам секретов (гистатины, дефензины, кателицидин и др.) [28, 46, 134, 166], а также прочим механизмам, обеспечивающим колонизационную резистентность слизистых оболочек. Так, например, конкурентные взаимоотношения с другими представителями микробиоты могут оказывать влияние на уровень контаминации слизистых оболочек кандидами и возможность развития кандидозной инфекции [41, 90, 91]. Бактериальные представители нормальной микробиоты могут использовать различные механизмы ингибирования адгезии и колонизации кандид на эпителиальных поверхностях. В ряде работ отмечаются конкурентные отношения микроорганизмов с *C. albicans*: метаболиты *S. aureus* подавляют адгезию кандид на буккальном эпителии [59, 60], лактобациллы препятствуют формированию гифальных форм кандид [90, 145, 173, 174]. Таким образом, микробиота может вносить весомый вклад в поддержание баланса между антифунгальными механизмами слизистых оболочек и способностью кандид к заселению данных биотопов.

С другой стороны, имеются данные об использовании кандидами механизма микробной ко-адгезии (закрепление на первом слое адгезированных микроорганизмов) при колонизации слизистых оболочек [146]. Адгезивность кандид к эпителию может усиливаться при воздействии других представителей микробиоценоза [53, 230]. Последнее обстоятельство объясняет то, что кандиды нередко образуют в организме хозяина устойчивые бактериально-грибковые ассоциации [190].

Таким образом, адгезия кандид к мукозальному эпителию достаточно легко регулируется различными факторами, поэтому, блокируя адгезию кандид к эпителиоцитам, через ингибирование или разрушение рецепторного аппарата микромицетов, можно воспрепятствовать развитию инфекции [203]. Такой подход способен стать основой также и для профилактики мукозального кандидоза [162, 203].

## 1.2. Морфо-функциональные особенности и механизмы бактериального антагонизма энтерококков

Энтерококки принадлежат к домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Bacilli,* порядку *Lactobacillales*, семейству *Enterococcaceae* [156]. Ранее энтерококки относили к стрептококкам группы D, согласно классификации Р. Лэнсфилд, но с 1984 г. выделены в самостоятельный род *Enterococcus* на основании геномного анализа, который включает в себя более 40 видов микроорганизмов. Большинство штаммов энтерококков реагирует с антисывороткой стрептококков серогруппы D [8, 16, 73], некоторые реагируют с антисывороткой группы Q. В клиническом материале от пациентов чаще других встречаются *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gilvus*, *E. durans, E. pallens* [8, 16, 35], кроме того, могут выделяться *E. flavescens, E. gallinarum, E. mundtii* и пр. [8].

Энтерококки – грамположительные кокки, в мазках могут иметь вид одиночных и парных клеток, а также небольших цепочек [73]. При выращивании на плотных питательных средах обнаруживается полиморфизм, который «проявляется как в форме клеток (круглые или вытянутые, иногда в виде коккобактерий), так и в размерах (карликовые и гигантские формы, различные размеры клеток в одной паре или цепочке) [8, 16]. Выраженных капсул и спор не образуют, культуры отдельных видов могут быть подвижны за счет редких жгутиков (от 1 до 4). Энтерококки являются факультативными анаэробами. Способны расти при концентрации NaCl до 6,5% и желчи до 40%, при значении pH до 9,6, в диапазоне температур 10-45°С. Оптимальные условия культивирования энтерококков: 35-37°С, pH 7,5 [73].

Энтерококки хорошо растут на триптиказо-соевом агаре или на плотной питательной среде, приготовленной на сердечно-мозговом настое, с добавлением к ним 5% крови барана [8].

Для выделения и выращивания энтерококков также используются селективные среды, такие как азидодекстрозный бульон, основа кровяного агара с

азидом, М-агар для энтерококков, стрептококковый селективный агар, KF-стрептококковый агар и др. [8].

На кровяном агаре колонии энтерококков мелкие, белые или кремовые, гладкие с ровным краем, различаются по типу гемолиза. Некоторые штаммы *E. faecalis* проявляют β-гемолиз на агаре, содержащем кровь кролика, лошади или человека, но оказываются негемолитическими на агаровой среде с кровью барана. Некоторые штаммы *E. durans* проявляют β-гемолитические свойства независимо от типа используемой крови [8].

Все энтерококки относятся к молочнокислым микроорганизмам (lactic acid bacteria), поскольку осуществляют метаболизм бродильного типа и ферментируют углеводы с образованием молочной кислоты, без газообразования, снижая pH среды до 4,2–4,6 [73]. Бактерии рода *Enterococcus* обычно лактозопозитивные, в некоторых случаях восстанавливают нитрат, некоторые виды гидролизуют пирролидонил-β-нафтиламид. Все штаммы продуцируют фермент лейцинаминопептидазу. Отдельные виды энтерококков разжижают желатин [8, 68].

Для энтерококков характерна высокая экологическая пластичность. Их высокая устойчивость к агрессивным факторам среды, дезинфицирующим средствам [16] позволяет им заселять различные места обитания (почва, вода, растения, пищевые продукты), а также длительно сохранять жизнеспособность на предметах домашнего обихода. Некоторые виды энтерококков являются представителями нормальной микробиоты человека и животных, из которых наиболее частыми симбионтами человека являются *E. faecalis* и *E. faecium* [8, 16, 109]

Отличительной особенностью энтерококков, в отличие от наиболее близкого к ним семейства *Streptococcaceae,* является их полирезистентность к антибиотикам, в том числе, природная устойчивость к β-лактамным антибиотикам и аминогликозидам [16]. Известно также, что некоторые штаммы энтерококков обладают резистентностью к ванкомицину [13, 118, 153]. Некоторые авторы предполагают использовать сведения об антибиотико-резистентности для

разграничения потенциально опасных и полезных (пробиотических) штаммов энтерококков [16, 26]. Кроме того, в ряде исследований было показано, что клинические изоляты ванкомицин-резистентных штаммов часто являются продуцентами бактериоцинов [137], т.е. могут быть потенциальными кандидатами на отбор пробиотических штаммов, обладающих устойчивостью к антибиотикам. Полагают, что антибиотикорезистентность пробиотических штаммов энтерококков дает возможность их использования вместе с этиотропными антибиотиками при лечении интестинальных инфекций [16].

Бактерии рода *Enterococcus* обладают рядом факторов патогенности (вирулентности), что дает основание рассматривать их как условно-патогенные микроорганизмы [7]. Некоторые из генов, кодирующих факторы вирулентности, располагаются в определенной области генома: «островках патогенности», способных передаваться от одного штамма другому [5, 68]. Патогенность энтерококков, в основном, обусловлена наличием у них адгезивных молекул, ферментов и экзотоксинов. При этом многие из факторов патогенности энтерококков являются необходимыми компонентами жизнеобеспечения бактерий, а не только используются ими для повреждения тканей хозяина или подавления системы иммунитета [7].

Адгезию энтерококков к тканям, могут обеспечивать липотейхоевая кислота и адгезины гликопротеиновой природы [227]. Не менее важным фактором адгезии являются специфические энтерококковые фимбрии. Белковые компоненты фимбрий субъединицы пилина – экспрессируются с хромосомных оперонов *ebp*, при этом их количество варьирует в зависимости от вида энтерококка [175]. Кроме того, в адгезии принимают участие мембранные гликолипиды, которые специфически распознают и связывают поверхностные гликопептиды колонизируемой поверхности [201]. Из прочих компонентов, способствующих адгезии, можно указать субстанцию агрегации (AS). Это поверхностный белок, который задействован в образовании клеточных агрегатов во время конъюгации бактерий [68, 149]. AS кодируется плазмидными генами, экспрессия которых регулируется наличием в клетке феромонов [122]. Субстанция агрегации

опосредует контакты среди энтерококков, необходимые для осуществления переноса плазмид. Кроме того, доказано, что AS может участвовать в патогенезе энтерококковой инфекции. Установлено, что энтерококки, обладающие AS, подавляют способность фагоцитов продуцировать активные формы кислорода, что делает их более резистентными к фагоцитозу, чем изогенные AS-отрицательные штаммы [68, 212]. В дополнение, отметим, что гены AS чаще встречаются среди фекальных и клинических изолятов энтерококков, чем среди штаммов, изолированных из объектов окружающей среды [126]. В процессе адгезии также участвует энтерококковый поверхностный белок Esp - связанный с клеточной стенкой микроорганизма протеин, имеющий молекулярную массу 202 кДа [68]. Впервые Esp был выявлен у гентамицин-резистентных штаммов *E. faecalis*, изолированных при бактериемии, и чаще обнаруживается у патогенных штаммов, чем у сапрофитных энтерококков [69]. Кроме адгезии, Esp участвует также в образовании биопленок, что определяется, в первую очередь, его N-концевым доменом [144, 218]. Таким образом, многообразие адгезивных молекул усиливает позиции энтерококков в конкурентной борьбе с другими представителями нормальной и факультативной микрофлоры за рецепторы эпителиальных клеток организма хозяина.

Следующими факторами патогенности являются бактериальные ферменты и экзотоксины. К ферментам патогенности энтерококков относится гемолизин (цитолизин/бактериоцин), представляющий собой устойчивый к нагреванию, низкомолекулярный катионный гидрофобный дипептид, состоящий из двух субъединиц — CylL и CylS с молекулярными массами 3,4 и 2,0 кДа [204]. Данный пептид кодируется восьмью генами, которые расположены в плазмидах или бактериальной хромосоме. Экспрессия цитолизина/гемолизина определяется «двухкомпонентной регулирующей системой через кворум-чувствительный механизм» [68, 141]. Гемолизин обладает также токсической активностью и способен разрушать различные эукариотические клетки, такие как эритроциты, полиморфноядерные лейкоциты, эпителиальные клетки кишечника, клетки сетчатки глаза человека и пр. [20, 137, 140, 204]. Гемолизин продуцируют

штаммы энтерококка, которые обладают высокой вирулентностью, что, было показано в экспериментальных исследованиях у животных и в клинических условиях у человека; доказано, что его продукция ассоциируется с повышением тяжести инфекционного процесса [68]. Гемолизин/цитолизин также обладает активностью бактериоцина и может способствовать колонизации энтерококками желудочно-кишечного тракта за счет конкурентного преимущества цитолитических штаммов энтерококков над нецитолитическими или другими грамположительными бактериями [20, 137].

К ферментам патогенности энтерококков можно отнести также желатиназу, которая способна гидролизовать желатин, коллаген, казеин, гемоглобин. По данным некоторых авторов, желатиназа, секретируемая *E. faecalis*, способна также инактивировать систему комплемента путем деградации С3-компонента, что снижает бактерицидный потенциал организма при энтерококковых инфекциях [99, 188].

Для некоторых энтерококков характерна способность к расщеплению гиалуроновой кислоты (компоненту соединительной ткани человека) посредством фермента гиалуронидазы. Гиалуронидаза является ферментом и способствует распространению бактерий и их токсинов в тканях макроорганизма.

Энтерококки также синтезируют сериновую протеазу SprE. Было показано, что данная высокоспецифичная глутамилэндопептидаза серинового типа способна расщеплять некоторые субстраты, в том числе, фибриноген человека и β-цепь инсулина [151].

Способность энтерококков образовывать биопленки также рассматривается, в большинстве случаев, как важный фактор патогенности бактерий при развитии энтерококковых инфекций. При этом, обнаружено, что штаммы *E. faecalis* образуют биопленки чаще, чем изоляты других видов [82, 137].

В 50-х годах XX века были получены данные, которые нашли подтверждение в настоящее время, о перспективности использования штаммов энтерококков в качестве пробиотических [16]. Известно об антагонистической активности энтерококков в отношении *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L.*

*monocytogenes* и *L.seeligeri, K. pneumoniae, S. enteritidis, S. pyogenes* [23], а также дрожжеподобных грибов рода *Candida* и др. микроорганизмов [98]. Имеются положительные результаты использования индигенных штаммов энтерококков в качестве аутопробиотиков для человека [213].

Основным механизмом антагонистической антибактериальной активности энтерококков является их способность продуцировать энтероцины пептиды, комплексы пептидов и белки с молекулярной массой от 2 до 35 кДа (Таблица 1), отличающиеся друг от друга по физико-химическим характеристикам и биологическим эффектам [20].

Установлено, что антимикробное действие энтероцинов обеспечивается присутствием на поверхности микроорганизмов рецепторов, специфически взаимодействующих с бактериоцином [4]. В настоящее время все энтероцины разделены на три класса: I, II, III [20, 128, 185], кроме того, некоторые авторы выделяют подкласс IId в отдельный IV класс энтероцинов [177].

Энтероцины класса I – это лантибиотики – низкомолекулярные катионные гидрофобные, устойчивые к нагреванию пептиды. К лантибиотикам относятся только два известных пептида – цитолизин и энтероцин W. Цитолизин обладает антимикробной активностью широкого спектра действия, образуя поры в мембране грамположительных бактерий, таких как *Listeria spp., Pediococcus spp., Enterococcus spp., Lactococcus spp.*, [20, 137, 202]. В свою очередь, энтероцин W проявляет свои антагонистические свойства в отношении некоторых грамположительных бактерий [137, 202]. Энтероцины класса II включают большинство бактериоцинов. Они представляют собой низкомолекулярные катионные термостабильные пептиды, сохраняющие свою активность при широком диапазоне pH (3,0–9,0), слабо иммуногенные и нетоксигенные для человека и животных. Энтероцины класса II вызывают повреждение цитоплазматической мембраны грамположительных и грамотрицательных бактерий [20, 137].

Энтероцины класса III представляют собой антимикробные термолабильные белки с молекулярной массой более 30 кДа, способные расщеплять

пептидогликан клеточной стенки бактерий. К данной группе относится энтеролизин А [20, 137].

Таблица 1 – Ферменты и бактериоцины энтерококков

| Факторы патогенности | Название | Характеристика |
|---|---|---|
| 1. Ферменты | цитолизин/ гемолизин | термостабильный<br>5,4 кДа |
| | желатиназа | термолабильный<br>31,5 кДа |
| | гиалуронидаза | термолабильные |
| | сериновая протеаза SprE | |
| 2. Бактериоцины: | | |
| Лантибиотики | цитолизин | Термостабильный,<br>5,4 кДа |
| Энтероцины подкласса IIa | энтероцин А | До 10 кДа термостабильные |
| | энтероцин SE-K4 | 5,4 кДа |
| | энтероцин CRL-35 | 4,3 кДа |
| Энтероцины подкласса IIb | энтероцин 1071 | 8,2 к Да |
| | энтероцины L50 | две субъединицы (пептиды):<br>5,19 и 5,178 кДа |
| | энтероцины С | две субъединицы (пептиды):<br>4,2 и 3,9 кДа |
| Энтероцины подкласса IIc | энтероцин В | 5,5 кДа |
| | энтероцин Р | 5,0 кДа |
| Энтероцины подкласса IId | бактериоцин 31 | 5,0 кДа |
| | энтероцин I | 5,0 кДа |
| | бактериоцин AS-48 | 7,2 кДа |
| Энтероцины класса III | энтеролизин А | термолабильный,<br>34,5 кДа |

Таким образом, высокий антагонистический потенциал энтерококков позволяет данным микроорганизмам успешно конкурировать за место в экологической нише с другими представителями облигатной и факультативной микробиоты человека.

### 1.3. Участие эпителиоцитов в обеспечении колонизационной резистентности слизистых оболочек

Эпителиальная поверхность респираторного, желудочно-кишечного и урогенитального тракта отделяет наружную (нестерильную среду) от внутренней, и представляет собой первую линию защиты от инфекций [46, 47, 106, 172].

Вовлечение эпителиоцитов в систему иммунитета слизистых оболочек не ограничивается лишь их барьерной функцией. Известно, что, эпителиоциты активно препятствуют адгезии и размножению микроорганизмов, тем самым, поддерживая колонизационную резистентность слизистых оболочек [62]. Так, например, эпителиоциты способны синтезировать биологически-активные молекулы (цитокины, антимикробные пептиды и др.) [46, 125, 134, 166].

Отметим, что в обеспечении резистентности слизистых оболочек могут быть задействованы стромальные фибробласты и резидентные макрофаги субэпителиальных тканей [46, 63, 110, 178].

Резистентность слизистых оболочек включает в себя механический и химический компоненты. Механический компонент – это физический барьер, который обеспечивается за счет мукоцелиального транспорта, десквамации эпителия и секреции слизи. Химический компонент представлен растворимыми органическими молекулами секретов, большую часть которых секретируют железистые клетки. В то же время, ряд молекул синтезируется эпителиальными клетками, например, такие антимикробные пептиды, как гистатины, дефензины, кателицидин и др. [1, 28, 48, 106, 114]. Также, эпителиальные клетки синтезируют различные медиаторы (интерлейкины, простагландины, лейкотриены и др.) и экспрессируют адгезивные (CD54), костимулирующие (CD40) и антигенпредставляющие (HLA) молекулы, с помощью которых они могут

взаимодействовать с эффекторами воспаления и иммунитета [34, 129, 130, 133, 197, 211]. Отметим, что некоторые авторы также относят к химическому компоненту рецепторы самих эпителиоцитов [46, 47, 110, 178].

Важнейшей характеристикой эпителиоцитов также является их адгезивная активность. Эпителиоциты обладают способностью вступать в контактные взаимодействия с микроорганизмами [55, 60, 65]. Следствием этого является адгезия в системе «эпителиоцит – микроорганизм», которая обеспечивается рецептор-независимыми механизмами: гидрофобными, электростатическими и другими слабыми взаимодействиями, а также специфическими рецепторами, экспрессия которых может зависеть от физиологического состояния мукозальных клеток [55, 59]. В рецепторные взаимодействия эпителиальных клеток с микроорганизмами могут принимать участие разнообразные группы молекул, такие как гликосфинголипидные рецепторы, фукозные (N-ацетил-D-глюкозаминовые остатки), RGD-содержащие полипептиды, имеющие последовательность Arg-Gly-Asp [121]. На адгезию микроорганизмов к эпителиоцитам могут оказывать влияние и другие факторы: обилие секрета слизистых оболочек, гормональный статус макроорганизма, а также наличие воспалительного процесса (местного или системного) [28, 37, 55, 61, 65, 171]. Отметим, что адгезию нерезидентных микроорганизмов также могут ограничивать представители облигатной микрофлоры, вступающие с ними в антагонистические взаимоотношения на уровне эпителиальных клеток, что вносит определенный вклад в колонизационную резистентность слизистых [39, 55, 60].

Кроме адгезинов, эпителиоциты обладают сигнальными паттерн-распознающими рецепторами/ трансмембранными молекулами (PRR), например, такими как Toll–подобные рецепторы (TLRs), которые координируют активность эпителиальных клеток и различных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета [228]. Благодаря наличию TLR, мукозальные эпителиоциты способны к Toll-опосредованному синтезу цитокинов - медиаторов иммунных и

воспалительных процессов, а также формированию определенного уровня толерантности к индигенной микробиоте [39, 47, 62, 196].

Toll-подобные рецепторы способны распознавать консервативные химические структуры микроорганизмов, а также лиганды эндогенного происхождения, образующиеся при повреждении тканей собственного организма [89, 117]. Связывание TLR с лигандом запускает каскад внутриклеточных реакций, что ведет к выработке цитокинов и антимикробных пептидов, которые вызывают активацию фагоцитов и других иммунокомпетентных клеток, что способствует элиминации инфекционного агента [147, 219]. Эпителиоциты слизистых оболочек человека способны экспрессировать Toll-подобные рецепторы от TLR-1 до TLR-9 [170]. Все TLRs представляют собой интегральные трансмембранные белки и имеют сходное строение. Toll -подобные рецепторы, распознающие поверхностные структуры микроорганизмов: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 – экспрессированы на цитоплазматической мембране клеток. После попадания патогена внутрь клетки, некоторые из них продолжают экспрессироваться на мембранах эндосом, где получают дополнительную возможность взаимодействовать с PAMP (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) и после разрушения патогена [32, 89]. При этом, Toll -подобные рецепторы, локализованные на мембранах внутриклеточных органелл (TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9), распознают молекулы нуклеиновых кислот микроорганизмов, а также могут быть активированы при повреждении молекулярных структур собственного организма [32, 89].

Каждый из Toll-подобных рецепторов связывается со своим специфическим лигандом (Таблица 2), однако все они имеют сходство в механизме действия.

Поверхностная (внеклеточная) часть молекулы - N-концевая область, отвечающая за связывание лиганда, представлена аминокислотной последовательности из 19-25 повторяющихся участков. Далее следует мембранный участок, ответственный за прикрепление TLR к мембране клетки. Внутренняя часть рецептора представлена TIR (Toll/IL - receptor) доменом,

Таблица 2 – Toll -подобные рецепторы эпителиоцитов человека и их лиганды (по О.П. Лебедевой и др., 2010) [47]

| TLR | Лиганд |
|---|---|
| TLR-1 | триацетилированные липопептиды, модулин (бактерии) Pam3Cys-Ser-(Lys)4 (синтетический липопротеин) |
| TLR-2 | пептидогликан, липопротеин, липопептиды, атипичные липополисахариды, липотейхоевая кислота, фенол-растворимый модулин, липоарабиноманнан (бактерии), зимозан (грибы), гликолипиды (простейшие) белковая оболочка вирусов Pam3Cys-Ser-(Lys)4 (синтетический липопротеин) |
| TLR-3 | двухцепочечная РНК (вирусы), мРНК (хозяин), poly I:C (синтетическая двухцепочечная РНК) |
| TLR-4 | липополисахариды, липотейхоевая кислота (бактерии)<br>маннан, глюкуроноксиломаннан (грибы)<br>белок теплового шока 60, гликоинозитолфосфолипиды (простейшие),белковая оболочка вирусов, F-протеин (вирусы),белки теплового шока 60 и 70, полисахаридные фрагменты гепарина сульфата, гиалуроновая кислота, фибриноген, фибронектин (хозяин) |
| TLR-5 | флагеллин (бактерии) |
| TLR-6 | диацетилированные липопептиды, модулин, растворимый туберкулезный фактор (бактерии) |
| TLR-7 | одноцепчечная РНК (вирусы), одноцепочечная РНК (хозяин)<br>имидазохинолин (синтетический антивирусный препарат)<br>локсорибин (аналог гуанозина) |
| TLR-8 | одноцепочечная РНК (вирус)<br>одноцепочечная РНК (хозяин) |
| TLR-9 | неметилированная ДНК (бактерии, простейшие, вирусы)<br>гемозоин (простейшие), комплекс хроматина и иммуноглобулина G (хозяин) |

имеющим сходное строения с цитокиновыми рецепторами семейства IL-1 [32, 117, 147] (Рисунок 3).

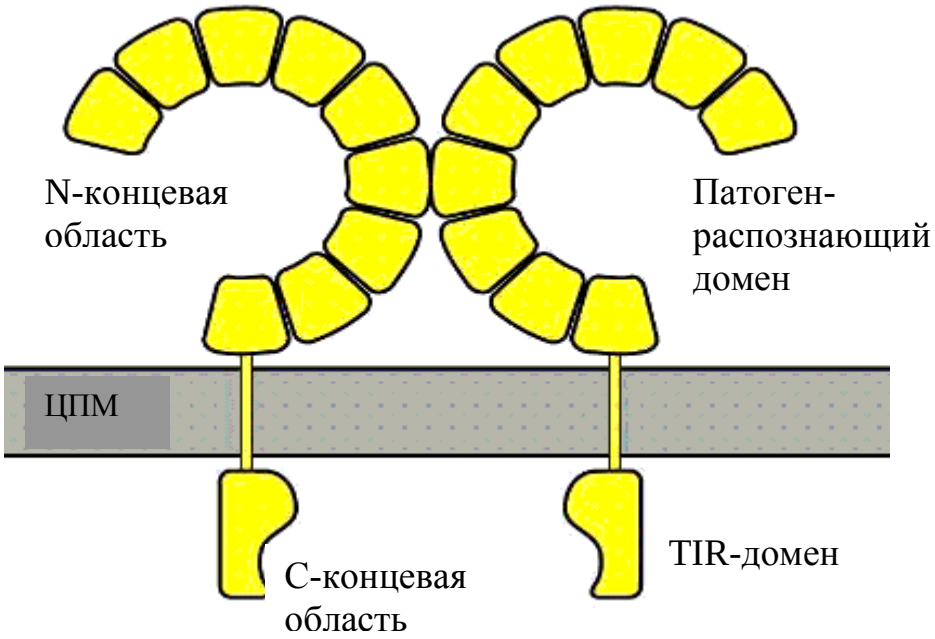



Рисунок 3 – Строение Toll-подобных рецепторов (по Parham P., 2009) [187] (в собственной модификации)

«В состоянии покоя неактивированные TLRs находятся на мембране клеток в мономерном состоянии» [32, 163]. После распознавания молекулярных «образов» патогенов TLRs, связываясь с лигандом, подвергаются димеризации и активируют каскад реакций передачи сигнала в ядро клетки [32, 117, 147].

TLR-зависимая внутриклеточная передача сигнала возможна двумя путями (Рисунок 4). Первый путь связан с включением адаптерного белка первичного ответа миелоидной дифференцировки 88 (MyD88), который активирует нуклеарный транскрипционный фактор NF-kB, запускающий в ядре транскрипцию генов антимикробных пептидов и провоспалительных цитокинов [49, 94]. Альтернативный путь стимулирует выработку интерферонов I типа и активацию интерферон-индуцируемых генов [32, 49]. Кроме того, TLR3 и TLR4 способны запускать иммунный ответ по MyD88-независимому пути. Он осуществляется посредством адаптерного белка TRIF, индуцирующего интерферон-1β, что приводит к фосфорилированию интерферон-регулирующего фактора-3 (IRF-3).

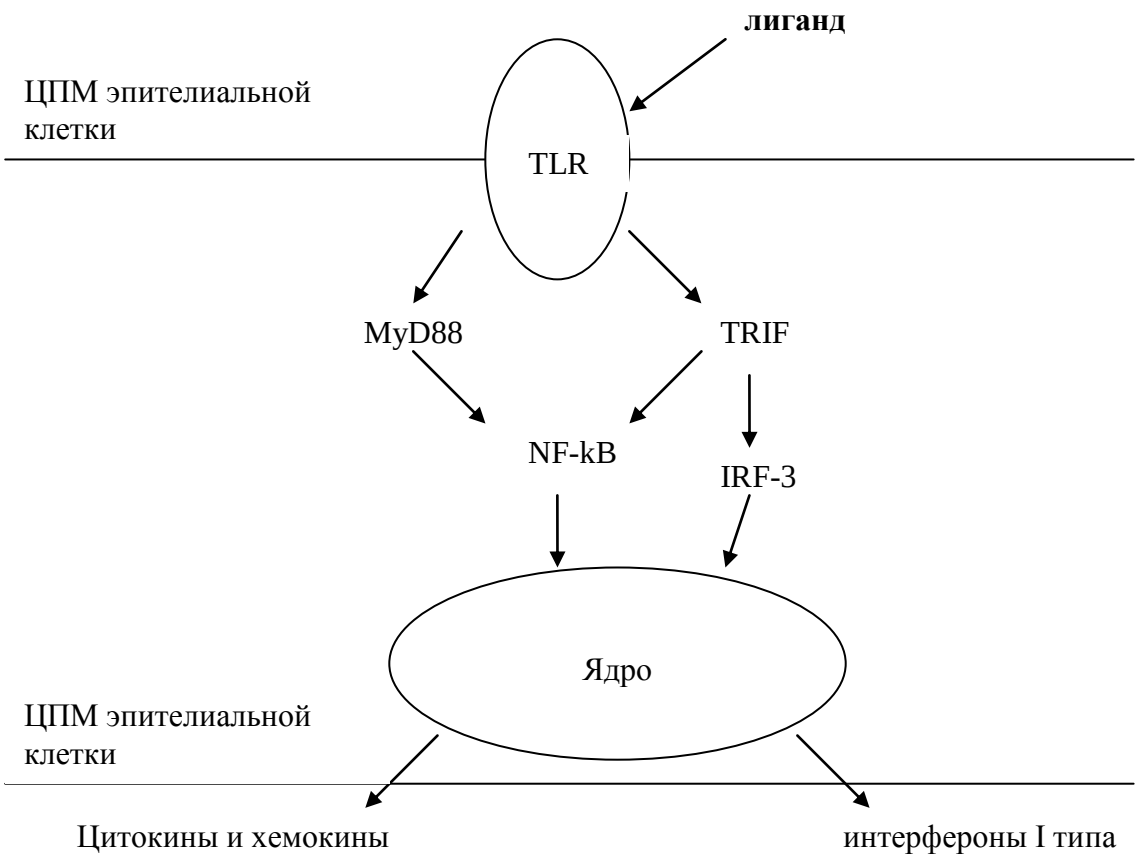



Рисунок 4 – Механизм активации TLRs [49]

Также, известно, что углеводы, входящие в состав клеточной стенки микромицетов рода *Candida* (β-глюканы, маннаны и хитин), способны запускать активацию эпителиальных клеток через TLRs [32, 167, 172] (Таблица 3).

Например, фосфолипоманнаны кандид распознаются TLR2, а О-связанный маннан – TLR4 [150, 167, 179]. A. Pivarci и соавт. в исследованиях на культуре кератиноцитов человека показали, что киллинг *C. albicans* кератиноцитами зависит от активации последними TLR4 и TLR2 [32, 191].

Эти данные подтверждают, что TLR2 и TLR4 играют важную роль в развитии механизмов антифунгальной защиты, а не только распознают компоненты *C. albicans* [32].

Активацию TLR вызывает не только контакт с патогенной микрофлорой. Облигатные и факультативные представители нормальной микробиоты также способны регулировать активность эпителиоцитов и секрецию ими цитокинов

Таблица 3 – Рецепторы мукозальных эпителиоцитов человека, распознающие кандида-ассоциированные молекулярные структуры (по D.L. Moyes, J. R. Naglik, 2011) [167]

| Семейство молекул | Рецептор эпителиоцита | Молекулярные структуры кандид |
|---|---|---|
| TLRs | TLR2 | фосфолипоманнан |
| | TLR3 | двунитевая РНК |
| | TLR4 | маннан<br>О-связанный маннан |
| | TLR9 | CpG ДНК |
| CLRs | дектин-1 | $\beta$-1,3-глюкан |
| | дектин-2 | высокие маннозные структуры |
| | | $\alpha$-маннаны |
| | маннозный рецептор | маннан |
| | MINCLE | Неизвестен |
| | галектин-3 $\beta$- | 1,2-маннозиды |
| | DC-SIGN | высокие маннозные структуры |
| NLRs | NLRP3 | Неизвестен |
| Другие | Cdw17 | Неизвестен |

Примечание: TLRs – Toll-подобные рецепторы, CLRs - лектиновый рецептор С- типа; NLRs- Nacht-подобные рецепторы.

через Toll-подобные рецепторы. Так, имеются данные о взаимодействии лактобацилл с TLR2, TLR4 и TLR9 [6, 193].

Патоген-распознающие рецепторы эпителиоцитов (PRR) способны улавливать особенности поверхностных структур разных морфологических форм одного и того же микроорганизма. Так, например, они по-разному реагируют на дрожжевую и гифальную (более патогенную) форму кандид. В результате могут формироваться два различных каскада внутриклеточных биохимических реакций. Это выражается в разном уровне активации эпителиоцитами иммунитета (нейтрофилов и других рекрутированных факторов) в зависимости от того, что «ощущает» клетка: адгезию кандид (дрожжевая форма) или адгезию и инвазию (гифальная форма) [167].

Эпителиоциты слизистых оболочек также способны к «автономным иммунным реакциям» без индукции воспаления и привлечения

иммунокомпетентных клеток. Так, в некоторых случаях, после активации TLR, эпителиоциты продуцируют ILα с последующей аутокринной стимуляцией, в результате чего активно синтезируются антимикробные пептиды [196]

Таким образом, через систему патоген-распознающих рецепторов (PRR), в частности, TLRs, мукозальные эпителиоциты участвуют в обеспечении колонизационной резистентности слизистых оболочек и способны координировать иммунные и воспалительные реакции, направленные на поддержание гомеостаза [95, 228].

Экспрессия Toll-подобных рецепторов на эпителиоцитах поддается регуляции. Число TLR увеличивается в процессе взаимодействия с микроорганизмами или их производными, для чего необходим постоянный контакт TLR с микробными продуктами [89]. Известно, что при развитии острой фазы инфекционного заболевания экспрессия Toll-подобных рецепторов повышается, а при выздоровлении - снижается. Однако, стоит отметить, что низкие уровни TLR2 и TLR4 могут также отражать переход инфекционного процесса в хроническую форму [3, 89]. Таким образом, наличие определенных закономерностей экспрессии TLRs делает возможным использование этих данных как диагностического показателя при различных инфекционных процессах, а также для оценки динамики течения заболевания.

Таким образом, кандиды – оппортунистические микромицеты, реализующие свой патогенный потенциал в системе с эпителиоцитами слизистых оболочек. Эпителиальные клетки принимают активное участие в обеспечении резистентности слизистых оболочек, в том числе, за счет активного вовлечения в процесс своего рецепторного аппарата. Анализ научной литературы показывает высокую антимикробную активность энтерококков, что стимулирует к изучению антифунгального действия их секреторных продуктов, как непосредственно на кандиды, так и на взаимодействие микромицетов с эпителиоцитами.

# РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

## ГЛАВА 2. Влияние продуктов метаболизма энтерококков на адгезивность кандид в экспериментальной тест-системе с буккальными эпителиоцитами

«Адгезия является первым и обязательным этапом колонизации слизистых оболочек кандидами» [30, 91, 158]. Известно, что на взаимодействие кандид с эпителиоцитами слизистых оболочек влияют разные факторы, в частности, некоторые представители факультативной нормальной микробиоты и другие субстраты [53, 55, 59].

В нашей работе мы изучали влияние продуктов метаболизма энтерококков на способность кандид закрепляться на эпителиальных клетках с помощью метода искусственной колонизации *in vitro*. На начальном этапе в экспериментах использовали *C. albicans* штамм *601*, отобранный ранее на основании хорошей адгезивной активности [59]. Кандиды инкубировали с супернатантом (фильтратом) суточной бульонной культуры одного из исследуемых штаммов *E. faecalis* или *E. faecium* (Таблица 4) в течение 30 мин при 37°С. Контролем служили кандиды, обработанные стерильным бульоном TSB в том же режиме. Затем *C. albicans* инкубировали с буккальными эпителиоцитами в ЗФР (30 мин, 37°С), отмывали эпителий от неприкрепившихся клеток грибов и подсчитывали количество адгезированных кандид.

В большинстве случаев была выявлена тенденция к снижению адгезивной способности кандид. Выраженность антиадгезивного эффекта супернатантов энтерококков в отношении кандид носила штамм-специфический характер. При этом, достоверное снижение адгезии *C. albicans* 601 на эпителиоцитах наблюдалось после обработки микромицетов метаболитами следующих штаммов энтерококков: *E. faecium* L3, *E. faecalis* 4314, *E. faecalis* 4306 и *E. faecalis* 179-2 (Таблица 4). Из них наибольшим антиадгезивным эффектом обладали метаболиты штамма *E. faecium* L3, снижающие адгезию кандид на буккальных эпителиоцитах в 1,72±0,29 раз ($p < 0,05$) (Таблица 4).

Таблица 4 – Влияние продуктов метаболизма энтерококков на адгезию *C. albicans* штамм 601 к буккальным эпителиоцитам, M± m

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

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

Используя аналогичную схему эксперимента, мы провели ряд дополнительных исследований со штаммами других видов кандид: *C. glabrata* 44-1, *C. krusei* 583, *C. tropicalis* 127 и *C. kefir* 17, которые подвергали обработке метаболитами *E. faecium* L3 (штамм, показавший выраженную антифунгальную активность). В экспериментах было выявлено, что антиадгезивный эффект продуктов метаболизма энтерококков был характерен и в отношении других видов микромицетов (Таблица 5). Так, достоверное снижение уровня искусственной колонизации наблюдали в опытах с C. *glabrata*, *C. krusei* и *C.*

*tropicalis*, адгезивность которых, под действием метаболитов энтерококков, снижалась в 1,77, 1,63 и 1,25 раз, соответственно (p<0,05). В экспериментах с *C. kefir* достоверных отличий индекса адгезии в опыте и контроле не наблюдалось (p>0,05), что было связано, по-видимому, с изначально низкой адгезивной способностью штамма.

Таблица 5 – Влияние продуктов метаболизма *Enterococcus faecium* L3 на адгезию *Candida spp*. к буккальным эпителиоцитам, M± m

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

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

Поскольку энтерококки относятся к молочнокислым бактериям [8, 20, 137], мы предположили, что негативное влияние метаболитов энтерококков на адгезивные свойства микромицетов, прежде всего, может быть обусловлено действием молочной кислоты. Для проверки этого предположения был определен pH супернатанта бульонной культуры *E. faecium* L3 (pH=6,6), выращенной на TSB . Параллельно, в другую пробирку со стерильным бульоном TSB добавляли молочную кислоту, доводя pH до того же уровня, что и в образце, содержащем метаболиты энтерококков. Общим (негативным) контролем служил стерильный бульон TSB с pH=7,0 (Рисунок 5).

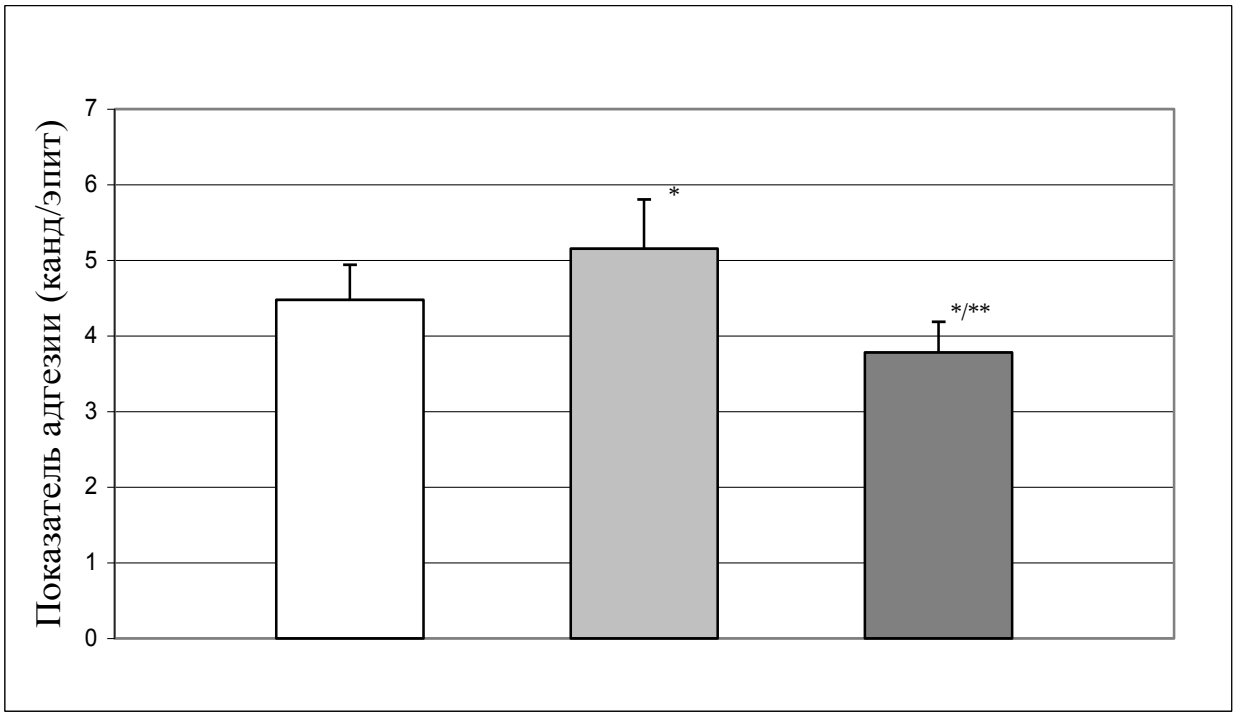



Рисунок 5 – Влияние pH среды на адгезивность *C. albicans* 601

Примечание:

□ - контроль – стерильный TSB (pH 7,0)
□ - TSB с добавлением молочной кислоты (pH 6,6)
■ - супернатант бульонной культуры (метаболиты) энтерококков (pH 6,6)
* – значимые различия показателей относительно контроля ($p<0,05$)
** - значимые различия показателей относительно TSB с добавлением молочной кислоты ($p<0,05$)

На рисунке 5 видно, что закисление среды до уровня pH, равного 6,6, обусловленное добавлением молочной кислоты, приводило к достоверному повышению адгезии кандид на буккальных эпителиоцитах в 1,15 раз ($p<0,05$). В то же время, супернатант бульонной культуры с таким же значением pH (6,6), содержащий метаболиты энтерококков, напротив, снижал адгезивность кандид в 1,26 раз ($p<0,05$). Таким образом, очевидно, что среды, содержащие разные компоненты, но имеющие одинаковый pH, могут разнонаправлено влиять на адгезивность кандид. Это означает, что pH среды не определяет направление изменений адгезивности кандид и на активность их рецепторного аппарата влияла не молочная кислота, а иные метаболиты.

Возможно, снижение искусственной колонизации в системе было связано с гибелью кандид под действием продуктов метаболизма энтерококка. Однако, ранее в нашей лаборатории проводились подобные эксперименты и было показано отсутствие достоверных различий в адгезивной активности живой и инактивированной культуры *C. albicans* ($p>0,05$) [59].

Затем мы предположили, что снижение адгезивности могло быть следствием либо экранирования адгезивных молекул кандид, либо структурных изменений их адгезинов за счет метаболитов энтерококков. В последующем эксперименте мы проверили эту гипотезу.

Клетки кандид после инкубации с метаболитами *E.faecium* L3 отмывали додецилсульфатом натрия (ДДС) с целью удаления нековалентно связанных частиц. Контролем служили интактные клетки, обработанные ДДС. Было установлено, что отмывка с помощью ДДС не приводила к восстановлению исходной адгезивной активности *C. albicans,* ранее обработанных метаболитами энтерококка (Рисунок 6). Это указывало на то, что рецепторные структуры кандид не просто экранировались, а необратимо модифицировались под действием энтерококковых продуктов секреции, которые обладали, по-видимому, ферментативной активностью. Таким образом, снижение адгезивных способностей *C. albicans* после их экспозиции с продуктами метаболизма энтерококков являлось результатом конформационных изменений адгезивных молекул кандид.

Ферментативной активностью могут обладать не все метаболиты энтерококков, а только фракции с определенной молекулярной массой. Для выявления наиболее ферментативно-активной фракции полученные продукты метаболизма энтерококков разделяли с помощью центрифужных пробирок со встроенными микрофильтрами (Amicon® Ultra-15).

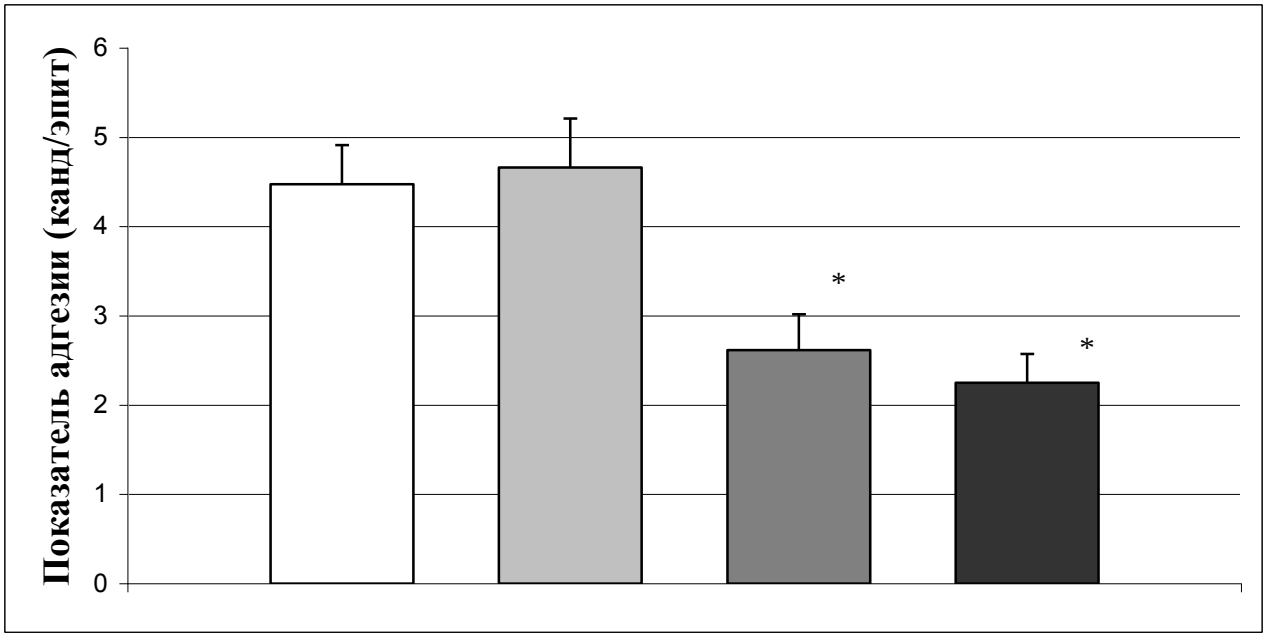



Рисунок 6 – Влияние метаболитов *E.faecium* L3 на адгезивную активность *C. albicans* штамм 601 до и после обработки додецилсульфатом натрия

Примечание:

- контроль 1 – стерильный TSB.
- контроль 2 – стерильный TSB+ДДС.
- кандиды, обработанные метаболитами *E.faecium*.
- кандиды, обработанные метаболитами *E.faecium*+ДДС

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

Кандиды обрабатывали отдельными фракциями, содержащими продукты метаболизма энтерококков с молекулярной массой менее 30, 10 или 3 кДа. Было выявлено, что метаболиты из разных фракций могли разнонаправленно изменять адгезивность кандид (Рисунок 7). Так, метаболиты, содержащие белки и пептиды с молекулярной массой менее 30 кДа и менее 10 кДа достоверно снижали способность *C. albicans* адгезироваться на буккальных эпителиоцитах в 1,41 и в 1,36 раза, соответственно ($p<0,05$). При этом существенных различий по силе воздействия на адгезивный аппарат кандид между этими фракциями не наблюдалось ($p>0,05$) (Рисунок 7). В то же время метаболиты с молекулярной массой менее 3 кДа, наоборот, повышали адгезивность кандид в 1,25 раза. Исходя из полученных данных, стало ясно, что максимальная концентрация продуктов метаболизма энтерококков, обладающих антиадгезивным эффектом

(ферментативной активностью в отношении рецепторов *C. albicans*), имеет молекулярную массу в диапазоне от 3 до 10 кДа.

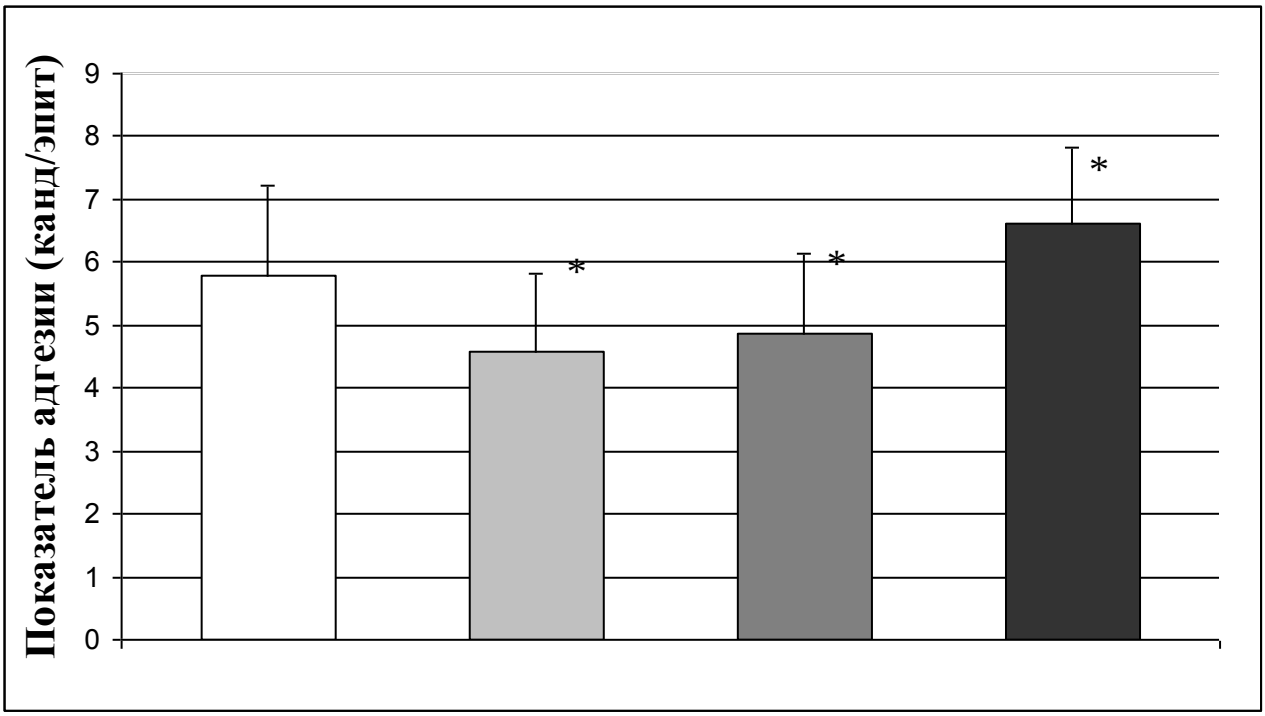



Рисунок 7 – Влияние различных фракций продуктов метаболизма энтерококков на адгезивность *C. albicans* 601в тест-системе с эпителиоцитами

Примечание:

□ - контроль (стерильный TSB)

□ - метаболиты с молекулярной массой менее 30кДа

□ - метаболиты с молекулярной массой менее 10кДа

■ - метаболиты с молекулярной массой менее 3кДа

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

На следующем этапе изучали влияние продуктов метаболизма энтерококков на десорбцию кандид, уже закрепившихся на эпителиоцитах. Для этого эпителий инкубировали с кандидами (30 мин, 37°С), затем обрабатывали тест-систему энтерококковыми метаболитами и подсчитывали индекс искусственной колонизации. Было выявлено, что обработка метаболитами энтерококка не ускоряла десорбцию кандид с буккального эпителия ($p > 0,05$) (Рисунок 8). Следовательно, продукты метаболизма энтерококков оказывают существенное воздействие на адгезины кандид только до их контакта с клетками эпителия.

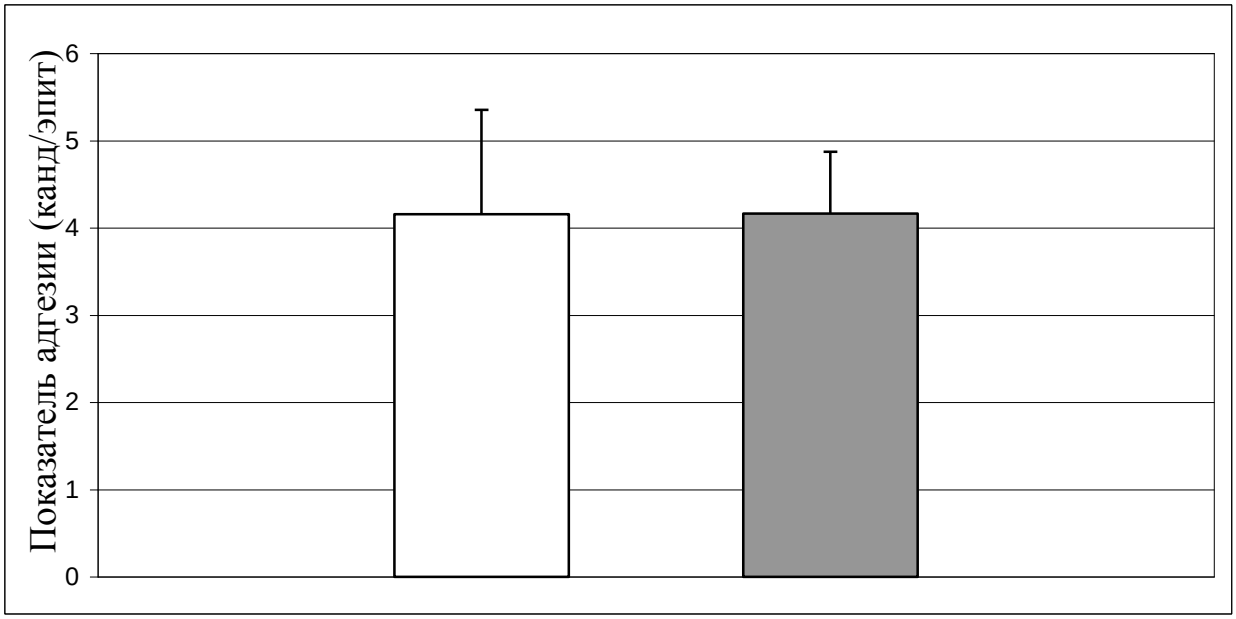



Рисунок 8 – Влияние продуктов метаболизма *E. faecium* L3 на десорбцию *C. albicans* с буккальных эпителиоцитов

Примечание:

□ - контроль

■ - обработка тест-системы «кандиды-эпителиоциты» метаболитами *E. faecium* L3

Известно, что кандидоз является оппортунистической инфекцией, и ее развитию могут способствовать воспалительные реакции [43]. При патологическом процессе повышается уровень различных цитокинов, в частности IL-6 и IL-8, которые относятся к медиаторам, запускающим и поддерживающим воспалительную реакцию [70, 103]. В отдельной серии экспериментов было выявлено, что обработка эпителиоцитов IL-6 или IL-8 существенно повышала адгезивность самих буккальных клеток в отношении *C.albicans* [55], что косвенно указывало на то, что воспалительный процесс на уровне слизистых оболочек может способствовать контаминации эпителия кандидами. С другой стороны, ранее нами было установлено, что метаболиты энтерококков снижают адгезию кандид на эпителиоцитах. Для оценки совместного действия цитокинов и метаболитов энтерококков на тест-систему «кандиды - эпителиоциты» был проведен дополнительный эксперимент. 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°С). В качестве позитивного контроля использовали систему «буккальные эпителиоциты, обработанные цитокином (IL-6 или IL-8) - интактные кандиды». Негативным контролем служила тест-система «интактные эпителиоциты - интактные кандиды». Было выявлено, что уровень адгезированных кандид на эпителиоцитах, обработанных либо IL-6, либо IL-8, существенно повышался в 1,51±0,26 и 1,42±0,25 раза, соответственно (p<0,05) (Таблица 6).

Таблица 6 – Влияние IL-6, IL-8 и метаболитов *E.faecium* L3 на адгезию в тест-системах «*C.albicans* -эпителиоциты», M± m

| **Тест-системы:** | **Показатель адгезии (канд/эпит)** | |
|---|---|---|
| **Контроль:** система «интактные эпителиоциты + интактные кандиды» | 9,91±1,91 | 7,83±1,38 |
| **Экспериментальные тест-системы:** | Обработка эпителиоцитов IL-6 | Обработка эпителиоцитов IL-8 |
| Эпителиоциты, обработанные цитокином + интактные кандиды | 11,65±1,33* | 13,79± 0,35* |
| Эпителиоциты, обработанные цитокином + кандиды, обработанные метаболитами *E.faecium* L3 | 9,18±0,48 ** | 12,05±0,16 */** |

Примечание:
* – статистически значимые различия показателей относительно контроля (p< 0,05)
** - значимые различия показателей относительно **тест-системы**: «эпителиоциты, обработанные цитокином + интактные кандиды» (p<0,05)

В то же время, адгезия кандид в тест-системе «кандиды, обработанные метаболитами энтерококков - эпителиоциты, стимулированные цитокинами (IL-6 или IL-8)», была значительно ниже, чем адгезия в тест-системе «интактные *C.albicans* - эпителиоциты, стимулированные цитокинами» и приближалась к уровню адгезии в негативном контроле (Рисунок 9, 10).

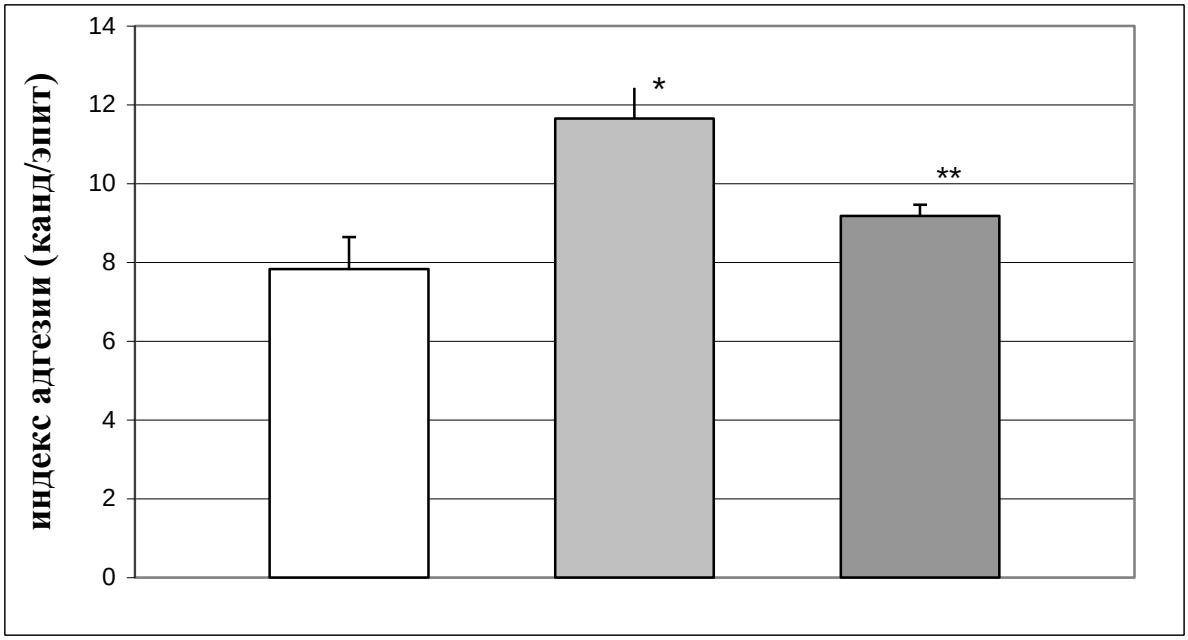



Рисунок 9 – Влияние IL-6 и метаболитов *E.faecium* L3 на адгезию в экспериментальной тест-системе «*C.albicans* -эпителиоциты»

Примечание:

□ - контроль: интактные эпителиоциты + интактные кандиды

□ - эпителиоциты, обработанные IL-6 + интактные кандиды

□ - эпителиоциты, обработанные IL-6 + кандиды, обработанные метаболитами *E.faecium* L3.

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

** - значимые различия показателей относительно эпителиоцитов, обработанных цитокином с интактными кандидами ($p<0,05$)

Из этого следовало, что эффект усиления восприимчивости эпителиоцитов к кандидам на фоне действия провоспалительных цитокинов, мог быть нивелирован предварительной обработкой кандид продуктами метаболизма энтерококков.

Таким образом, мы установили, что метаболиты энтерококков снижают способность *Candida spp.* адгезироваться на буккальных эпителиоцитах *in vitro*. Выраженность этого феномена зависела от свойств штамма *Enterococcus spp.* При этом продукты метаболизма энтерококков действовали на адгезивный аппарат не связанных с субстратом микромицетов, и не влияли на скорость десорбции кандид, ранее закрепившихся на эпителиоцитах.

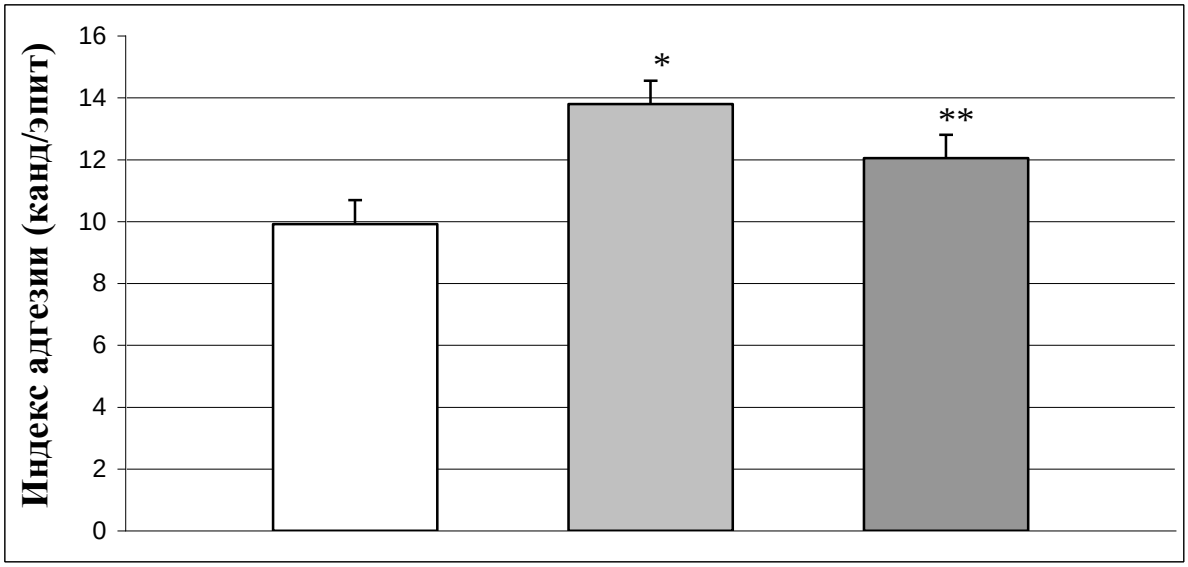



Рисунок 10 - Влияние IL-8 и метаболитов *E.faecium* L3 L3 на адгезию в экспериментальной тест-системе «*C.albicans* -эпителиоциты»

Примечание:

□ - контроль: интактные эпителиоциты + интактные кандиды

□ - эпителиоциты, обработанные IL-8 + интактные кандиды

■ - эпителиоциты, обработанные IL-8 + кандиды, обработанные метаболитами *E.faecium* L3.

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

** - значимые различия показателей относительно эпителиоцитов, обработанных цитокином с интактными кандидами ($p<0,05$)

Снижение способности кандид прикрепляться к эпителиоцитам было, по-видимому, связано с конформационными изменениями в рецепторном аппарате микромицетов под действием метаболитов энтерококков. Было установлено, что изменения адгезивных структур кандид вызывают, преимущественно, секреторные продукты *Enterococcus spp.* с молекулярной массой от 3 до10 кДа.

Феномен подавления адгезивности кандид под действием энтерококковых метаболитов наблюдался также и в экспериментальных моделях с цитокин-активированным эпителием. Так, воздействие IL-6 и IL-8 на буккальные клетки in vitro повышало уровень искусственной колонизации в системе «эпителиоциты - *C.albicans*», однако, предварительная обработка кандид метаболитами энтерококков нивелировала данный эффект.

## ГЛАВА 3. Влияние метаболитов энтерококков на жизнеспособность и рецептор - зависимую активность буккальных эпителиоцитов

Первым этапом инфекционного процесса является адгезия потенциального патогена. Эпителиоциты играют активную роль в процессах адгезии и колонизации микроорганизмами слизистых оболочках [12, 52, 64, 121], Мукозальная поверхность рассматривается не только как механический контакт микроорганизма и тканевого субстрата, но и как энергетически-зависимый процесс, в котором обе клетки в системе «хозяин - паразит» активно взаимодействуют между собой [27, 39, 62].

В работе мы исследовали влияние продуктов метаболизма энтерококков на способность клеток буккального эпителия к адгезии с кандидами, которую оценивали по способности эпителиоцитов к адгезивным взаимодействиям с клетками *Candida albicans* штамм 601 *in vitro* (искусственная колонизация). Для этого, эпителиоциты обрабатывали метаболитами бульонной культуры энтерококков (30 мин, $37^0$С), после чего буккальные клетки инкубировали с кандидами. В контроле использовали эпителиоциты, обработанные стерильным бульоном TSB.

Было установлено, что продукты метаболизма энтерококков различных штаммов принципиально не влияли на адгезивность буккальных эпителиоцитов, незначительно меняя адгезивный потенциал клеток ($p>0,05$) (Таблица 7).

Отсутствие существенного воздействия секреторных компонентов энтерококков на адгезины мукозальных клеток можно объяснить, либо с отсутствием специфических мишеней на эпителиоцитах для ферментов *Enterococcus spp.*, либо способностью буккальных клеток к быстрой регенерации своего адгезивного аппарата.

Следующим шагом была оценка влияния метаболитов бульонных культур энтерококков на жизнеспособность клеток буккального эпителия с использованием метода проточной цитофлуорометрии. Для этого эпителиоциты (в разных сериях эксперимента) инкубировали с метаболитами различных штаммов *E. faecium* или *E. faecalis* в течение 30 мин при 37°С, после чего пробы

помещали в проточный цитофлуориметр. Определяли процент жизнеспособных клеток в популяции до и после обработки.

Таблица 7 – Влияние продуктов метаболизма энтерококков на адгезивность буккального эпителия (M±m)

| Штаммы энтерококков – продуценты метаболитов | Показатель адгезии (канд/эпит) | | Кратность снижения индекса адгезии относительно контроля (количество раз) |
|---|---|---|---|
| | Контроль: эпителиоциты, обработанные TSB | Эпителиоциты после обработки метаболитами энтерококков | |
| *E. faecium* L3 | 10,57±1,40 | 9,89±0,71 | 1,02±0,10 |
| *E. faecium* 2482 | 11,59±0,47 | 9,71±1,09 | 1,19±0,14 |
| *E. faecium* 651 | 9,96±2,97 | 9,53±0,97 | 1,13±0,23 |
| *E. faecalis* 179-2 | 7,89±0, 83 | 6,3±0,72 | 1,20± 0,19 |
| *E. faecalis* 4314 | 5,97±0,92 | 6,23±0,97 | 0,96±0,27 |

Было установлено, что продукты метаболизма энтерококков существенно не влияли на жизнеспособность эпителиальных клеток ($p>0,05$) (Таблица 8). Так, после обработки метаболитами энтерококков кратность изменения количества жизнеспособных клеток в эксперименте колебалась в диапазоне 0,95- 1,16 раз относительно контроля ($p>0,05$).

На следующем этапе работы исследовали влияние метаболитов разных штаммов энтерококков на активность Toll-зависимого рецепторного аппарата буккальных эпителиоцитов методом проточной цитофлуориметрии. Буккальные эпителиоциты (из разных серий эксперимента) инкубировали с метаболитами различных штаммов *E. faecium* или *E. faecalis* в течение 30 мин при 37°С. Контролем служили эпителиоциты, обработанные в том же режиме стерильным TSB. Затем все пробы помещали в проточный цитофлуориметр, где определяли процент TLR-2 и TLR-4 позитивных клеток.

Таблица 8 – Влияние продуктов метаболизма энтерококков на жизнеспособность эпителиоцитов, (M±m)

| Инкубационная среда для эпителиоцитов | Количество жизнеспособных эпителиоцитов в популяции после инкубации (%) | Кратность изменения процента жизнеспособных эпителиоцитов относительно контроля (количество раз) |
|---|---|---|
| Контроль (стерильный ТСБ) | 86,3±2,9 | 1,0 |
| Метаболиты энтерококков: | | |
| *E. faecium* L3 | 99,4±2,78 | 1,15±0,05 ↑ |
| *E. faecalis* 651 | 99,5±1,45 | 1,15±0,05 ↑ |
| *E. faecalis* 179/2 | 99,6±3,61 | 1,16±0,02 ↑ |
| *E. faecium* 174-3 | 99,7±1,05 | 1,16±0,02 ↑ |
| *E. faecalis* 208 | 99,8±3,22 | 1,16±0,01 ↑ |
| *E. faecalis* 682 | 99,6±3,33 | 1,16±0,03 ↑ |
| *E. faecalis* 2482 | 99,9±1,13 | 1,16±0,13 ↑ |
| *E. faecalis* 4276 | 86,4±1,54 | 1,0±0,34 ↑ |
| *E. faecalis* 4304 | 81,6±2,03 | 0,95±0,04 ↓ |
| *E. faecalis* 4306 | 84,9±4,65 | 0,99±0,16 ↓ |
| *E. faecalis* 4314 | 82,1±4,37 | 0,95±0,07 ↓ |

Было выявлено, что в норме процент буккальных эпителиоцитов, экспрессирующих TLR-2 всегда был меньше, чем TLR-4-позитивных клеток и составлял 29,8% и 55,0%, соответственно (Таблица 7, 8).

Toll-зависимый рецепторный аппарат буккальных эпителиоцитов активно реагировал на метаболиты энтерококков: процент клеток в популяции, экспрессирующих TLR-2 и TLR-4, изменялся. При этом, величина и вектор TLR – зависимых изменений эпителиоцитов в значительной степени зависела от набора продуктов метаболизма, характерных для каждого штамма. Стоит отметить, что

перестройка внутри TLR-зависимого рецепторного аппарата показала достаточную автономность функционирования TLR-2 и TLR-4: изменение их экспрессии могло быть как однонаправленным, так и разнонаправленным и зависело только от типа стимулятора (спектра метаболитов конкретного штамма энтерококка) (Таблица 9, 10).

Таблица 9 – Субпопуляция буккальных эпителиоцитов, экспрессирующих TLR-2 до и после обработки метаболитами энтерококков *in vitro*, M ± m

| Штаммы энтерококков – продуценты Метаболитов | Буккальные эпителиоциты, экспрессирующие TLR-2 (% клеток в популяции) | | |
|---|---|---|---|
| | TLR-2-позитивные клетки | TLR-2 + TLR-4 -позитивные клетки | Всего клеток, экспрессирующих TLR -2 |
| Контроль (бульон TSB) | **0,4±0,03** | **29,4±7,22** | **29,8±5,10** |
| *E. faecium* L3 | 1,85±0,03 | 37,9±3,95 | 39,75±6,80 |
| *E. faecium* 174-3 | **16,88±2,30*** | **5,9±2,02*** | 22,78±2,03 |
| *E. faecalis* 651 | 0,53±0,01 | **53,76±4,30*** | **54,29±4,61*** |
| *E. faecalis* 179-2 | 0,4±0,01 | 48,5±9,83 | 48,9±7,11 |
| *E. faecalis* 208 | **7,6±0,80*** | 15,86±4,03 | 23,44±4,31 |
| *E. faecalis* 682 | **7,76±0,23*** | 20,25±3,61 | 28,01±3,86 |
| *E. faecalis* 2482 | **13,52±3,76*** | **7,1±1,10*** | 20,62±2,91 |
| *E. faecalis* 4276 | 0,31±0,13 | 25±3,27 | 25,31±5,84 |
| *E. faecalis* 4304 | 0,18±0,01 | 23,9±0,06 | 24,08±3,05 |
| *E. faecalis* 4306 | 0,15±0,03 | 23,4±2,97 | 23,19±2,46 |
| *E. faecalis* 4314 | 0,05±0,06 | 21,7±3,74 | 21,75±4,00 |

Примечание:

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

Таблица 10 – Субпопуляция буккальных эпителиоцитов, экспрессирующих TLR-4 до и после обработки метаболитами энтерококков *in vitro*, M ± m

| Штаммы энтерококков – продуценты метаболитов | Буккальные эпителиоциты, экспрессирующие TLR-4 (% клеток в популяции) | | |
|---|---|---|---|
| | TLR-4-позитивные клетки | TLR-2 + TLR-4 -позитивные клетки | Всего клеток, экспрессирующих TLR -4 |
| **Контроль (бульон TSB)** | **25,6±5,87** | **29,4±7,22** | **55,0±8,91** |
| *E. faecium* L3 | 17±5,12 | 37,9±3,95 | 54,9±6,22 |
| *E. faecium* 174-3 | **0,6±0,02*** | **5,9±2,02*** | **6,5±1,36*** |
| *E. faecalis* 651 | **8,46±2,75*** | **53,76±4,36*** | 62,22±5,81 |
| *E. faecalis* 179-2 | 12,96±3,12 | 48,5±9,83 | 61,46±5,37 |
| *E. faecalis* 208 | **8,29±2,34*** | 15,86±4,03 | 24,13±2,89 |
| *E. faecalis* 682 | 10,59±3,41 | 20,25±3,61 | 30,84±4,45 |
| *E. faecalis* 2482 | **1,47±0,07*** | **7,1±1,10*** | **8,57±1,76*** |
| *E. faecalis* 4276 | 32,6±3,80 | 25±3,27 | 57,7±5,32 |
| *E. faecalis* 4304 | 49,2±7,92 | 23,9±0,06 | **73,1±7,03*** |
| *E. faecalis* 4306 | 44,2±5,01 | 23,4±2,97 | 67,6±6,09 |
| *E. faecalis* 4314 | **53,1±3,66*** | 21,7±3,74 | **74,8±5,61*** |

Примечание:

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

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 эпителиоцитами, по сравнению с интактными клетками.

Таким образом, наши эксперименты убедительно показали, что не только компоненты клеточной стенки микроорганизмов [47, 115], но и растворимые продукты их секреции способны регулировать экспрессию TLRs.

Был проведен корреляционный анализ экспрессии Toll-подобных рецепторов и изменения адгезивности эпителиальных клеток в отношении кандид под действием метаболитов энтерококков (Таблица 11). Был рассчитан коэффициент корреляции Спирмэна ($r_s$), который составил 0,1 для пары «TLR-2 – рецепторы адгезии» и 0,3 для пары «TLR-4 – рецепторы адгезии», соответственно. Это означало, что корреляционный анализ не выявил существенную взаимосвязь между этими типами рецепторов на буккальных клетках. Таким образом, адгезивность эпителиоцитов в системах с кандидами напрямую не связана с энтерококк - индуцированным изменением экспрессии TLR-2 или TLR-4 на клетках буккального эпителия.

Таблица 11 – Сравнение изменений экспрессии TLR-2 и TLR-4 и адгезивности буккальных эпителиоцитов под действием метаболитов энтерококков

| Штаммы энтерококков – продуценты метаболитов | Кратность изменения экспрессии TLR относительно контроля (количество раз) | | Кратность изменения адгезивности эпителия (количество раз) |
|---|---|---|---|
| | TLR-2 | TLR-4 | |
| *E. faecium* L3 | 1,33±0,31 ↑ | 1,0±0,03 | 1,02±0,10 |
| *E. faecium* 2482 | 1,45±1,03 ↓ | 6,42±2,14 ↓ | 1,19±0,14 |
| *E. faecium* 651 | 1,82±1,11 ↑ | 1,13± 0,27 ↑ | 1,13±0,23 |
| *E. faecalis* 179-2 | 1,64± 0,64 ↑ | 1,12±0,03 ↑ | 1,20± 0,19 |
| *E. faecalis* 4314 | 1,37± 1,07 ↓ | 1,36± 0,81 ↑ | 1,04±0,27 |

На основании полученных данных можно сделать вывод: метаболиты энтерококков не снижают жизнеспособность эпителиальных клеток, а также существенно не влияют на работу рецепторного аппарата эпителиоцитов, вовлеченного в адгезивные контактны с кандидами.

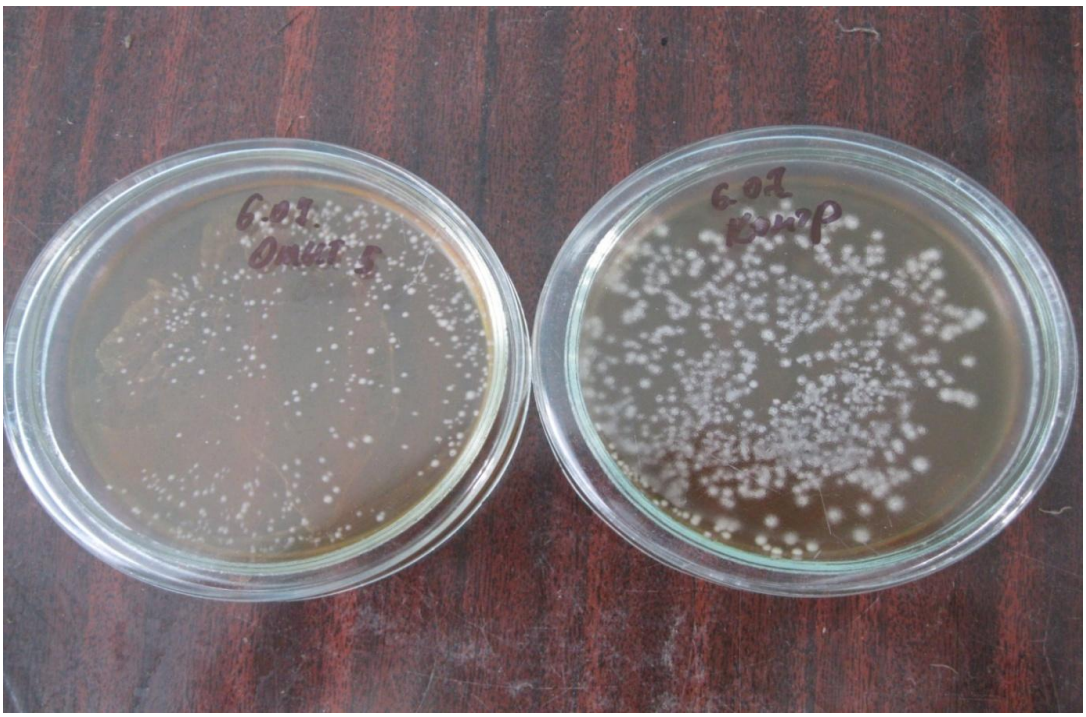
В то же время продукты метаболизма энтерококков воспринимаются буккальными клетками как стимулирующие сигналы и способны регулировать экспрессию TLR-2 и TLR-4 на эпителиоцитах. Интенсивность и направление изменения экспрессии TLR-2 и TLR-4 под действием энтерококковых метаболитов носит штамм-специфический характер и не коррелирует с адгезивной активностью эпителиоцитов в отношении кандид.

## ГЛАВА 4. Взаимодействие энтерококков с кандидами в экспериментах *in vitro*

Известно, что энтерококки способны выделять бактериоцины, обладающие биоцидным эффектом в отношении ряда микроорганизмов [23, 109]. В нашей работе мы исследовали способность метаболитов энтерококков оказывать антифунгальное действие в процессе культивирования *Candida spp*. на питательных средах. В качестве тест-культуры был взят штамм *Enterococcus faecium* L3 с известной биоцидной активностью и способностью продуцировать ряд энтероцинов [8, 23].

Влияние энтерококков на рост чистой культуры кандид изучали несколькими методами. Во-первых, использовали метод одновременного совместного культивирования E. *faecium* L3 и кандид (*C. albicans* 601, *C. glabrata* 44-1). Для этого, энтерококки ($10^8$ КОЕ/мл) засевали на поверхность МПА, затем наслаивали агар Сабуро (40ºС) и высевали кандиды сплошным газоном (0,1 мл, $10^4$ КОЕ/мл). Посевы инкубировали при 37ºС 24 час, затем подсчитывали количество выросших колоний. В контроле использовали двухслойный агар без посева энтерококков.

Исследования показали, что при одновременном совместном культивировании энтерококков и кандид, количество выросших колоний *Candida spp*. достоверно не отличалось от контрольных экспериментов (без посева энтерококков). Так, количество КОЕ *C. albicans* 601 в опыте было 82,3±4,9 и 79,6±5,2 в контроле ($p>0,05$). Эксперименты с *C. glabrata* 44-1 показали похожий результат: 73,4±3,7 КОЕ грибов рост на чашке с энтерококками и 75,9±3,2 в контроле (без энтерококков) ($p>0,05$). В то же время мы заметили, что при одновременном совместном культивировании энтерококков с кандидами у последних был, приблизительно, в 2 раза меньше размер (диаметр) колоний по сравнению с контрольными посевами (без энтерококков) (Рисунок 11), что указывало на фунгистатическое действие со стороны продуктов метаболизма энтерококков.




А Б

Рисунок 11 – Уменьшение размера колоний *C. albicans* 601 при одновременном совместном культивировании с E. *faecium* L3 на двухслойном агаре
Примечание:
А – Одновременное совместное культивирование кандид и энтерококков на двухслойном агаре
Б – Культивирование кандид на двухслойном агаре (контроль)

Вторым способом оценки взаимоотношений энтерококков и кандид при одновременном совместном культивировании было использование метода секторных посевов. В данном эксперименте, как и в предыдущем, мы наблюдали аналогичный антагонистический (фунгистатический) эффект энтерококков в отношении *C. albicans* 601 (данные не показаны). При этом, количество колоний кандид также существенно не менялось, но отмечалось уменьшение размера колоний кандид.

Все это говорило о том, что энтерококки способны негативно воздействовать на рост микромицетов. Мы предположили, что отсутствие выраженного фунгицидного эффекта при наличии фунгистатического могло быть связано с недостаточным количеством метаболитов энтерококков, присутствующих в питательной среде при таком способе совместного культивирования. С целью увеличения концентрации энтерококков и, соответственно, их метаболитов в

среде, был использован способ совместного отсроченного культивирования. При этом, сначала выращивали энтерококки на среде МПА, а затем, через сутки, формировали второй слой агара, на который засевали *C. albicans* штамм 601.

Исследования показали, что при совместном отсроченном культивировании энтерококков с кандидами, размер колоний микромицетов достоверно уменьшался в экспериментах со всеми исследуемыми штаммами *Enterococcus spp.* (Рисунок 12, 13) ($p<0,05$). Кратность снижения размера колоний варьировала в диапазоне от 1,23 до 2,00 (Рисунок 12).

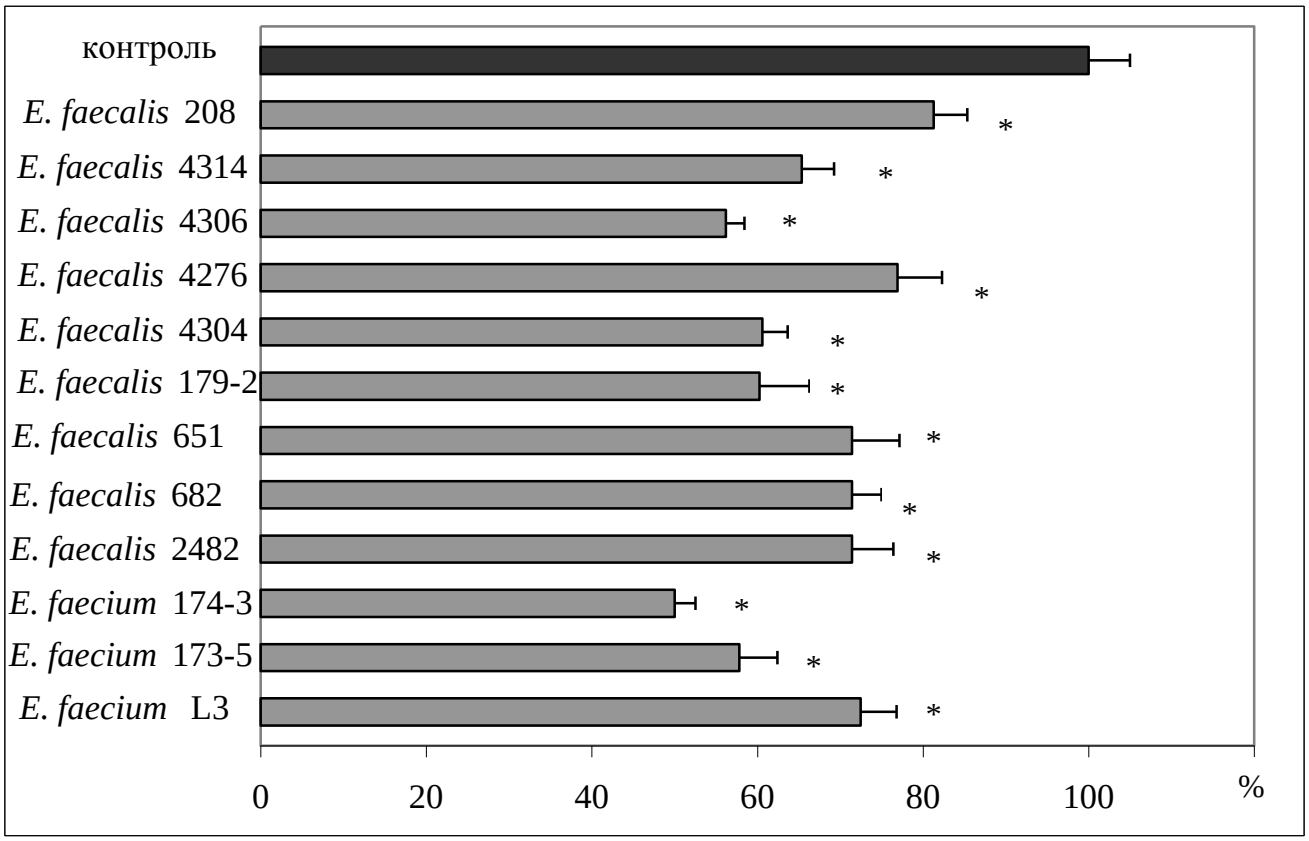
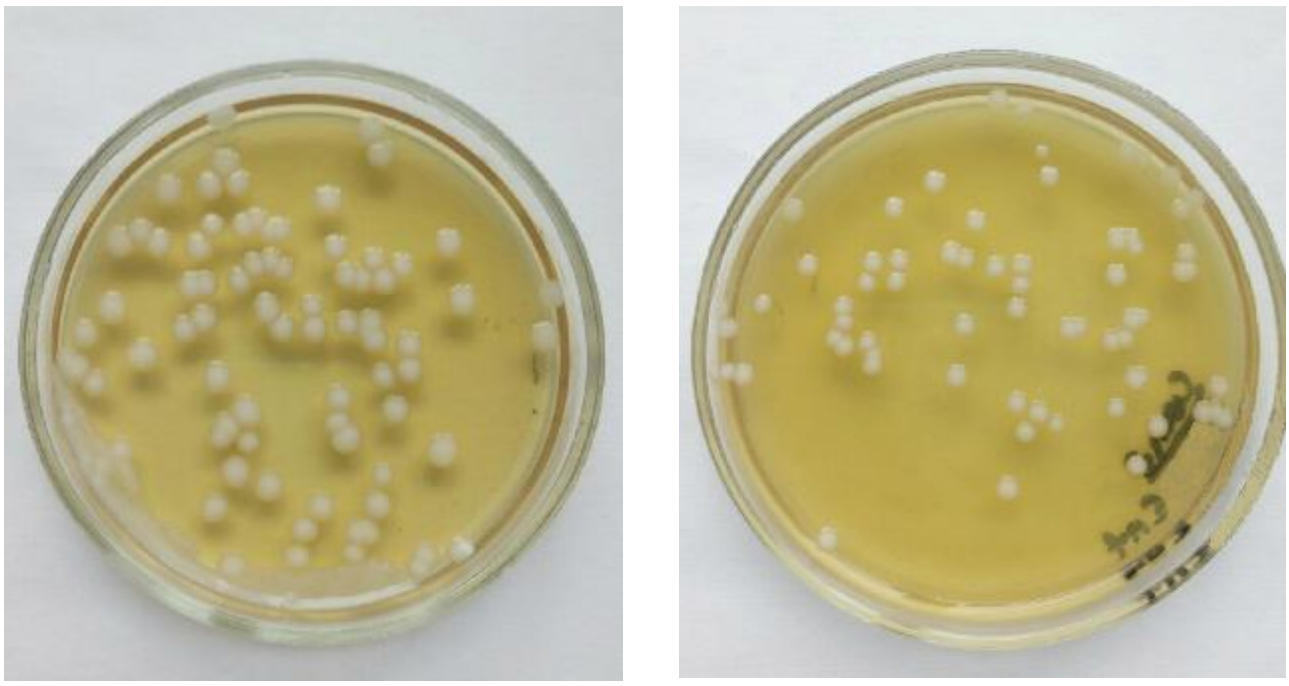



Рисунок 12 – Влияние энтерококков на размер колоний *C. albicans* при отсроченном совместном культивировании

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

Одновременно было отмечено, что присутствие метаболитов ряда штаммов энтерококков в среде вызывало снижение количества КОЕ кандид (Рисунок 14).



А Б

Рисунок 13 – Уменьшение размера и количества колоний *C. albicans* 601 при отсроченном совместном культивировании с *E. faecalis* 682 на двухслойном агаре
Примечание:
А - Культивирование кандид на двухслойном агаре **(контроль);**
Б - Отсроченное совместное культивирование кандид и энтерококков на двухслойном агаре

Проведение экспериментов по «отсроченному антагонизму» показало, что увеличение концентрации продуктов метаболизма энтерококков (вследствие их накопления в питательной среде) приводило к усилению антифунгального эффекта. Это проявлялось в выраженном фунгистатическом эффекте, характерном для всех штаммов и фунгицидном действии, характерном для некоторых из них.

Таким образом, наши эксперименты показали: энтерококки способны негативно воздействовать на рост микромицетов при совместном культивировании *in vitro*, что свидетельствует о выраженном антагонизме энтерококков в отношении кандид.

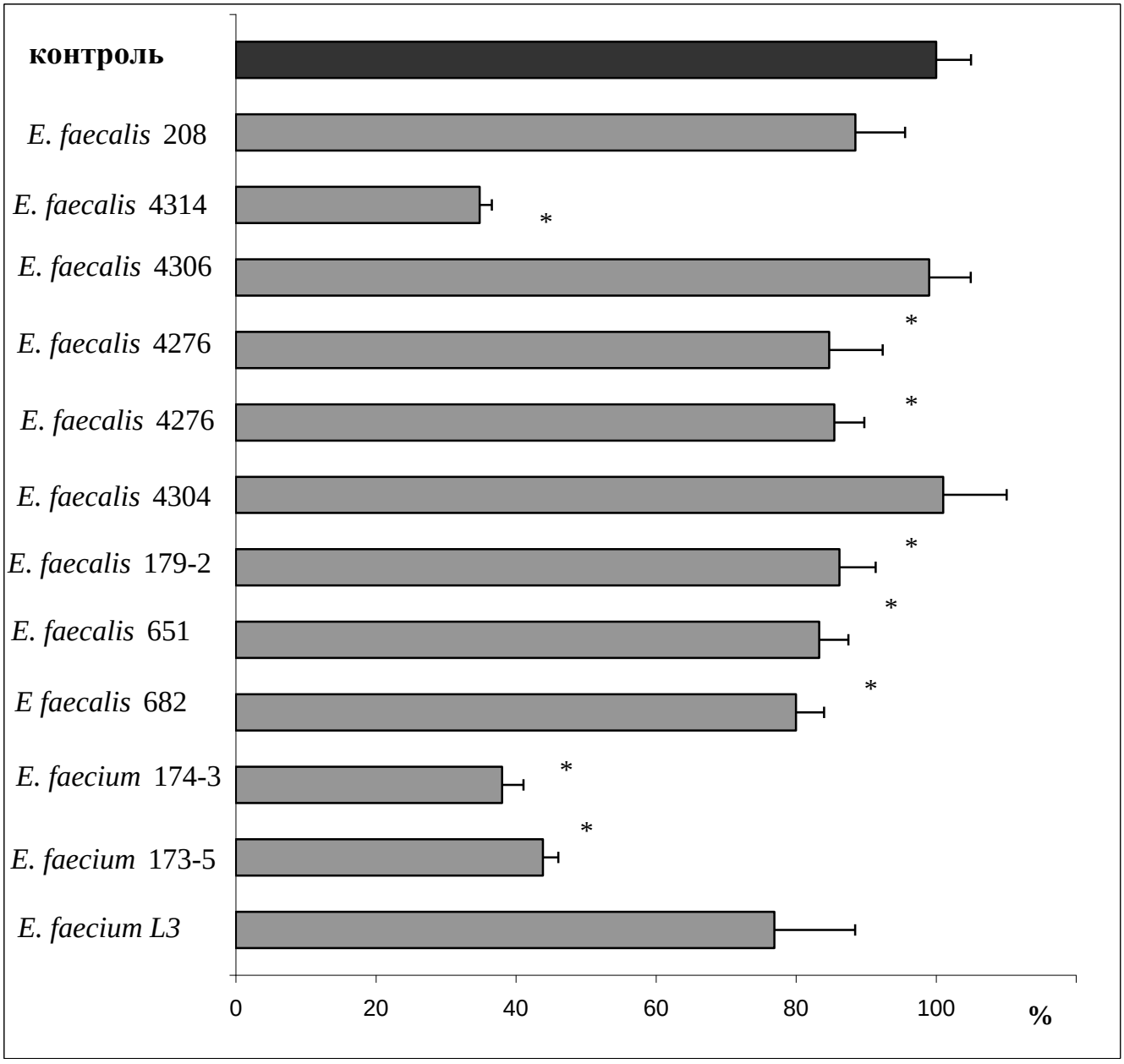



Рисунок 14 – Среднее количество колоний *C. albicans* 601 при отсроченном совместном культивировании с энтерококками на двухслойном агаре

Примечание:
Контроль - количество колоний кандид не двухслойный агаре без посева энтерококков (100%)
* – достоверность отличий относительно контроля (p< 0,05)

Для изучения зависимости фунгицидного эффекта продуктов метаболизма энтерококков от дозы и времени их воздействия на кандиды, провели ряд экспериментов по глубинному культивированию *Candida spp.* в фильтрате суточной бульонной (TSB) культуры энтерококков. В качестве тест-культуры был взят штамм *E. faecium* L3, чьи метаболиты проявили слабое фунгицидное

действие в отношении кандид в экспериментах с «отсроченным антагонизмом», но при этом вызывали выраженный фунгистатический эффект.

Кандиды помещали в профильтрованный бульон, содержащий продукты метаболизма энтерококков после их суточного культивирования. Экспозицию кандид с фильтратом бульонной культуры *E. faecium* L3 выдерживали в течение 1- 2- 24 часов, после чего делали высев микромицетов на агар Сабуро. Подсчитывали количество колоний кандид после инкубации. В контроле кандиды инкубировали в тех же временных рамках в бульоне TSB.

Было установлено, что продукты метаболизма энтерококков негативно влияют на рост *Candida spp.* (Таблица 12). В экспериментах наблюдали различную степень снижения количества колоний кандид после инкубации с метаболитами энтерококков, в зависимости от времени экспозиции, в диапазоне от 1,22 до 1,5 раз ($p>0,05$). При этом, вновь отмечали, что колонии, выросшие из клеток кандид, ранее контактировавших с продуктами секреции энтерококков, были меньше по размеру, по сравнению с колониями грибов в контроле.

Таблица 12 – Влияние метаболитов *E. faecium* L3 на жизнеспособность кандид *in vitro*, M ±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) | | |
| *C. albicans* 601 | 0,89±0,30 | 1,50±0,52 | 0,80±0,17 |
| *C. glabrata* 44-1 | 0,99±0,44 | 1,29±0,33 | 1,80±0,59 |
| *C. krusei* 583 | 1,46±0,61 | 1,36±0,27 | 1,23±0,35 |
| *C. kefir* 17 | 0,88±0,29 | 1,22±0,48 | 2,69±0,96 |

Наиболее заметно фунгицидный эффект был выражен после двух часов инкубации микромицетов с метаболитами энтерококка ($p>0,05$) (Таблица 12). То, что спустя 24 ч присутствия кандид в бульоне количество микромицетов несколько увеличивалось (по сравнению с 2-х часовой экспозицией), возможно, было связано с тем, что вследствие катаболических процессов концентрация

метаболитов энтерококков в объеме снижалась, поэтому часть выживших клеток кандид смогла продолжить репликативный цикл.

Следовательно, полученные результаты еще раз подтвердили способность метаболитов энтерококков подавлять размножение кандид. При этом, выраженность эффекта нарастала при увеличении количества метаболитов энтерококков в питательной среде.

# ГЛАВА 5. TLR-зависимая активность буккальных эпителиоцитов у больных кандидозом полости рта

Присутствие кандид на слизистых оболочках не всегда сопровождается патологическими изменениями и часто проявляется в виде бессимптомного кандиданосительства [91]. Развития кандидоза слизистых оболочек зависит как от вирулентности штамма микромицетов, так и от состояния макроорганизма, в том числе гуморальных факторов слизистых оболочек и активности клеток эпителия [28, 46, 134, 166, 167].

Одним из показателей функционального состояния эпителиоцитов является активность рецепторного аппарата клеток [64, 80], в частности, уровень экспрессии Toll-подобных рецепторов (TLR) [14].

Было произведено измерение экспрессии Toll -подобных рецепторов TLR-2 и TLR-4 на буккальных эпителиоцитах здоровых людей (16 человек), а также у 11 пациентов с кандидозом полости рта. Установлено, что у здоровых людей процент буккальных эпителиоцитов в популяции, экспрессирующих TLR-4 был больше, чем процент TLR-2 – позитивных клеток (Рисунок 15). В то же время, у пациентов оральным кандидозом наблюдалось обратное соотношение: процент TLR-4- позитивных клеток было ниже, чем TLR-2 – позитивных эпителиоцитов.

На фоне орального кандидоза общее количество клеток, способных к экспрессии как TLR-2, так и TLR-4, значительно снижалось, по сравнению с показателями в группе здоровых доноров. Так, процент эпителиоцитов, экспрессирующих TLR-4 у больных с оральным кандидозом, был снижен в 9,6±2,8 раз и составлял в среднем 4,5±1,6%. Количество буккальных эпителиоцитов, экспрессирующих TLR-2 снижалось в 1,4±0,69 раза у больных и составляло в 16,13±4,7% (Рисунок 15).

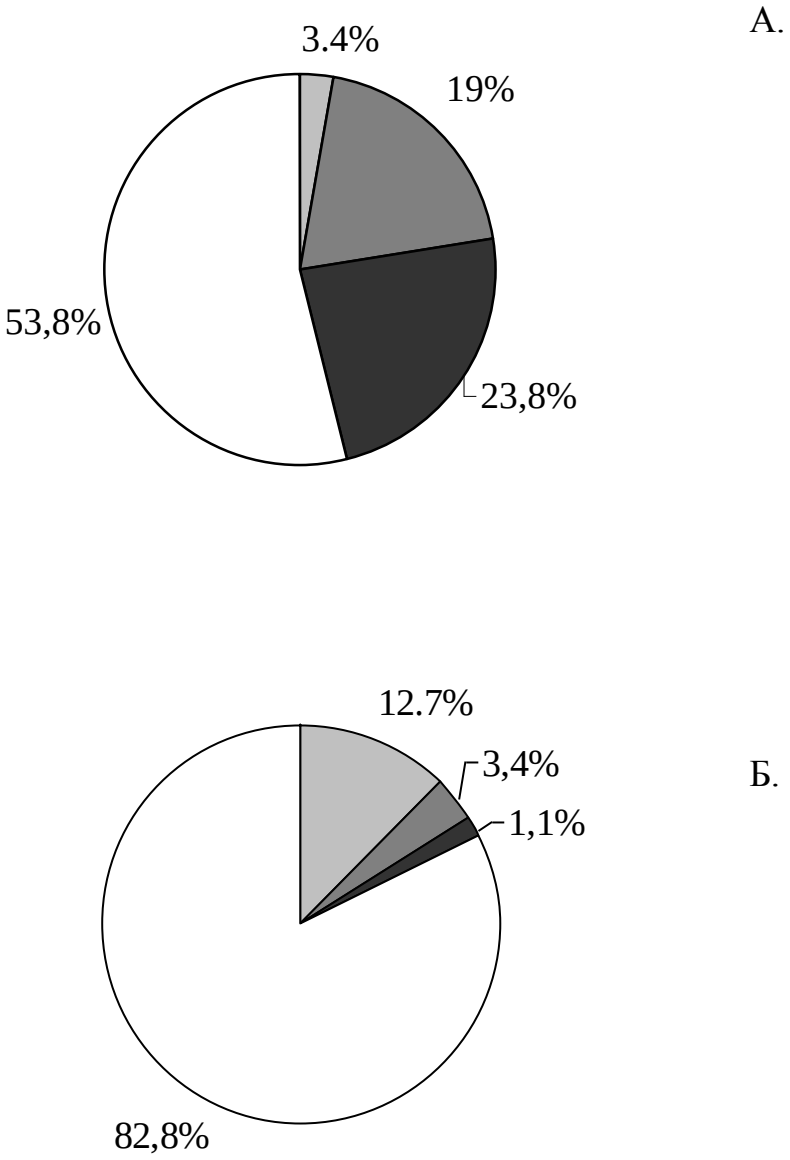



Рисунок 15 – Экспрессия TLR-2 и TLR-4 на буккальных эпителиоцитах у больных оральным кандидозом и здоровых доноров

Примечание:

А. - Процент TLR-2 и TLR-4-позитивных клеток у здоровых доноров (контроль).

Б. - Процент TLR-2 и TLR-4-позитивных клеток у больных оральным кандидозом

- TLR-2/4 - негативные клетки
- TLR- 4 - позитивные клетки
- TLR-2/4 -позитивные клетки
- TLR-2 - позитивные клетки

Одновременно, на фоне кандидоза полости рта, существенно увеличивался процент буккальных клеток в популяции, не способных экспрессировать ни TLR-2, ни TLR-4 – «TLR-2/TLR-4-негативные клетки» ($p<0,05$) (Рисунок 15). Данный феномен, возможно, был обусловлен димеризацией активированных TLRs [32, 117, 147], однако, также нельзя исключить и шеддинг. В последнем случае уменьшение количества рецепторов идет за счет протеолитического отщепления внеклеточной части мембранных рецепторов с поверхности клеток [87, 155].

В дополнение, был проведен сравнительный анализ жизнеспособности буккальных эпителиоцитов у больных оральным кандидозом и здоровых доноров методом проточной цитофлуориметрии. Было выявлено, что жизнеспособность эпителиальных клеток полости рта, полученных от больных оральным кандидозом, не отличается от показателей у здоровых людей (Таблица 13).

Таблица 13 – Количество жизнеспособных эпителиоцитов при оральном кандидозе, M ±m

| Показатели | Контроль (здоровые) n=16 | Опыт (оральный кандидоз) n=11 |
|---|---|---|
| Процент жизнеспособных клеток | 99,1±0,53 | 99,7±0,24 |

Полученные данные позволили утверждать следующее: кандида-индуцированный воспалительный процесс и прямой контакт эпителиоцитов с кандидами вызывает существенную перестройку в TLR-2 и TLR-4 - зависимом рецепторном аппарате буккальных клеток, на фоне сохранения достаточной жизнеспособности клеток эпителия. При этом, значительно увеличивался процент TLR-2/TLR-4 – негативных эпителиоцитов.

## ГЛАВА 6. Взаимоотношение энтерококков и кандид в системах *in vivo*

### 6.1. Взаимоотношения энтерококков, кандид и лактобактерий на уровне вагинального биотопа у женщин репродуктивного возраста

Был проведен микробиологический анализ образцов содержимого влагалища, полученных от 552 женщин детородного возраста с вагинозом различной этиологии. Для дальнейшего анализа из общего количества были отобраны и проанализированы 399 образцов, полученных от женщин, у которых в вагинальном содержимом выявлялись энтерококки и/или кандиды. Из них, в 51% случаев (205 пациенток) были выделены кандиды в разных титрах: 108 образцов содержали титр кандид менее $10^4$ КОЕ/мл (норма), 72 – свыше $10^4$ и менее $10^5$КОЕ/мл, 25 - свыше $10^5$ КОЕ/мл. Из 95% образцов были выделены *C. albicans*. *Enterococcus spp.* были обнаружены в содержимом влагалища в 59% случаев (235 женщин): в 50 случаях – в пределах нормы (менее $10^3$ КОЕ/мл), в 128 - свыше $10^3$ КОЕ/мл и менее $10^5$ КОЕ/мл, в 57 - свыше $10^5$ КОЕ/мл. При анализе полученных данных было установлено, что в отсутствие энтерококков, в 52,2% случаев количество *Candida spp.* не превышало $10^4$ КОЕ/мл (было в норме), а в 47,8% случаев – было выше нормальных значений (из них - в 8,8% образцах количество *Candida spp.* было выше $10^6$ КОЕ/мл) (Таблица14, Рисунок 16А).

Таблица 14 – Процент встречаемости кандид в вагинальном содержимом обследованных женщин при различных титрах энтерококков, M ±m

| титр кандид / титр энтерококков | отсутствие кандид | до$10^4$ КОЕ/мл («норма») | $10^4$ - $10^5$ КОЕ/мл | $10^6$ КОЕ/мл и выше |
|---|---|---|---|---|
| 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 |

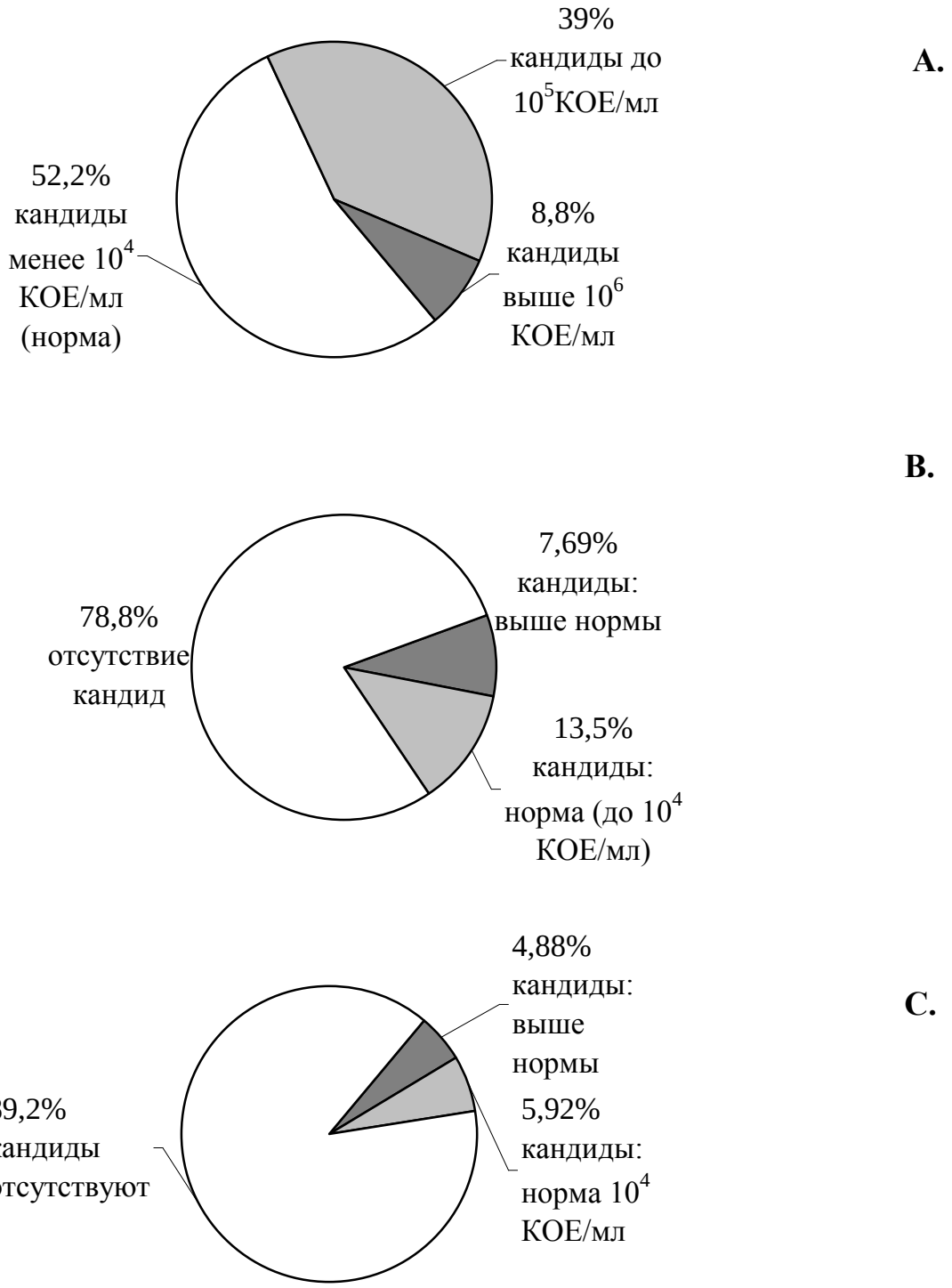



Рисунок 16 – Содержание *Candida spp.* в вагинальном содержимом у женщин

Примечание:

А. - Отсутствие *Enterococcus spp.*в биотопе

В. - *Enterococcus spp.* в нормальном титре (до $10^3$ КОЕ/мл)

С. - Повышенная концентрация *Enterococcus spp*. (свыше $10^3$ КОЕ/мл) в биотопе

При наличии в вагинальном содержимом *Enterococcus spp*. в титре менее $10^3$ КОЕ/мл (норма) у 78,8% пациенток грибы рода *Candida* отсутствовали, у 13,5% - число кандид не превышало $10^4$ КОЕ/мл, что соответствовало нормальному титру, и только в 7,69% случаев микромицеты превышали норму (свыше $10^4$ КОЕ/мл и до $10^6$ КОЕ/мл) (Рисунок 16В).

При повышении количества энтерококков свыше $10^3$ КОЕ/мл у 89,2% пациенток микромицеты отсутствовали (что несколько выше, чем при нормальной концентрации *Enterococcus spp*. в том же биотопе), у 5,92% женщин концентрация *Candida spp.* не превышала норму, и лишь 4,88% случаев количество микромицетов было выше нормы (Рисунок 16С).

При графическом изображении зависимости титра кандид от количества энтерококков в содержимом влагалища прослеживается обратная корреляция между количеством кандид и энтерококков в вагинальном содержимом (Рисунок 17). На рисунке также видно, что при повышении титра энтерококков количество кандид стремилось к нулю.

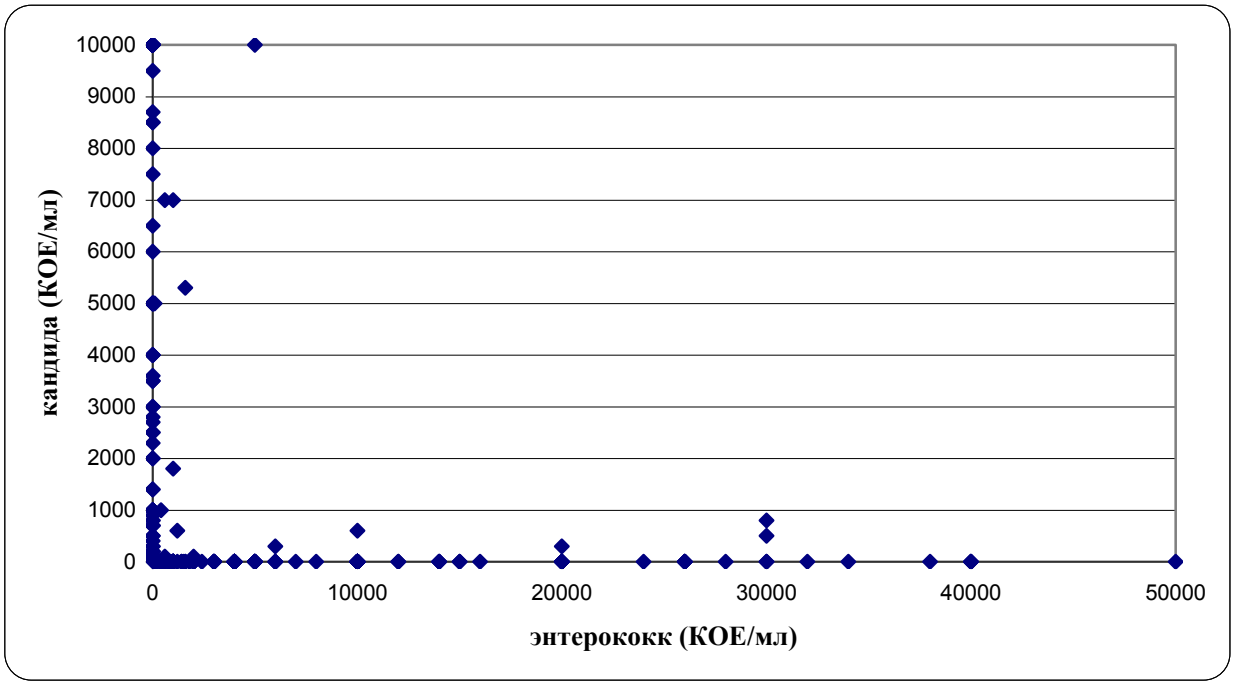



Рисунок 17 – Зависимость количества кандид от энтерококков в вагинальном содержимом у женщин

Был проведен корреляционный анализ полученных данных методом Спирмена, для выборок с распределением, отличным от нормального.

Коэффициент корреляции по Спирмену ($r_s$) составил - 0,66, что говорит о средней силе корреляционной связи и обратной зависимости между популяциями энтерококков и кандид.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об антагонистических взаимоотношениях между энтерококками и кандидами, что проявляется подавлением размножения микромицетов в присутствии нормальной или повышенной концентрации *Enterococcus spp.* во влагалище у женщин детородного возраста.

Для сравнения, у тех же пациенток, мы проанализировали вагинальные популяции кандид и энтерококков в проекции на количество лактобактерий в биотопе, поскольку последние микроорганизмы рассматриваются как доминирующая микрофлора влагалища у женщин репродуктивного возраста [9, 71, 83, 93, 105]. Известно, что количество лактобактерий во влагалище здоровых женщин достаточно лабильно и изменяется под влиянием различных факторов. На титр лактобацилл оказывает влияние гормональный статус женщины, день менструального цикла, время суток, спектр условно-патогенной флоры во влагалище и пр. [86].

В наших исследованиях у всех пациенток был определен титр лактобацилл в вагинальном содержимом. За нормальное содержание *Lactobacillus spp.* считали их количество не ниже $10^5$ КОЕ/мл [83]. Статистический анализ показал, во-первых, отсутствие существенной корреляционной связи между титром лактобактерий и количеством кандид в вагинальном содержимом: коэффициент корреляции $r_s$ составил 0,16 (Рисунок 18). Во-вторых, повышение титра лактобактерий не оказывало существенного влияния на наличие энтерококков: коэффициент корреляции $r_s$ между концентрациями данных бактерий в биотопе был равен -0,25.

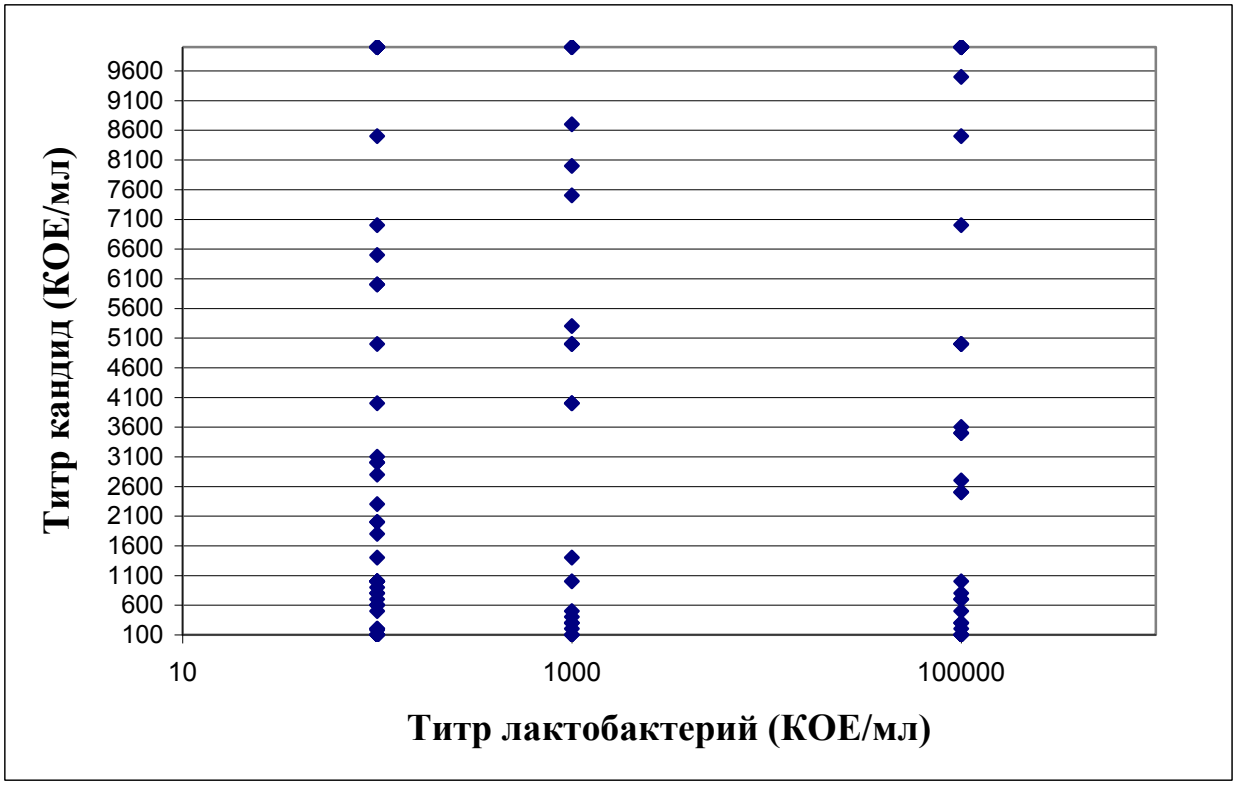



Рисунок 18 – Зависимость титра кандид от содержания лактобацилл в вагинальном содержимом у женщин

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии выраженных антагонистических взаимоотношений между лактобактериями и такими факультативными представителями вагинального биотопа как кандиды и энтерококки.

### 6.2. Влияние энтерококков на развитие экспериментального вагинального кандидоза у крыс

Анализ образцов содержимого влагалища женщин репродуктивного возраста показал, что энтерококки способны регулировать количество кандид в вагинальном содержимом и, по-видимому, могут влиять на развитие вагинального кандидоза. Для проверки этого предположения были проведены эксперименты по моделированию вагинального кандидоза на лабораторных животных – белых беспородных крысах-самках.

Для искусственного воспроизведения кандидоза в вагинальную полость крыс вводили 0,2 мл суспензии *C. albicans* штамм 601 ($10^9$ кл/мл). Через 2-е суток после заражения была выявлена значительная контаминация вагинальной полости

кандидами у животных. Для дальнейшей работы отобрали 36 особей со сходным и достаточно высоким уровнем обсемененности влагалища, из которых были сформированы 3 группы (по 12 животных в каждой): одна контрольная и две экспериментальных. На фоне клинически-выраженного вагинального кандидоза (на третьи сутки после заражения), животным в течение 7 дней ежедневно интравагинально вводили 0,1 мл очищенного центрифугированием супернатанта бульонной культуры *E. faecium* L-3 (экспериментальная группа №1) или суспензию бактерий в ЗФР в концентрации $10^9$ кл/мл (экспериментальная группа №2). В контрольной группе животным вместо энтерококков вводили стерильный TSB. Осуществляли забор проб у животных на 3-е, 5-е, 7-е сутки эксперимента с помощью стерильного ватного тампона. Помещали тампон в 1мл стерильного ЗФР, материал ресуспендировали, после чего производили посев (0,1 мл) на агар Сабуро. Посевы инкубировали (24ч, 37ºС), производили подсчет выросших колоний *C. albicans* на чашках Петри. Подсчитывали количество колоний после инкубации ($37^0$С, 24 ч.).

В экспериментальной группе №1 (введение продуктов метаболизма энтерококков), была выявлена заметная тенденция к снижению концентрации кандид в вагинальной полости у крыс (Рисунок 19). На 5-е сутки титр микромицетов в вагинальном содержимом не превышал $2{,}6 \cdot 10^4$ КОЕ/мл. В экспериментальной группе №2 (введение суспензии живых энтерококков) также наблюдалось некоторое снижение концентрации кандид, но данный эффект наступал позже, чем в экспериментальной группе 1, и был менее стабильным. В контрольной группе, в большинстве случаев, титр *C. albicans* в вагинальном содержимом не снижался и на 5-е сутки превышал $8 \cdot 10^4$ КОЕ/мл (Рисунок 19).

Было замечено, что наиболее сильный элиминирующий антикандидозный эффект наблюдался при использовании фильтрата метаболитов энтерококков, а не живых бактерий. В последнем случае, по-видимому, концентрация биологически активных продуктов метаболизма энтерококков во влагалище у крыс была ниже, поскольку бактериям требовалось время для адаптации и колонизации слизистой оболочки.

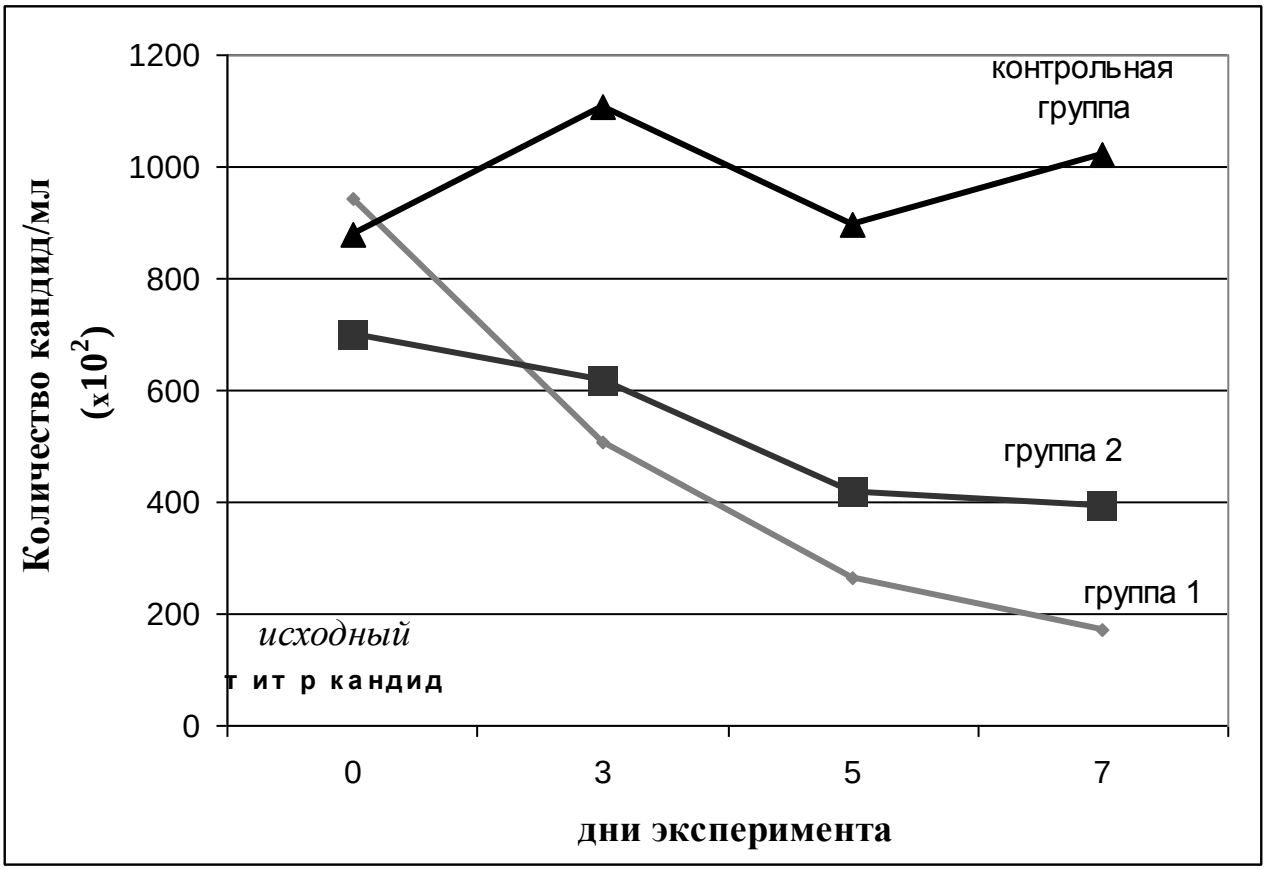



Рисунок 19 – Концентрация кандид в вагинальной полости крыс разных групп в динамике эксперимента

Таким образом, при анализе клинического материала было выявлено, что энтерококки являются антагонистами кандид в вагинальном биотопе, при этом высокие титры энтерококков коррелирует с низким содержанием кандид в вагинальной полости. В то же время, естественный прирост титра (высокий титр) лактобактерий не способен сдерживать размножение ни кандид, ни энтерококков в вагинальной полости у женщин детородного возраста.

Эксперименты на крысах с моделированным вагинальным кандидозом подтвердили антагонизм энтерококков и кандид *in vivo*. Продукты метаболизма энтерококков способствовали снижению уровня колонизации микромицетами вагинальной полости у крыс, при этом скорость очищения вагинального эпителия от кандид напрямую зависела от концентрации энтерококковых метаболитов в среде.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Грибы рода *Candida* являются наиболее распространенными грибковыми патогенами человека и главной причиной фунгальной инфекции полости рта, желудочно-кишечного тракта и вагинита, ежегодно вызывая заболевания миллионов людей во всем мире [101, 167]. Причины, способствующие развитию кандидоза слизистых оболочек, разнообразны: дисбиоз на фоне приема антибактериальных препаратов, различные формы иммунодефицита, химиотерапия при онкологических заболеваниях, трансплантация органов, генетические факторы, а также изменение гормонального статуса организма, в том числе, вызванного приемом гормональных контрацептивов [43, 90, 100, 148, 195, 207].

Для лечения мукозального кандидоза используются антимикотики и антисептики [15, 24, 57, 71, 78, 84, 205, 206]. Назначение антифунгальных препаратов местно может снижать их токсическое воздействие на организм человека, а высокая концентрация на поверхности слизистых - уменьшать вероятность развития лекарственной устойчивости. Однако, применение любых фармакологических форм антимикотиков не имеет стопроцентную эффективность при лечении хронической формы заболевания, в частности, рецидивирующего вульвовагинального кандидоза у беременных [24, 100, 101], что свидетельствует о сложности (многоплановости) патогенеза заболевания.

Адгезия кандид на эпителиоцитах является важным и обязательным этапом в развитии кандидоза [91, 172, 181]. Поэтому факторы, воздействующие на этот процесс, способны оказывать влияние на развитие кандидозной инфекции.

Кроме секреторных факторов мукозального иммунитета [198], в защите слизистых оболочек от адгезии и последующей колонизации кандид принимают самое активное участие сами мукозальные эпителиоциты [167], а также конкурирующие представители нормальной микробиоты. Все эти компоненты сообща обеспечивают высокий уровень колонизационной резистентности слизистых в отношении потенциальных патогенов, в частности, кандид. Среди

представителей нормальной микробиоты последнее время много внимания уделяется энтерококкам как бактериям, имеющим высокий антагонистический потенциал [16, 22, 58]. Энтерококки способны продуцировать бактериоцины, органические кислоты, активированные кислородные метаболиты, ферменты, экзополисахариды и другие активные метаболиты [20, 23, 98, 109, 137, 139], что может помогать им в конкурентной борьбе с другими представителями микробиоценозов слизистых оболочек [11].

В нашей работе мы изучали последствия и механизмы влияния продуктов метаболизма энтерококков на жизнеспособность кандид, адгезивные взаимодействие грибов с эпителиоцитами слизистых оболочек, а также способность самих клеток мукозального эпителия реагировать на присутствие исследуемых микроорганизмов.

В ходе работы было выявлено, что метаболиты энтерококков способны подавлять адгезию кандид на буккальных эпителиоцитах. Выраженность антиадгезивного эффекта у разных штаммов энтерококков в отношении *C. albicans* была различна, при этом набольшим антиадгезивным эффектом обладали метаболиты штаммов *E. faecium* L3 и *E. faecalis* 4306, снижающие адгезию кандид в 1,72 и 1,6 раза, соответственно.

Было установлено, что метаболиты энтерококков обладают антиадгезивным эффектом также и в отношении других видов кандид. При этом, адгезивность штаммов *C. glabrata, C. krusei* и *C. tropicalis* в отношении эпителиоцитов снижалась под действием метаболитов энтерококков в 1,77±0,29, 1,63±0,22 и 1,25±0,09 раз, соответственно ($p<0,05$). Воздействие метаболитов энтерококков на *C. kefir* не приводило к достоверному изменению адгезивности микромицетов, что, отчасти, могло быть связано с исходной низкой способностью исследуемого штамма к адгезии на эпителиальных клетках.

Было выдвинуто несколько гипотез, которые могли бы объяснить антиадгезивный эффект метаболитов энтерококков в отношении кандид.

Во-первых, снижение адгезивности могло быть связано с гибелью кандид после обработки их продуктами метаболизма энтерококков. Однако, ранее было

установлено [60], что адгезивная активность живых и инактивированных клеток кандид принципиально не отличается.

Во-вторых, изменения в работе адгезивного аппарата кандид могли быть связаны с изменением pH среды из-за продукции энтерококками одного из метаболитов – молочной кислоты. Для подтверждения/опровержения данной гипотезы был проведен ряд экспериментов с воздействием химически чистой молочной кислоты на адгезию кандид. Эксперимент показал, что при добавлении лактата в тест-систему способность кандид к адгезии на буккальных эпителиоцитах не снижалась, т.е. антиадгезивный эффект продуктов метаболизма энтерококков не был связан с закислением среды.

В-третьих, снижение адгезии кандид на эпителиоцитах могло быть обусловлено механическим экранированием адгезинов кандид секреторными продуктами энтерококков. Для проверки данного предположения, кандиды обрабатывали метаболитами энтерококков, отмывали от нековалентно связанных частиц ДДС [25, 55], что, однако, не приводило к восстановлению исходного уровня адгезии микромицетов. Отрицательный результат вышеуказанного эксперимента явно указывал на то, что в рецепторном аппарате кандид происходят необратимые изменения (модификация) под воздействием секреторных продуктов энтерококков, которые, в частности, обладают ферментативной активностью.

В экспериментах было также установлено, что метаболиты энтерококка не оказывали влияния на десорбцию кандид, ранее закрепившихся на клетках буккального эпителия. Таким образом, было выявлено, что метаболиты энтерококков способны модифицировать только свободные адгезины кандид и не способны оказывать влияние на рецепторный аппарат кандид, проконтактировавший с рецепторным аппаратом эпителия.

Было определено, что антиадгезивный эффект метаболитов энтерококков, прежде всего, обусловлен фракцией, состоящей из молекул с молекулярной массой преимущественно от 3 до 10 кДа. Поскольку известно, что бактериоцины

энтерококков имеют молекулярную массу в диапазоне от 2 до 35 кДа [20], то, следовательно, они также могли присутствовать в вышеуказанной фракции.

Нас также интересовал вопрос, как поведут себя антифунгальные компоненты энтерококков в ситуации, когда меняется физиологический статус самих эпителиоцитов, например, при воспалении. Известно, что одним из проявлений развития кандидозной инфекции является хронический воспалительный процесс, которых характеризуется повышением уровня провоспалительных медиаторов в среде, в том числе, увеличением концентрации цитокинов IL-6, IL-8 и пр. [66, 70, 103, 110]. Эксперименты показали, что воздействие IL-6, IL-8 на буккальные эпителиоциты существенно повышает их восприимчивость в отношении *C. albicans*, что подтверждает данные наших коллег [55, 56]. В то же время, если клетки *C. albicans* были предварительно обработаны продуктами метаболизма энтерококка *E. faecium* L3, то усиление адгезии в тест-системе «кандиды-эпителиоциты» могло быть нейтрализовано. При этом индекс искусственной колонизации в системе снижался до уровня, характерного для экспериментов «интактные кандиды-интактные эпителиоциты». Стоит отметить, что в этом и некоторых последующих экспериментах был использован в качестве тест-культуры пробиотический штамм *E. faecium L3,* который не содержит генов патогенности, имеет выраженный антагонизм к патогенной и условно-патогенной флоре и способен устранять дисбиотические нарушения в кишечнике [16, 22].

Эпителиальные клетки имеют различные функции, при этом одной из наиболее важных является их способность к рецепции. Рецепторные молекулы мукозальных эпителиоцитов могут быть вовлечены в адгезивные взаимодействия с микроорганизмами, при этом данный процесс является отчасти энергетически-независимым, а частично - зависит от метаболической активности клеток [61]. Кроме того, эпителиоциты обладают достаточно широким спектром Toll - подобных рецепторов, которые участвуют в трансмембранной передаче сигнала на генетический аппарат клетки [167].

Активация Toll-подобных рецепторов микроорганизмами или их субкомпонентами стимулирует синтез эпителиальными клетками цитокинов, регулирующих иммунные и воспалительные реакции на уровне субэпителиальных тканей [196].

Мы исследовали влияние продуктов метаболизма энтерококков на функциональную активность эпителиоцитов, оценивая ее через призму работы рецепторного аппарата клеток, т.е. определяли активность молекул, вовлеченных в адгезивные взаимодействия с микроорганизмами и экспрессию Toll -подобных рецепторов.

Было установлено, что энтерококковые метаболиты не оказывают существенного влияния на адгезивность эпителиоцитов в отношении кандид, несмотря на то, что среди продуктов жизнедеятельности энтерококков присутствуют ферменты, относящиеся к классу протеаз [20, 137]. Это можно объяснить либо отсутствием мишеней на эпителиоцитах для литических ферментов *Enterococcus spp.*, либо способностью буккальных клеток к быстрой регенерации своего адгезивного аппарата. По-видимому, по той же причине, продукты метаболизма энтерококков не влияли на жизнеспособность буккальных эпителиоцитов.

Экспрессию Toll-подобных рецепторов на буккальных эпителиоцитах исследовали методом проточной цитофлуориметрии. В экспериментах оценивали экспрессию TLR-2 и TLR-4 – имеющихся у всех категорий мукозальных эпителиоцитов [192]. Было обнаружено, что процент буккальных клеток в популяции, способных к экспрессии TLR-2 и TLR-4, менялся после обработки эпителиоцитов секреторными продуктами энтерококков.

Таким образом, Toll-подобные рецепторы буккальных эпителиоцитов способны реагировать не только на компоненты клеточной стенки бактерий [47], но и на растворимые молекулы бактериальных метаболитов. В то же время, было отмечено, что направленность и уровень изменений экспрессии TLRs зависели от особенностей (качественный и количественный состав) секреторных продуктов отдельных штаммов энтерококков.

Обращает на себя особое внимание тот факт, что пробиотический штамм *E. faecium L3* практически не менял способности эпителиоцитов к экспрессии как TLR-2, так и TLR-4. Такой слабый сигнал может быть отражением низкой вирулентности данного штамма, что еще раз подтверждает мнение о способности эпителиоцитов по-разному реагировать на микроорганизмы с разным уровнем патогенности [167]. Кроме того, это открывает перспективы изучения экспрессии TLRs на буккальных эпителиоцитах для оценки штаммов на потенциальную патогенность.

Статистический анализ показал отсутствие корреляции между изменениями адгезивных качеств эпителиоцитов и уровнем экспрессии TLR-2 или TLR-4 на клетках эпителия под воздействием метаболитов энтерококков разных штаммов, что указывало на определенную автономность данных рецептор-зависимых систем.

Следующим этапом работы была оценка антифунгального (фунгицидного или фунгистатического) действия метаболитов энтерококков на грибы рода *Candida*. Для первых экспериментов серии по изучению фунгицидной активности был выбран пробиотический штамм *E. faecium* L3.

Было выявлено, что при одновременном совместном культивировании *C. albicans* 601 или *C.glabrata* 44-1 с *E. faecium L3* на двухслойном агаре, количество колоний кандид достоверно не снижалось. В то же время, было замечено уменьшение диаметра колоний (в среднем в 2 раза) *Candida spp.*, культивируемых совместно с энтерококками на двухслойном агаре. Полученные результаты дали нам основание предположить, что метаболиты энтерококков оказывают ингибирующее воздействие на кандиды, однако при таком варианте совместного культивирования концентрация фунгицидных веществ недостаточна для существенного подавления роста кандид. В связи с этим были проведены эксперименты с использованием метода «отсроченного антагонизма на «двухслойном агаре» [76] с различными штаммами энтерококков, в которых было выявлено, что размер колоний микромицетов достоверно уменьшался в присутствии *Enterococcus spp.* Кратность снижения размера колоний варьировала

в диапазоне от 1,23 до 2,00 ($p<0,05$), кроме того, продукты метаболизма штаммов *E. faecalis* 4314, *E. faecium* 173-5, *E. faecium* 174-3 снижали количество колоний кандид ($p<0,05$). Таким образом, метаболиты всех исследуемых штаммов энтерококков обладали фунгистатическим эффектом, замедляя рост колоний кандид, а у отдельных штаммов даже фунгицидным эффектом.

Для изучения зависимости антифунгального эффекта энтерококковых метаболитов от дозы и времени экспозиции с кандидами, провели ряд экспериментов по инкубации клеток *C. albicans* 601, *C. glabrata* 44-1, *C. krusei* 583 и *C. kefir* 17 с суточной бульонной культурой энтерококка, где, как мы полагали, присутствует высокая концентрация метаболитов. Штамм *E. faecium* L3, был выбран в качестве продуцента метаболитов, поскольку не обладал заметным фунгицидным действием в экспериментах на двухслойном агаре.

Проводили глубинное культивирование чистой культуры кандид с метаболитами суточной бульонной культуры энтерококков в течение 1, 2 или 24 часов. Было выявлено, что растворимые продукты *E. faecium* L3 снижали высеваемость кандид на агаре, в среднем, в 1,22-1,5 раза ($p>0,05$). Наибольшее снижение числа жизнеспособных кандид (для всех исследуемых штаммов) наблюдалось после двух часов инкубации с продуктами метаболизма энтерококка, более длинная экспозиция не приводила к усилению эффекта, что, возможно, было связано с катаболическим распадом активных субстанций.

Таким образом, данные различных вариантов экспериментов по совместному культивированию энтерококков и кандид показали наличие антагонизма между данными микроорганизмами. При этом, секреторные продукты всех исследуемых штаммов *Enterococcus spp*. были способны подавлять метаболизм микромицетов, что, прежде всего, выражалось в уменьшении размера колоний кандид. Кроме того, продукты метаболизма отдельных штаммов энтерококков также проявляли фунгицидный эффект, что выражалось в снижении количества КОЕ микромицетов после инкубации с ними.

Кандиды могут распознаваться мукозальными эпителиоцитами с помощью Toll -подобных рецепторов [113]. Было проведено исследование экспрессии TLR-

2 и TLR-4 на буккальных эпителиоцитах при кандидозе полости рта у 11 пациентов. Было установлено, что у здоровых людей (16 человек) процент буккальных эпителиоцитов, экспрессирующих TLR-4 всегда был больше, чем экспрессирующих TLR-2. В то же время, у пациентов с оральным кандидозом наблюдалось обратное соотношение: процент TLR-4 – позитивных клеток во всех случаях был ниже, чем TLR-2 – позитивных эпителиоцитов. Заметим, что сходное направление изменений экспрессии TLRs при воспалении полости рта было обнаружено сотрудником нашей лаборатории - Луковой О.А. (2015) - при пародонтите. Можно сделать вывод, что экспрессия TLR-2 (в норме низкая) существенно увеличивается при патологических состояниях, таких как оральный кандидоз. С другой стороны, в норме высокая экспрессия TLR-4 снижается при заболевании, что может быть связано, либо с интенсивной димеризацией TLR-4, либо с шеддингом молекул [32, 87, 117, 147, 155], что, в обоих случаях, снижает способность клетки отвечать на последующие TLR-4 –зависимые стимулы.

Одновременно, было установлено, что при оральном кандидозе количество клеток, не способных экспрессировать TLR-2 и TLR-4 резко увеличивалось и составляло 82,8% и выше. В то же время, в работе сотрудника нашей лаборатории Луковой О.А (2015), было показано, что процент TLR-негативных эпителиоцитов здоровых доноров, обработанных метаболитами кандид разных видов, не превышал 9%. Это говорит о том, что патологический процесс при оральном кандидозе приводит к существенно большей активации/дестабилизации эпителиоцитов, чем контакт буккальных клеток с метаболитами кандид. Стоит иметь в виду, что при кандидозе имеет место взаимодействие буккальных эпителиоцитов не только с микробными метаболитами, но и с поверхностными структурами микромицетов и медиаторами воспаления. Здесь также стоит упомянуть и о наших экспериментах с энтерококками, где было выявлено, что процент TLR-2/TLR-4 - негативных клеток (взятых от здоровых доноров) после обработками метаболитами энтерококков разных штаммов колебался в диапазоне 46,24- 94,1%. Можно предположить, что более сильная TLR-зависимая активация эпителиоцитов метаболитами энтерококков, чем метаболитами кандид может

быть полезна с точки зрения стимуляции мукозального иммунитета. Таким образом, можно сделать предположение, что TLR-зависимая активация эпителиоцитов энтерококковыми метаболитами опосредованно усиливает колонизационную резистентность эпителия в отношении различных микробов-комменсалов, в том числе и кандид.

Эксперименты с использованием проточной цитофлуориметрии также показали, что жизнеспособность буккальных эпителиоцитов на фоне орального кандидоза, равно как и после воздействия на них метаболитов энтерококков, существенно не менялась.

Для анализа взаимоотношений энтерококков и кандид в системах *in vivo* были проведены исследования вагинального содержимого у женщин детородного возраста с дисбиозом влагалища разной этиологии. Были проанализированы результаты микробиологического исследования 399 женщин, у которых во влагалище 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 в исследуемом материале снижается. При статистической обработке было установлено наличие обратной зависимости при средней силе корреляционной связи ($r_s$=-0,66) между популяциями *Candida spp.* и *Enterococcus spp.* Так, при отсутствии энтерококков в содержимом влагалища у 52% пациенток были выделены кандиды в концентрации, не превышающей нормальную ($10^4$ КОЕ/мл), у 48% – количество микромицетов превышало норму. При обнаружении в вагинальном содержимом *Enterococcus spp.* в концентрации, не превышающей нормальную (до $10^3$ КОЕ/мл), у 79% пациенток грибы рода *Candida* отсутствовали, у 13% - титр кандид не превышал $10^4$ КОЕ/мл, и только в 8% случаев количество микромицетов превышало норму. Наконец, при повышении количества *Enterococcus spp.* свыше $10^3$ КОЕ/мл у 89% пациенток грибы рода *Candida* отсутствовали, у 6% женщин титр микромицетов не превышал норму, и только в 5% случаев количество кандид было выше нормы.

Таким образом, полученные результаты показали наличие выраженных антагонистических взаимоотношений между энтерококками и кандидами в вагинальном биотопе у женщин репродуктивного (детородного) возраста.

Поскольку доминирующей микрофлорой влагалища у женщин являются лактобациллы [9, 71, 83, 93, 105], продуцирующие молочную кислоту, перекись водорода и другие антимикробные факторы [42, 215], и известны работы, указывающие на антагонистические взаимоотношения лактобацилл и кандид *in vitro* [21, 189, 199]. Мы посчитали необходимым дополнительно исследовать взаимоотношения кандид и энтерококков с *Lactobacillus spp.* в вагинальном биотопе.

У всех пациенток был определен титр лактобацилл в вагинальном содержимом полуколичественным методом: $<10^3$, $10^3$-$10^5$ и $>10^5$ КОЕ/мл (норма). Было выявлено 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 ($r_s$=-0,25). Полученные данные свидетельствуют об отсутствии выраженных антагонистических взаимоотношений между лактобактериями и такими факультативными представителями как кандидами и энтерококками на уровне вагинального биотопа. Однако, стоит отметить, что ряд авторов указывает на способность лактобактерий подавлять рост кандид [71, 124, 205]. Вероятно, данное противоречие можно объяснить принципиальной разницей в проведении экспериментов: в нашем случае оценивалось взаимоотношение микроорганизмов *in vivo*, а в работах других авторов эксперименты проводились *in vitro* [124]. Это еще раз подчеркивает тот факт, что отношения в микробиоценозе достаточно сложны и на их развитие влияют не только многовекторные взаимоотношения между разными видами микроорганизмов, но и факторы мукозального иммунитета, скорость их секреции, интенсивность клиренса, гормональный фон и пр. [67]. Так, например, существуют исследования, в которых показано, что количество лактобактерий во влагалище здоровых женщин лабильно и зависит от

гормонального статуса женщины и условно-патогенной флоры влагалища [71, 183].

Ранее, в экспериментах *in vitro*, было установлено, что метаболиты энтерококков оказывают негативное влияние на способность кандид к адгезии на эпителиоцитах, обладают фунгистатическим и штамм-зависимым фунгицидным эффектом. 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-я группа - метаболиты энтерококков; 2-я группа - живую чистую культуру энтерококков; 3-я группа - стерильный бульон TSB.

Были получены следующие результаты: в группе животных, которым вводили продукты метаболизма энтерококков, наблюдалась заметная тенденция к снижению количества кандид в вагинальном содержимом. У животных, которым вводилась суспензия живых энтерококков, также наблюдалось некоторое снижение титра *C. albicans*, но данный эффект наступал позже и был менее стабилен. В контрольной группе (в большинстве случаев) титр кандид в вагинальном содержимом не снижался в течение 5-и суток эксперимента. Таким образом, интравагинальное внесение энтерококков или их метаболитов ускоряло клиренс (очищение) вагинальной полости животных от кандид. При этом, более интенсивная элиминация кандид достигалась при инокуляции уже готовых продуктов метаболизма энтерококков, поскольку в данном случае их концентрация была заведомо больше, чем та, которую могут синтезировать бактерии в течение первых часов адаптации к вагинальной полости крыс.

Таким образом, наши эксперименты показали, что энтерококки способны подавлять рост микромицетов и их прикрепление к мукозальным эпителиоцитам, что свидетельствует о выраженных антагонистических взаимоотношениях между бактериями и кандидами. Антимикробная активность энтерококков в отношении *Candida spp*. не является уникальной, поскольку кокки ведут себя достаточно

агрессивно и в отношении других микроорганизмов. Например, известно об антагонистической активности метаболитов энтерококков в отношении стафилококков, пиогенного стрептококка, клостридий и листерий [20]. В последнее время за рубежом также стали появляться работы по исследованию антикандидозного эффекта секреторных продуктов энтерококков. Так, в статье C. E. Graham и соавт. (2017) рассматривается антифунгальный эффект бактериоцина EntV, который ингибирует образование гифальный формы, формирование биопленок и подавляет вирулентность *C. albicans.*

Хотя наши исследования и показали отсутствие существенного цитопатического действия метаболитов энтерококков на мукозальные эпителиоциты, следует помнить о патогенном потенциале *Enterococcus spp*. и их заметной роли в возникновении оппортунистических инфекций мочевого тракта и инфекционного эндокардита [210, 223]. Поэтому, применение энтерококков в качестве антагонистов кандид *in vivo* требует тщательного отбора штаммов, обладающих низкой вирулентностью.

С другой стороны, авирулентность штамма не всегда коррелирует с разными формами антифунгальной активности. Так, пробиотический *E. faecium* L3 в наших экспериментах хорошо подавлял адгезию кандид на эпителиоцитах, но, в то же время, показывал не самый сильный фунгицидный эффект, по сравнению с другими штаммами энтерококков. Это наводит на мысль о том, что, возможно, «золотой серединой» в вопросе использования антикандидозных свойств энтерококков на уровне вагинального и орального биотопа будет применение не живых бактерий, а продуктов метаболизма тех штаммов, которые обладают наиболее широким спектром бактериоцинов и ферментов.

# 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 отношение кандид разных видов.

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

3. Метаболиты *E. faecalis* и *E. faecium* 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 СОКРАЩЕНИЙ

ДДС - додецилсульфат натрия

ЗФР - забуференный физиологический раствор

КОЕ - колониеобразующая 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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. Азимова, В.Т. Эндогенные антимикробные пептиды человека [Электронный ресурс] / В.Т. Азимова, Н.И. Потатуркина-Нестерова, А.С. Нестеров // Современные проблемы науки и образования: электронный науч. журн. – 2015. – № 1-1. – Режим доступа: URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=17746 [11.07.2016].
2. Аполихина, И. А. Роль ацидофильных лактобактерий в противорецидивной терапии бактериального вагиноза и вульво-вагинального кандидоза: восстановление нормоценоза влагалища / И. А. Аполихина, Г.Ф. Гасанова, Е.Г. Додова, Е. А. Горбунова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2015. – Т. 14. - № 1. – С. 5-10.
3. Байракова, А.Л. Роль клеточных Toll-подобных рецепторов в формировании колонизационной резистентности урогенитального тракта при хламидиозе: автореф. дисс.... канд. биол. наук: 03.02.03 / А. Л. Байракова – Москва, 2009. – 25 с.
4. Блинкова, Л. П. Молекулярные основы продукции и действия бактериоцинов / Л. П. Блинкова, М. Л. Альтшулер, Е.С. Дорофеева, О. Б. Горобец // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. - № 2. – С. 97–104.
5. Бондаренко, В. М. «Острова» патогенности бактерий / В.М. Бондаренко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2001. – № 4. – С. 67–74.
6. Бондаренко, В. М. Роль Toll-подобных рецепторов в реализации терапевтического эффекта / В.М. Бондаренко, В.Г. Лиходеев // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. – № 3. – С. 78-82.
7. Бондаренко, В. М. Ранние этапы развития инфекционного процесса и двойственная роль нормальной микрофлоры / В.М. Бондаренко, В.Г. Петровская // Вестник РАМН. – 1997. – № 3. – С. 7-10.

8. Бондаренко, В.М. Симбиотические энтерококки и проблема энтерококковой оппортунистической инфекции / В.М. Бондаренко, А.Н. Суворов – М., 2007. – 30 с.
9. Бондаренко, К.Р. Особенности влагалищной микроэкосистемы в период гестации (обзор литературы) / К.Р. Бондаренко, Л.А. Озолиня, В.М. Бондаренко, В. О. Шпирко // Вестник РГМУ. – 2014. – № 4. – С. 6-11.
10. Буданов, П.В. Новое в терапии нарушений микроценоза влагалища / П.В. Буданов, М.А. Стрижакова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2006. – Т. 5. – № 1. – С.104-108.
11. Валышев, А.В. Антимикробные соединения энтерококков / А. В. Валышев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – № 5. – С. 119-126.
12. Величко, Е.В. Условия и факторы адгезии грибов *Candida* к эпителиоцитам слизистых оболочек / Е.В. Величко // Гинекология. – 2003. – Т. 5. – № 5. – С. 20-22.
13. Габриелян, Н.И. Энтерококки как возбудители послеоперационных инфекционных осложнений / Н.И. Габриелян, Е.М. Горская, Т.С. Спирина, Т.Б. Преображенская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. - № 4. – С. 50-53.
14. Ганковская, Л.В. Изменение уровня экспрессии сигнальных рецепторов врожденного иммунитета при инфекции, вызванной *Candida albicans in vitro* и *in vivo* / Л.В. Ганковская, В.В. Зверев, Л.П. Блинкова, В.Ф. Лавров, О.А. Ганковская, П.А. Кузнецов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – № 3. – С. 60-63.
15. Глембоцкая, Т. Г. Востребованность нового лекарственного препарата в форме вагинальных суппозиториев. Биофармацевтические исследования суппозиториев для лечения вагинального кандидоза / Т.Г. Глембоцкая, И.В. Филатова, О.В. Козуб // Фармация. – 2010. – № 2. – С. 31-33.
16. Гончар, Н.В. Пробиотические штаммы энтерококков как средства терапии и профилактики заболеваний кишечника у детей (обзор литературы) / Н.В.

Гончар, Л.А. Алехина, А.Н. Суворов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2013. - № 1. – С. 74 – 78.

17. Донгак, Д.А. Частота выделения и лекарственная резистентность грибов рода *Candida* от больных ВИЧ-инфицией в Иркутске / Д.А. Донгак, О.Г. Карноухова, Г.Ю. Коган, Л.А. Распопина, А.Д. Ботвинкин // Сибирский медицинский журнал. – 2013. – № 5. – С. 57-59.
18. Еланкова, Н. Н. Новый жидкий пробиотик «LL-комплекс», его эффекты, клиническое применение у пациенток с воспалительными заболеваниями органов малого таза / Н. Н. Еланкова // Медицинский альманах. – 2011. – № 4. – С. 138-142.
19. Елинов, Н.П. Новое в таксономии *Candida species* (лекция) / Н. П. Елинов // Проблемы медицинской микологии. – 2010. - Т. 12. – № 3. – С. 3-9.
20. Ермоленко, Е.И. Бактериоцины энтерококков: проблемы и перспективы. Обзор литературы. / Е. И. Ермоленко // Вестник С.-Петерб. ун-та. Сер. 11, Медицина. - 2009. - № 3. – С. 184-201.
21. Ермоленко, Е. И. Взаимодействие *Candida albicans* и *Lactobacillus plantarum* in vitro / Е. И. Ермоленко, С. Х. Ждан-Пушкина, А.Н. Суворов // Проблемы медицинской микологии. – 2004. – Т. 3. – № 3. – С. 43-45.
22. Ермоленко, Е.И. Влияние пробиотических лактобацилл и энтерококков на микробиоту кишечника и иммунную систему крыс с дисбиозом / Е. И. Ермоленко, Е. А. Тарасова, А. М. Иванова, А. В. Елисеев, А. Н. Суворов // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. – 2013. – № 2. – С. 185-194.
23. Ермоленко, Е.И. Антагонистическая активность энтерококков в отношении *Streptococcus pyogenes* / Е. И. Ермоленко, А.Ю. Черныш, М.Н. Берлов А.А. Тотолян, А.Н. Суворов // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. – 2008. – № 3. – С. 137-144.
24. Занько, С.Н. Вагинальный кандидоз / С. Н. Занько // Охрана материнства и детства. – 2006. – № 1 (7). – С. 64-71.

25. Заславская, М. И. Взаимодействие *Candida albicans* с нейтрофилами и эпителиоцитами в экспериментальных системах: автореф. дисс. … док. биол. наук.: 03.02.03 / М. И. Заславская – Москва, 2009. – 46 с.
26. Захаренко, С.М. Антибиотики и пробиотики: конкуренты или синергисты? / С.М. Захаренко // Русский медицинский журнал. – 2013. – Т.21. - № 13. – С. 705-708.
27. Зеленова, Е.Г. Кандиды: экология, морфофункциональные особенности и факторы патогенности / Е. Г. Зеленова, М. И. Заславская, Т. В. Махрова // Нижегородский медицинский журнал. – 2002. – № 1. – С. 73-84.
28. Зеленова, Е.Г. Микрофлора ротовой полости: норма и патология. / Е.Г. Зеленова, М.И. Заславская, Е.В. Салина, С.П. Рассанов // Учебное пособие Лекции для студентов стоматологического факультета. // Нижний Новгород: НГМА, 2004. – 158 с.
29. Иванова, Л. В. Резистентность грибов-патогенов к антимикотикам (обзор) / Л. В. Иванова, Е.П. Баранцевич, Е.В.Шляхто // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т.13. - № 1. – С. 14-17.
30. Капустина, О.А. Факторы патогенности грибов рода *Candida* и возможность их регуляции эфирными маслами [Электронный ресурс] / О. А. Капустина, О.Л. Карташова // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). – 2013. – № 1. – С. 3. – Режим доступа: https://elibrary.ru/title_about.asp?id=38960.
31. Капустина, О.А. Видовой состав и биологические свойства грибов рода *Candida*, выделенных из разных биотопов тела человека / О.А. Капустина, Л.Е. Логачева, О.Л. Карташова // Известия государственного аграрного университета. – 2009. – Т.4. – № 24-1. – С. 179-181.
32. Катунина, О. Р. Функции Toll-подобных рецепторов как компонента врожденного иммунитета и их участие в патогенезе дерматозов различной этиологии / О. Р. Катунина // Vestn. Dermatol. Venerol. – 2011. – № 2. – С. 18-25.

33. Качалина, Т.С. Новый пробиотик в комплексной терапии воспалительных заболеваний органов малого таза, осложненных кандидозом / Т.С. Качалина, К.Я. Соколова, Н.Н. Еланкова // Медицинский альманах. – 2008. – № 4. – С. 121-123.
34. Кетлинский, С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – Спб: ООО «Издательство Фолиант», 2008. – 550с.
35. Колычев, Н.М. Моделирование инфекционного процесса, вызываемого *E. faecalis*, в эксперименте / Н. М. Колычев, М. И. Петрова, С.И. Мозговой // Достижения науки и техники АПК. – 2009. - № 3. – С. 40-42.
36. Копыльцова, Е.А. Миелодиспластические заболевания у детей: варианты клинического течения и биологические особенности кроветворения. Часть 2. Анализ клеточных популяций костного мозга в диагностике методом проточной цитометрии при миелодиспласических заболеваниях у детей / Е.А. Копыльцова, Е.Л. Семикина, Н.А. Торубарова, Р.Ф. Тепаев, Е.Н. Мазитова, А.В. Мигали, О.Ю. Филина // Гематология и трансфузия. – 2005. – № 1. – С. 3-6.
37. Кравцов, Э.Г. Влияние женских половых гормонов на адгезию дрожжеподобных грибов *Candida albicans* к буккальному эпителию / Э.Г.Кравцов, И.В. Анохина, Я.А. Рыбас, Н.П. Сачивкина, А.В. Ермолаев, С.Б. Бродская // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – № 2. – С. 211-213.
38. Красная, Ю. В. Значение бактерий рода *Enterococcus* в жизнедеятельности человека / Ю. В. Красная, А. С. Нестеров, Н. И. Потатуркина - Нестерова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. - № 6. – С. 1169.
39. Кремлева, Е.А. Эпителиально-бактериальные взаимодействия как основа формирования микробиоценоза / Е.А. Кремлева, С.В. Черкасов, О.В. Бухарин // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. - 2012. - № 6. - С. 89-95.
40. Кривцова, Д.Д. Лечебно-профилактический гель для наружного применения Додерляйн против кандидозов на основе препарата Балис / Д. Д. Кривцова, С.

Н. Суслина, А. С. Васильев // Вестник РУДН. Серия Медицина. – 2013. - № 3. – С. 84-88.

41. Крупейченко, В.В. Этиопатогенез вульвовагинального кандидоза у беременных / В.В. Крупейченко // Проблемы здоровья и экологии. – 2009. – № 1 (19). – С. 89-93.
42. Крупейченко, В. В. Микрофлора влагалища у беременных больных вульвовагинальным кандидозом / В. В. Крупейченко, Е. И. Барановская // Охрана материнства и детства. - 2009. - № 2 (14) - С. 93-95.
43. Кунцевич, Л. Д. Возбудители генитального кандидоза у женщин и их чувствительность к антимикотикам / Л. Д. Кунцевич, Е.В. Шибаева, В.Р. Мишанов, Н.Ю. Воронова, Е.В. Никифорова // Вестник дерматологии и венерологии. – 2009. - № 4. – С. 45-48.
44. Лахтин, В. М. Модулирование биопленок микробными потенциальными консорциумами человека: концепция расширенного пробиотического компартмента биотопа, прогностические паттерны / В. М. Лахтин, А. Л. Байракова, М.В. Лахтин, А.В. Алешкин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАМН. – 2013. - № 2 (90). – С. 120-123.
45. Лебедева, О. П. Влияние гормональной контрацептивы на микрофлору влагалища / О.П. Лебедева, П. В. Калуцкий // Лечебное дело. – 2006. – № 2. - С. 44-47.
46. Лебедева, О. П. Врожденный иммунитет женских половых путей и его гормональная регуляция (мини-обзор) / О. П. Лебедева, П. В. Калуцкий, С. П. Пахомов, М. И. Чурносов, П.А. Карпов // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2009. – Т. 67. - № 8. – С. 25-30.
47. Лебедева, О. П. Толл–подобные рецепторы женского репродуктивного тракта и их лиганды / О. П. Лебедева, П.В. Калуцкий, С.П. Пахомов, М.И. Чурносов, П.А. Карпов, Н.И. Самборская // Научные ведомости

Белгородского государственного университета. Серия: Медицина, фармация. – 2010. – Т. 12. - № 22. – С. 31-35.

48. Лебедева, О. П. Антимикробные пептиды – первая линия антиинфекционной защиты женских половых путей / О.П. Лебедева, Н.А. Рудых, И.С. Полякова, С.П. Пахомов, М.И. Чурносов, Н.И. Самборская // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2010. – Т. 93. - № 22. – С. 25-30.
49. Лебедева, О. П. Роль Толл-подобных рецепторов в патогенезе послеродового эндометрита / О.П. Лебедева, Н.И. Самборская, С.П. Пахомов, М.И. Чурносов, В.Н. Попов, П.В. Калуцкий, О.Н. Ивашова, Н.А. Рудых, И.Н. Полякова // Акушерство и гинекология. – 2012. - № 1. – С. 55-59.
50. Лебедева, Т. Н. Иммунитет при кандидозе (обзор) / Т.Н. Лебедева // Проблемы медицинской микологии. – 2004. – Т. 6. - № 4. – С.8-16.
51. Лесовой, В. С. Микозы центральной нервной системы / В. С. Лесовой, А.В. Липницкий // Проблемы медицинской микологии. – 2008. – Т. 10. - № 1. – С. 3-7.
52. Лесовой, В. С. Кандидоз ротовой полости (обзор) / В.С. Лесовой, А.В. Липницкий, О.М. Очкурова // Проблемы медицинской микологии. - 2003. – Т. 5. - № 1. - С. 3-7.
53. Лисовская, С. А. Взаимодействие *Candida albicans* и бактерий-ассоциантов при кандидозах различной локализации / С. А. Лисовская, Е. В. Халдеева, Н. И. Глушко // Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т. 15. - № 2. – С. 40-44.
54. Лисовская, С. А. Оценка способности к формированию биопленок клиническими штаммами *Candida albicans*, выделенными при острых и хронических формах кандидоза кожи и слизистых оболочек / С. А. Лисовская, Е. В. Халдеева, Н. И. Глушко, В. Р. Паршаков // Проблемы медицинской микологии. – 2017. – Т. 19. - № 1. – С. 31-33.
55. Лукова, О. А. Факторы и условия, регулирующие функциональную активность буккальных эпителиоцитов и их взаимодействие с *Candida*

*albicans*: автореф. дисс. … канд. биол. наук: 03.03.01, 03.02.03. / О. А. Лукова– Москва, 2015. – 26 с.

56. 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.
57. Макаров, И. О. Вагинальный кандидоз. Возможности лекарственной терапии / И. О. Макаров, Н. А. Шешукова // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2012. – Т. 6. - № 1. – С. 16-19.
58. Марцинковская, И. В. Изучение антибактериального действия пробиотических энтерококков in vivo / И. В. Марцинковская, Е. И. Ермоленко, С. Б. Гончаров, В.А. Кузьмин, А. Н. Суворов // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. – 2006. - № 3. – С. 15-17.
59. Махрова, Т. В. Факторы и условия, влияющие на адгезивную активность *Candida albicans* в системах с буккальными эпителиоцитами: автореф.дис. …канд.мед.наук / Т.В. Махрова – Челябинск, 2004. – 24 с.
60. Махрова, Т. В. Влияние метаболитов стафилококка на адгезивные реакции в системе "*Candida albicans* - буккальные эпителиоциты" / Т.В. Махрова, М.И. Заславская, А.Н. Маянский // Журнал микробиология. – 2004. – № 5. – С. 4-7.
61. Махрова, Т. В. Некоторые механизмы антиадгезивного эффекта секрета ротовой полости в системе «*Candida albicans* – буккальные эпителиоциты» / Т.В. Махрова, А.Н. Маянский, М.И. Заславская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. - № 2. – С. 11-14.
62. Маянский, А. Н. Патогенетическая микробиология: руководство / А.Н. Маянский.- Н. Новгород: НГМА, 2006. - 520 с.
63. Маянский, А. Н. Цитокины и медиаторные функции уроэпителия в воспалительных реакциях мочевыводящей системы /А. Н. Маянский // Цитокины и воспаление. – 2003. – Т. 2. - № 4. – С. 1-9.

64. Маянский, А. Н. Адгезивные реакции буккальных эпителиоцитов в индикации нарушений местного и общего гомеостаза / А.Н. Маянский, М.И Заславская, Е.В. Салина, Ю.Ю. Строгова, С.П. Рассанов, Э.Ф. Малышева // Нижегородский медицинский журнал. – 2005. – № 1. – С. 158-161.
65. Маянский, А.Н. Адгезивные реакции в системе "буккальные эпителиоциты *Candida albicans*" у детей с бронхиальной астмой и гастродуоденитом / А.Н.Маянский, Е.В. Салина, М.А. Абаджиди, В.И Ашкинази, М.И. Заславская // Педиатрия. – 2002. - № 3. - С. 41 - 43.
66. Маянский, Д. Н. Лекции по клинической патологии: рук. для врачей / Д.Н. Маянский. - М.: ГЭОТАР-медиа, 2008. - 464 с.
67. Межидова, М.К. Микробиоценоз влагалища и факторы, влияющие на его состояние / М. К. Меджидова, З.С. Зайдиева, А.А. Вересова // Медицинский совет. – 2013. - № 3-2. – С. 118-125.
68. Миронова, А.В. Факторы вирулентности энтерококков (обзор литературы) / А.В. Миронова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2015. - № 4-1. – С. 67-70.
69. Миронова, А.В. Факторы вирулентности энтерококков / А.В. Миронова, О.А. Коршукова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2015. – Т. 60. - № 2. – С. 73-78.
70. Москалёв, А.В. Общая иммунология с основами клинической иммунологии: учебное пособие / А.В. Москалёв. В.В. Сбойчаков, А.С. Рудой. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 352 с.
71. Мусаева, З.М. Микробиоценоз влагалища и его коррекция / З. М. Мусаева // Проблемы женского здоровья. – 2008. – Т. 3. - № 3. – С. 43-53.
72. Приказ Минздрава СССР № 535 от 22 апреля 1985 г. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений.
73. Ордиянц, И. М. Микозы – нерешенная проблема репродуктивной инфектологии. На путях поиска ответов на глобальные вопросы. / И.М.

Ордиянц, О.С. Побединская, Р. Коннон, Э.А. Алиева // Мать и Дитя в Кузбассе. – 2015. - № 1 (60). – С. 14 – 20.

74. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямся: В 2 т. - М.: Мир, 1997. – Т. 2. – 368 с.

75. Панченко, А. Д. Современные представления о патогенезе и иммунологических механизмах грибковой инфекции полости рта / А. Д. Панченко, Н. В. Булкина // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 2-2. – С. 426-429.

76. Пегушина, О. Г. Оценка антагонистической активности клинических изолятов отделения реанимации / О.Г. Пегушина, Ю.Н. Маслов, И.В. Фельдблюм, М.П. Калипарова, Е.П. Кайнова // Дезинфекционное дело. – 2016. - № 1(95). – С. 18-22.

77. Пестрикова, Т. Ю. Рецидивирующий вагинальный кандидоз / Т. Ю. Пестрикова, Н.И. Безрукова, Е. А. Юрасова // Акушерство и гинекология. – 2005. – № 3. – С. 41-42.

78. Пикуза, В. Флуконазол у беременных женщин с вагинальным кандидозом / В. Пикуза, Р. Чилова, А Ищенко, Н. Семенов // Врач. – 2008. – № 10. – С. 84-88.

79. Пинегина, О. Н. Определение чувствительности к антимикотикам *Candida spp.* в составе биопленок / О. Н. Пинегина, Н.В. Васильева // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т.16. – № 4. – С. 46-48.

80. Полякова, О. П. Буккальный эпителий. Новый подходы к молекулярной диагностике социально значимй патологии / В.О. Полякова, Е.М. Пальцева, В.А. Крулевский // Сбп. «Н-Л». – 2015. – 128 с.

81. Попова, А. Л. Современные аспекты лечения и профилактики вульвовагинального кандидоза (обзор литературы) / А.Л. Попова, С.А. Дворянский, Н.В. Яговкина // Вятский медицинский вестник. – 2013. – № 4. – С. 31-36.

82. Пошвина, Д. В. Образование биопленок клиническими изолятами энтерококков / Д.В. Пошвина // Известия Оренбургского Государственного аграрного университета. – 2015. - № 1 (51). – С. 75-76.

83. Прилепская, В.Н. Вагинальная микоэкосистема влагалища в норме и при патологии / В. Н. Прилепская, Г. Р. Байрамова, А. С. Анкирская // Гинекология. – 2009. – Том. 11. - № 3. – С. 9-11.
84. Пустотина, О. А. Современный подход к этиологии, патогенезу, лечению и профилактике бактериального вагиноза и вагинального кандидоза / О. А. Пустотина // Гинекология. - 2015. - Т. 17. - № 3. – С. 79-82.
85. Рамазанова, Б.А. Антилизоцимная активность грибов рода *Candida* как один из факторов патогенности / Б.А. Рамазанова, Д.Ж. Батырбаева, К.А. Бекболатова, Ш.Е. Угышова, А.А. Мусаева // Успехи медицинской микологии. – 2013. – Т.11. – С. 52-54.
86. Рищук, С.В. Эндогенная микробиота влагалища и ее регуляция [Электронный ресурс] / С.В. Рищук, О.Е. Пунченко, А.А. Малышева // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал) – 2013. - № 4. – 9 с. – Режим доступа: https://elibrary.ru/item.asp?id=24163736.
87. Самодова, А. В. Роль шеддинга в активности иммунокомпетентных клеток с реагиновым механизмом защиты / А. В. Самодова, Л. К. Добродеева // Физиология человека. – 2012. - Т. 38. - № 4. – С. 438-443.
88. Биохимия: учебник / под ред. Е. С. Северина. - 5-е изд., испр. и доп. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 784с.
89. Селиверстова, М.С. Распознавание возбудителей инфекций, передаваемых половым путем, через систему сигнальных рецепторов / М.С. Селиверстова, Т.К. Тарасова, О.П. Лебедева, С.П. Пахомов, М.И. Чурносов // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – Т. 18. – №10 (129). – С. 12-18.
90. Сергеев, А. Ю. Вагинальный кандидоз: этиология, эпидемиология, патогенез / А. Ю. Сергеев, О.Л. Иванов, А.В. Караулов, В.Е. Маликов, Ю.В. Сергеев, Н.Е. Жарикова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2000. - № 2. – С. 99-106.

91. Сергеев, А.Ю. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев - М.: «Триада-Х», 2001. – 472 с.
92. Сергеев, А.Ю. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. 2 изд. / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев - М.: БИНОМ, 2008.- 480 с.
93. Соловьева, И.В. Биологические свойства лактобацилл. Перспективы использования в лабораториях роспотребнадзора экспресс- методов амплификации нуклеиновых кислот при контроле качества пищевых продуктов, бад к пище, лекарственных форм, содержащих лактобациллы / И.В. Соловьева, А.Г. Точилина, И.В. Белова, Н.А. Новикова, Т.П. Иванова // Журнал Медиаль. – 2014. - № 2(12). – С. 29-44.
94. Сорокина, Е.В. Toll-подобные рецепторы и первичное распознавание патогена при дерматозах инфекционной и неинфекционной этиологии / Е. В. Сорокина // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. - № 2. – С. 6-15.
95. Сотникова, Н.Ю. Иммунная система слизистых и микрофлора / Н.Ю. Сотникова // Российский иммунологический журнал. – 2009. – Т. 3. – № 2. – С. 111-120.
96. Страчунский, Л.С. Современная антимикробная химиотерапия. / Л.С. Страчунский, С.Н. Козлов. – Изд.: «Медицинское информационное агентство», 2009. – 448 с.
97. Сырцова, М.А. Применение различных флуоресцентных красителей для окраски ядер клеток в фиксированном биологическом материале / М.А. Сырцова, Е.А Колос, В.А. Снегова, В.В. Гусельникова // Медицинский академический журнал. – 2014. – Т. 14. – № 2. – С. 34-39.
98. Сычёва, М. В. Скрининг антагонистической активности и детерминант вирулентности у фекальных штаммов энтерококков / М. В. Сычева, И. В. Валышева // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2012. - Т. 4. - № 36-1. – С. 236-239.

99. Тюрин, Ю.А. Природная устойчивость бактерий к факторам врожденной иммунной системы, обусловленная бактериальными протеазами / Ю.А. Тюрин, И.Г. Мустафин, Р.С. Фассахов // Клиническая микробиология и антимикробная терапия. – 2010. - № 40. – С. 7-13.
100. Тютюнник, В.Л. Вагинальний кандидоз и беременность / В.Л. Тютюнник, Н.В. Орджоникидзе // Русский медицинский журнал. – 2001.— Т. 9. - № 19.– С. 34-37.
101. Тютюнник, В.Л. Современные принципы диагностики и терапии вульвовагинального кандидоза / В.Л. Тютюнник, Т.Э. Карапетян, А.А. Балушкина // Российский медицинский журнал. – 2010. – Т. 18. - № 19. – С. 1186 – 1190.
102. Фролова, Д.Д. Гигиенический гель для профилактики и комплексного лечения рецидивирующего вагинального кандидоза / Д.Д. Фролова, С.Н. Суслина, Е.А. Васильева // Успехи медицинской микологии. – 2014. – Т. 13. – С. 2016-2019.
103. Хаитов, Р.М. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: рукводство для врачей / Р.М Хаитов, Б.В. Пинегин, А.А. Ярилин // М.: ГЭОТАР. Медиа., 2009. – 352 с.
104. Хайдуков, С.В. Возможности проточной цитофлюориметрии в диагностике инфекционных заболеваний. Часть 1 / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка // Инфекция и иммунитет. – 2011. – Т. 1. - № 1. – С. 59-66.
105. Цизина, Е. А. Нормоценоз влагалища и его влияние на здоровье женщин / Е. А. Цизина, Н. А. Ильина // Молодой ученый. – 2011. – Т. 2. – № 8. – С. 152-156.
106. Шабашова, Н.В. Местный иммунитет и микробиота ротовой полости (обзор) / Н.В. Шабашова, Е.Ю. Данилова // Проблемы медицинской микологии. – 2015. – Т. 17. – № 4. – С. 4-13.
107. Шендеров, Б.А. Метабиотики: вчера, сегодня, завтра / Б.А. Шендеров, А. В. Синица, М. М. Захарченко // СПб.: ИнформМед, 2017. – 80 с.

108. Щепитова, Н. Е. Биологические свойства фекальных изолятов энтерококков, выделенных от животных: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 06.02.02 / Н.Е. Щепитова – Оренбург, 2015. – 23 с.
109. Щепитова, Н.Е. Скрининг штаммов энтерококков с целью разработки на их основе препаратов-пробиотиков / Н. Е. Щепитова, М. В. Сычёва, О.Л. Карташова // Вестник Оренбургского Государственного университета. – 2015. - № 13 (188). – С. 226-233.
110. Ярилин, А. А. Основы иммунологии / А.А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 749 с.
111. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization [Электронный ресурс] / World Health Organization – Geneva, 2014. – 257 p. - Режим доступа http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en.
112. Arendrup, M. C. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida* / M. C. Arendrup // Clin. Microbiol. Infect. – 2014. – Vol. 6. – P. 42-48.
113. Bahri, R. Normal Human Gingival Epithelial Cells Sense *C. parapsilosis* by Toll-Like Receptors and Module Its Pathogenesis through Antimicrobial Peptides and Proinflammatory Cytokines [Электронный ресурс] / R. Bahri, S. Curt, D. Saidane-Mosbahi, M. Rouabhia // Mediators Inflamm. – doi:10.1155/2010/940383. – 2010. – Режим доступа https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
114. Bals, R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection / R. Bals // Respir. Res. – 2000. – Vol. 1(3). – P. 141-150.
115. Behzadi, E. The role of toll-like receptors (TLRs) in urinary tract infections (UTIs) / E. Behzadi, P. Behzadi // Cent. European. J. Urol. – 2016. – Vol. 69(4). – P. 404-410.
116. Bendel, C. M. Distinct mechanisms of epithelial adhesion for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Identification of the participating ligands and development of inhibitory peptides / C. M. Bendel, M. K. Hostetter // J. Clin. Invest. – 1993. – Vol. 92(4). – P. 1840 -1849.

117. Botos, I. The structural biology of Toll-like receptors / I. Botos, D. M. Segal, D.R. Davis // Structure. – 2011. – Vol. 19(4). – P. 447-59.
118. Cakirlar, F.K. The epidemiological and molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci isolated from rectal swab samples of hospitalized patients in Turkey / F.K. Cakirlar, M. Samasti, I. Baris, H. Kavakli, A. Karakullukcu, S. Sirekbasan, Y. Bagdatli // Clin. Lab. – 2014. – Vol. 60 (11). – P. 1807-1812.
119. Calderone, R.A. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans* / R. A. Calderone, P.C. Braun // Microbiol Rev. – 1991. – Vol. 55 (1). – P. 1-20.
120. Cannon, R.D. Oral colonization by *Candida albicans* / R. D. Cannon, W. L. Chaffin // Crit. Rev. Oral. Biol. – 1999. – Vol. 10. – № 3. – P. 359-383.
121. Cannon, R.D. Oral candida: clearance, colonization, or candidiasis? / R.D. Cannon, A.R. Holmes, A.B. Mason, B.C. Monk // J. Dent. Res. – 1995. – Vol. 74. – № 5. – P. 1152–1161.
122. Chandler, J.R. Specific control of endogenous cCF10 pheromone by a conserved domain of the pCF10-encoded regulatory protein PrgY in *Enterococcus faecalis* / J. R. Chandler, A.R. Flynn, E. M. Bryan, G. M. Dunny // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187(14). – P. 4830-4843.
123. Cheng, G. Comparison between Candida albicans agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis / G. Cheng, K. Wozniak, M. A. Wallig, P. L. Fidel, Jr., S. R. Trupin, L. L. Hoyer // Infect. Immun. – 2005. – Vol. 73. – P. 1656–1663.
124. Coman, M. M. In vitro evaluation on HeLa cells of protective mechanisms of probiotic lactobacilli against Candida clinical isolates / M. M. Coman, M.C. Verdenelli, C. Cecchini, S. Silvi, C. Orpianesi, M. Caspani, F. Mondello, A. Cresci. // J. Appl. Microbiol. – 2015. – Vol. 119 (5) – P. 1383-1390.
125. Conti, H. R. IL-17-Mediated Immunity to the Opportunistic Fungal Pathogen *Candida albicans* / H. R. Conti, S. L. Gaffen // J. Immunol. – 2015. – Vol. 195. – № 3. – P. 780-788.

126. Coque, T.M. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons / T. M. Coque, J. E. Patterson, J. M. Steckelberg, B. E. Murray // J. Infect. Dis. – 1995. – Vol. 171(5). – P. 1223-1229.
127. De Bernardis, F. Studies of Immune Responses in *Candida vaginitis* // F. De Bernardis, S. Arancia, S. Sandini, S. Graziani, S.O. Norelli // Pathogens. – 2015. – Vol. 4 (4). – P. 697-707.
128. De Vuyst, L. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications / L. De Vuyst, F. Leroy // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 13(4). – P. 194-199.
129. Eberhard, J. Leucotriene A (4)-hydrolase expression and leucotriene B(4) levels in chronic inflammation of bacterial origin: immunohistochemistry and reverse-phase high-performance liquid chromatography analysis of oral mucosal epithelium / J. Eberhard, S. Jepsen, M. Tiemann, R. Krause, Y. Açil, H.K. Albers // Virchows Arch. – 2002. – Vol. 440. – P. 627-634.
130. Ellmerich, S. Production of cytokines by monocytes, epithelial and endothelial cells activated by *Streptococcus bovis* / S. Ellmerich, N. Djouder, M. Scholler // Cytokine. – 2000. –Vol. 12. – P. 26-31.
131. El-Maghrabi, E.A. Characterization of *Candida albicans* epidermolytic proteases and their role in yeast-cell adherence to keratinocytes / E. A. El-Maghrbi, D.M. Dixon, J.W. Burnett // Clin. Exp. Dermatol. – 1990. - Vol. 15(3). – P. 183-191.
132. Falagas, M. E. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review / M. E. Falagas, G. L. Betsi, S. Athanasiou // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – Vol. 58 (2). – P. 266-272.
133. Farmer, I. Expression of adhesion and activation molecules in human buccal spithelial cell lines and normal human buccal epithelium *in situ* / I. Farmer, J. Freysdottir, A. Dalghous // J.Oral. Pathol. Med. – 2001. – Vol. 30. – P. 113-120.

134. Feng, Z. Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by *Candida albicans* / Z. Feng, B. Jiang, J. Chandra, M. Ghannoum, S. Nelson, A. Weinberg // J. Dent. Res. – 2005. – Vol. 84. – № 5. – P. 445-450.
135. Fornari, G. Susceptibility and molecular characterization of *Candida species* from patients with vulvovaginitis / G. Fornari, V. A. Vicente, R. R. Gomes, M. D. Muro, R. L. Pinheiro, C. Ferrari, P. F. Herkert, M. Takimura, N. Sérgio de Carvalho, F. Queiroz-Telles // Braz. J. Microbiol. – 2016. – Vol. 47(2). – P. 373–380.
136. Garcia, M. C. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. [Электронный ресурс] / M. C. Garcia, J. T. Lee, C.B. Ramsook, D. Alsteens, Y. F. Dufrêne, P. N. Lipke // PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – № 3. - doi: 10.1371/journal.pone.0017632 – Режим доступа https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
137. Gilmore, M. S. *Enterococci* From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection / M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, N. Shankar // Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014. – 668 p.
138. Goncalves, B. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors / B. Goncalves, C. Ferreira, C.T. Alves, M. Henriques, J. Azeredo, S. S. Silva // Crit. Rev. Microbiol. – 2016. – Vol. 42(6). – P. 905-927.
139. Graham, C. E. *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans* / C.E. Graham, M.R. Cruz, D.A. Garsin, M.C. Lorenz // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2017. – Vol. 114(17). – P. 4507-4512.
140. Haas, W. Molecular nature of a novel bacterial toxin: the cytolysin of *Enterococcus faecalis* / W. Haas, M. S. Gilmore // Med. Microbiol. Immunol. – 1999. – Vol. 187(4). – P. 183-190.
141. Haas, W. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction / W. Haas, B. D. Shepard, M. S. Gilmore // Nature. – 2002. – Vol. 415(6867). – P. 84-87.

142. Hanson, L. Probiotics for Treatment and Prevention of Urogenital Infections in Women: A Systematic Review / L. Hanson, L. V. Vusse, M. Jerme, C. L. Abad, N. Safdar // J. Midwifery. Womens. Health. – 2016. – Vol. 61(3). – P. 339-355.
143. Hardy, H. Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and Immunopathology / H. Hardy, J. Harris, E. Lyon, J. Beal, A. D. Foey // Nutrients. – 2013. – Vol. 5(6). – P. 1869–1912.
144. Heikens, E. *Enterococcal* surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162 / E. Heikens, M.J. Bonten, R. J. Willems // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189(22). – P. 8233-8240.
145. Hogan, D.A. *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors / D.A. Hogan, R. Kolter // Science. – 2002. – Vol. 21. – P. 2229-2232.
146. Holmes, A.R. *Candida albicans* binding to the oral bacterium *Streptococcus gordonii* involves multiple adhesin-receptor interactions / A. R. Holmes, R. McNab, H.F. Jenkinson // Infect. Immun. – 1996. – Vol. 64. - № 11. – P. 4680-4685.
147. Huyton, T. Toll-like receptors: structural pieces of a curve-shaped puzzle / T. Huyton, J. Rossjohn, M. Wilce // Immunol. Cell Biol. – 2007. – Vol. 85. – P. 406–410.
148. Jaeger, M. Genetic basis for recurrent vulvo-vaginal candidiasis / M. Jaeger, T. S. Plantinga, L. A. Joosten, B. J. Kullberg, M. G. Netea // Curr. Infect. Dis. Rep. – 2013. – Vol. 15(2). – P. 136-142.
149. Jett, B. D. Virulence of enterococci / B. D. Jett, M. M. Huycke, M. S. Gilmore // Clin. Microbiol. Rev. – 1994. – Vol. 7(4). – P. 462-478.
150. Jouault, T. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors / T. Jouault, S. Ibata-Ombetta, O. Takeuchi, P. A. Trinel, P. Sacchetti, P Lefebvre, S. Akira, D. Poulain // J. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 188 (1). – P. 165-172.
151. Kawalec, M. Molecular diversity of a putative virulence factor: purification and characterization of isoforms of an extracellular serine glutamyl endopeptidase of Enterococcus faecalis with different enzymatic activities / M. Kawalec, J. Potempa,

J. L. Moon, J. Travis, B. E. Murray // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187(1). – P. 266-275.

152. Kok, E. T. Resistance to Antibiotics and Antifungal Medicinal Products: Can Complementary and Alternative Medicine Help Solve the Problem in Common Infection Diseases? The Introduction of a Dutch Research Consortium [Электронный ресурс] / E. T. Kok, M. C. Jong, B. Gravendeel, W. B. Van Leeuwen, E. W. Baars // Evid Based Complement Alternat Med. – doi: 10.1155/2015/521584. – 2015. – Режим доступа https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.

153. Kudo, M. Nosocomial infection caused by vancomycin-susceptible multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* over a long period in a university hospital in Japan / M. Kudo, T. Nomura, S. Yomoda, K. Tanimoto, H. Tomita // Microbiol. Immunol. – 2014. – Vol. 58 (11). – P. 607-614.

154. Lai, Y. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense / Y. Lai, R. L. Gallo // Trends Immunol. – 2009. – Vol. 30 (3). – P. 131–141.

155. Langjahr, P. Metalloproteinase-Dependent TLR2 Ectodomain Shedding is Involved in Soluble Toll-Like Receptor 2 (sTLR2) Production [Электронный ресурс] / P. Langjahr, D. Díaz-Jiménez, M. De la Fuente, E. Rubio, D. Golenbock, F. C. Bronfman, R. Quera, M-J González, M. A. H. // PLoS One. - doi: 10.1371/journal.pone.0104624. – 2014. – Vol. 9 (12). - Режим доступа https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

156. Ludwig, W. *Enterococcaceae* fam. nov / W. Ludwig, K.H. Schleifer, W.B. Whitman // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd. Vol. 3) (The Firmicutes) // Springer, New York, 2009. – 549 p.

157. Magliani, W. New immunotherapeutic strategies to control vaginal candidiasis / W. Magliani, S. Conti, F. de Bernardis, A. Cassone, L. Polonelli // Trends Mol. Med. – 2002. – Vol. 8. – P. 121–126.

158. Mayer, F. L. Candida albicans pathogenicity mechanisms / F. L. Mayer, D. Wilson, B. Hube // Virulence. – 2013. – Vol. 4 (2). – P. 119-128.

159. Margaret, K. The iC3b receptor of *Candida albicans* and its Roles in Pathogenesis / K. Margaret, M.D. Hostetter // Vaccine. – 2008. – Vol. 26 (Suppl 8). – P. 1108–1112.
160. Matheson, A. Recurrent vulvovaginal candidiasis: A review of guideline recommendations / A. Matheson, D. Mazza // Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol. – 2017. – Vol. 57 (2). – P. 139-145.
161. Matsubara, V. H. Probiotics as Antifungals in Mucosal Candidiasis / V. H. Matsubara, H. M. H. N. Bandara Marcia, P. A. Mayer, L. P. Samaranayake // Clin. Infect. Dis. – 2016. – Vol. 62 (9). – P. 1143-1153.
162. McCarron, P.A. Bioadhesive non-drug-loaded nanoparticles as modulators of candidal adherence to buccal epithelial cells: a potentially novel prophylaxis for candidosis / P.A. McCarron, R.F. Donnelly, P.E. Canning, J.G. McGovern, D. S. Jones // Biomaterials. – 2004. – Vol. 25. – № 12. – P. 2399-2407.
163. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity / R. Medzhitov // Nat. Rev. Immunol. – 2001. – Vol. 1 (2). – P. 135-145.
164. Mills, B.B. Vaginitis: Beyond the Basics / B.B. Mills // Obstet. Gynecol. Clin. North. Am. – 2017. – Vol. 44 (2). – P. 159-177.
165. Mohamadi, J. Anti-fungal resistance in candida isolated from oral and diaper rash candidiasis in neonates / J. Mohamadi, M. Motaghi, J. Panahi, M. R. Havasian, A. Delpisheh, M. Azizian, I. Pakzad // Bioinformation. – 2014. – Vol. 10(11). – P. 667-670.
166. Moffa, E. B. Histatin 5 inhibits adhesion of *C. albicans* to Reconstructed Human Oral Epithelium [Электронный ресурс] / E. B. Moffa, M. C. Mussi, Y. Xiao, S. S. Garrido, M. A. Machado, E. T. Giampaolo, W. L. Siqueira // Front Microbiol. – doi: 10.3389/fmicb.2015.00885. – 2015. – Режим доступа https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
167. Moyes, D. L. Mucosal Immunity and *Candida albicans* Infection [Электронный ресурс] / D. L. Moyes, J. R. Naglik // Clin. Dev. Immunol. – 2011:346307. doi: 10.1155/2011/346307. – 2011. - Режим доступа https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.

168. Moyes, D. L. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface / D. L. Moyes, J. P Richardson, J. R. Naglik // Virulence. – 2015. – Vol. 6(4). – P. 338–346.
169. Murciano, C. Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions [Электронный ресурс] / C. Murciano, D. L. Moyes, M. Runglall, P. Tobouti, A. Islam, L.L. Hoyer, J. R. Naglik // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – № 3. – Режим доступа https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
170. Naglik, J.R. Epithelial Cell Innate Response to *Candida albicans /* J.R. Naglik, D. Moyes // Adv. Dent. Res. – 2011. – Vol. 23. – № 1. – P. 50–55.
171. Naglik, J.R. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity / J. R. Naglik, D.L. Moyes, B. Wachtler, B. Hube // Microbes Infect. - 2011. – Vol. 13. - P. 963-976.
172. Naglik, J. R. *Candida albicans* pathogenicity and epithelial immunity [Электронный ресурс] / J. R. Naglik, J. P. Richardson, D. L. Moyes, J. Heitman // PLoS Pathog. – Vol. 10 (8). - doi: 10.1371/journal.ppat.1004257. – 2014. – Режим доступа https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
173. Nair, R.G. The effect of oral bacteria on *Candida albicans* germ-tube formation / R. G. Nair, S. Anil, L.P. Samaranayake // APMIS. – 2001. – Vol. 109. - № 2. – P. 147-154.
174. Nair, R.G. The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to human buccal epithelial cells in vitro / R. G. Nair, L.P. Samaranayake // Med. Microbiol. – 1996. – Vol. 45. - № 3. – P. 179-185.
175. Nallapareddy, S. R. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis* / S. R. Nallapareddy, K. V. Singh, J. Sillanpää, D. A. Garsin, M. Höök, S. L. Erlandsen, B. E. Murray // J. Clin. Invest. – 2006. – Vol. 116(10). – P. 2799-2807.
176. Nayak, A. P. Fungal hemolysins / A. P. Nayak, J. B. Green, D. H. Beezhold // Med. Mycol. – 2013. – Vol. 51(1). – P. 1–16.

177. Nes, I. F. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus* / I. F. Nes, D. B. Diep, H. Holo // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189(4). – P. 1189-1198.
178. Nester, E. Microbiology: a human perpective. 6th edition / E. Nester., M. Nester, D. Anderson // McGraw-Hill Science, 2009. – 884 p.
179. Netea, M. G. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors / M. G. Netea, N.A. Gow, C.A. Munro, S. Bates, C. Collins, G. Ferwerda, R.P. Hobson, G. Bertram, H.B. Hughes, T. Jansen, L. Jacobs, E.T. Buurman, K. Gijzen, D.L. Williams, R. Torensma, A. McKinnon, D.M. MacCallum, F.C. Odds, J.W. Van der Meer, A.J. Brown, B.J. Kullberg // J. Clin. Invest. – 2006. – Vol. 116 (6). – P. 1642-1650.
180. Ng, S. M. Antifungal peptides: a potential new class of antifungals for treating vulvovaginal candidiasis caused by fluconazole-resistant *Candida albicans* / S. M. Ng, Y. Y. Yap, J. W. Cheong, F. M. Ng, Q. Y. Lau, T. Barkham, J. W. Teo, J. Hill, C. S. Chia // J. Pept. Sci. – 2017. - P. 215 -221.
181. Nobile, C. J. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease / C. J. Nobile, A. D. Johnson // Annu. Rev. Microbiol. – 2015. – Vol. 69. – P. 71-92.
182. Nucci, M. Emerging Fungal Diseases / M. Nucci, K.A. Marr // Clin. Inf. Dis. – 2005. – Vol. 41. – P. 521–526.
183. Nunn, K. L. Unraveling the Dynamics of the Human Vaginal Microbiome. / K. L., Nunn, L. J. Forney // Yale. J. Biol. Med. – 2016. – Vol. 89 (3). – P. 331-337.
184. O`Sullivan, J.M. Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci in promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface / J.M. O`Sullivan, H.F. Jenkison, R.O. Cannon // Microbiology. – 2000. – Vol. 146. – P. 41-48.
185. Oscáriz, J.C. Classification and mode of faction of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria / J.C. Oscáriz, A. G. Pisabarro // Int. Microbiol. – 2001. – Vol. 4(1). – P. 13-19.

186. Ostrowski-Zeichner, L. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond / L. Ostrowski-Zeichner, A. Casadevall, J.N. Galgiani, F.C. Odds, J.H. Rex // Nat. Rev. Drug Discov. – 2010. – Vol. 9. – P. 719–727.
187. Parham, P. The Immune System (3rd ed.) / P. Parham // Garland Science., 2009. – 530 p.
188. Park, S. Y. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human / S. Y. Park, K. M. Kim, J. H. Lee, S. J. Seo, I. H. Lee // Infect. Immun. – 2007. – Vol. 75 (4). – P. 1861-1869.
189. Parolin, C. Isolation of Vaginal *Lactobacilli* and Characterization of Anti-*Candida* Activity [Электронный ресурс] / C. Parolin, A. Marangoni, L. Laghi, C. Foschi, R.A. Ñahui Palomino, N. Calonghi, R. Cevenini, B. Vitali // PLoS One. - doi: 10.1371/journal.pone.0131220. – 2015. – Vol. 10(6). – Режим доступа https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
190. Peleg, A.Y. Medically important bacterial–fungal interactions / A.Y. Peleg, D.A. Hogan, E. Mylonakis // Nature Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 8. - № 5. – P. 340-349.
191. Pivarcsi, A. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes / A. Pivarcsi, L. Bodai, B. Réthi, A. Kenderessy-Szabó, A. Koreck, M. Széll, Z. Beer, Z. Bata-Csörgoo, M. Magócsi, E. Rajnavölgyi, A. Dobozy, L. Kemény // Int. Immunol. – 2003. – Vol. 15(6). – P. 721-730.
192. Promsudthi, A. The role of Toll-like receptor 2 and 4 in gingival tissues of chronic periodontitis subjects with type 2 diabetes / A. Promsudthi, S. Poomsawat, W. Limsricharoen // J. Periodontal Res. – 2014. – Vol. 49. – P. 346–354.
193. Rachmilewitz, D. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis / D. Rachmilewitz, K. Katakura, F. Karmeli, T. Hayashi, C. Reinus, B. Rudensky, S. Akira, K. Takeda, J. Lee, K. Takabayashi, E. Raz // Gastroenterology. – 2004. – Vol. 126 (2). – P. 520-528.
194. Ramage, G. Fungal biofilm resistance / G. Ramage, R. Rajendran, L. Sherry, C. Williams // Int. J. of Microbiol. – 2012. – Vol. 2012. – 14 p.

195. Rezvani, G. Oral manifestations of allograft recipients before and after renal transplantation / G. Rezvani, M. Davarmanesh, M. R. Azar, M. Salehipour, R. Sedaghat, F. Karimi, N. Pazhoohi, E. Ansari, A.D. Nazhvani // Saudi J. Kidney Dis. Transpl. – 2014. – Vol. 25(2). – P. 278-284.
196. Ross, K. F. Autonomous immunity in mucosal epithelial cells: fortifying the barrier against infection / K. F. Ross, M.C. Herzberg // Microbes Infect. – 2016. – Vol. 18. - № 6. – P. 387-398.
197. Rouabhia, M. Interleukin-18 and gamma interferon production by oral epithelial cells in response to exposure to *Candida albicans* or lipopolysaccaride stimulation / M. Rouabhia, G. Ross, N. Page // Infect. Immun. - 2002. - Vol. 70. – P. 7073-7080.
198. Salvatori, O. Innate Immunity and Saliva in *Candida albicans*–mediated Oral Diseases / O. Salvatori, S. Puri, S. Tati, M. Edgerton // J. Dent. Res. – 2016. – Vol. 95. - № 4. – P. 365–371.
199. Santos, I.C. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology / I. C. Santos, Z. L. Hildenbrand, K. A. Schug // Analyst. – 2016. – Vol. 141(10). – P.2827-2837.
200. Santos, C.M. Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment / C.M. Santos, M.C. Pires, T.L. Leão, Z.P. Hernández, M.L. Rodriguez, A.K. Martins, L.S. Miranda, F.S. Martins, J.R. // Nicoli. Microbiology. – 2016. – Vol. 162(7). – P. 1195-1207.
201. Sava, I. G. Novel interactions of glycosaminoglycans and bacterial glycolipids mediate binding of enterococci to human cells / I. G. Sava, F. Zhang, I. Toma, C. Theilacher, B. Li, T. F. Baumert, O. Holst, R. J. Linhardt, J. Huebner // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284(27). – P. 18194-18201.
202. Sawa, N. Isolation and characterization of enterocin W, a novel two-peptide lantibiotic produced by *Enterococcus faecalis* NKR-4-1 / N. Sawa, P. Wilaipun, S. Kinoshita, T. Zendo, V. Leelawatcharamas, J. Nakayama, K. Sonomoto // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – Vol. 78(3). – P. 900-903.

203. Segal, E. Inhibitors of *Candida albicans* adhesion to prevent candidiasis / E. Segal // Adv. Exp. Med. Biol. – 1996. – Vol. 408. – P. 197-206.
204. Shankar, N. *Enterococcal* cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island / N. Shankar, P. Coburn, C. Pillar, W. Haas, M. Gilmore // Int. J. Med. Microbiol. – Vol. 293(7-8). – P. 609-618.
205. Sharma, A. Anti-*Candida* activity of spent culture filtrate of *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 / A. Sharma, S. Srivastava // J. Mycol. Med. – 2014. – Vol. 24(2). – P. 25-34.
206. Shekh, R.M. Biochemical characterization of an anti-*Candida* factor produced by *Enterococcus faecalis* / R.M. Shekh, Roy U. // BMC Microbiol. - 2012. – Vol. 4. – P. 112-132.
207. Sobel, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis / J. D. Sobel // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2016. – Vol. 214 (1). – P. 15-21.
208. Sobel, J.D. Maintenance therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis / J.D. Sobel, H.C. Wiesenfield, M. Martens, P. Danna, T.M. Hooton, A. Rompalo, M. Sperling, C. Livengood, B. Horowitz, J. Von Thron, L. Edwards, H. Panzer, T.C. Chu // N. Engl. J. Med. – 2004. – Vol. 351. – P. 876–883.
209. Soll, D.R. The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans* / D. R. Soll // J. Oral. Microbiol. – 2014. – Vol. 6. – P. 1-12.
210. Sorlózano-Puerto, A. Etiological and Resistance Profile of Bacteria Involved in Urinary Tract Infections in Young Children [Электронный ресурс] / A. Sorlózano-Puerto, J. M. Gómez-Luque, J. D. Luna-Del-Castillo, J. M. Navarro-Marí, J. Gutiérrez-Fernández // Biomed. Res. Int. - doi: 10.1155/2017/4909452. – 2017. - Режим доступа https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
211. Steele, C. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans* / C. Steele, P.L. Fidel // Infect. immune. – 2002. – Vol. 2. – P. 577-583.
212. Süssmuth, S. D. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst / S. D. Süssmuth, A. Muscholl-Silberhorn, R. Wirth,

M. Susa, R. Marre, E. Rozdzinski // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68(9). – P. 4900-4906.

213. Suvorov, A. *Enterococci* as probiotics or autoprobiotics / A. Suvorov, V. Simanenkov, L. Gromova, V. Kolodjieva, A. Tsapieva, A. Chernish, O. Solovieva E. Ermolenko // Prebiotics and probiotics potential for human health. — Sofia, 2011. — P. 104–112.

214. Tobudic, S. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms / S. Tobudic, C. Kratzer, A. Lassnigg, E. Presterl // Mycoses. – 2011. – Vol. 55. – P. 199-204.

215. Todorov, S.D. Safety of *Lactobacillus plantarum* ST8Sh and Its Bacteriocin / S.D. Todorov, L.M. Perin, B.M. Carneiro, P. Rahal, W. Holzapfel, L.A. Nero // Probiotics Antimicrob. Proteins. – 2017. – Vol. 17 - P. 9260-9263.

216. Tsai, P.W. Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of *Candida albicans* by interacting with yeast cell-wall carbohydrates [Электронный ресурс] / P.W. Tsai, C.Y. Yang, H.T. Chang, C.Y. Lan // PLoS One. – doi: 10.1371/journal.pone.0017755. - 2011. – Режим доступа https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.

217. Uppuluri, P. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm devel-opmental cycle / P. Uppuluri, A.K. Chaturvedi, A. Srinivasan, M. Banerjee, A.K. Ramasubramaniam, J.R. Köhler, D. Kadosh, J.L. Lopez-Ribot // PLoS Pathog. – 2010. – Vol. 6. – № 3. – P. 1-13.

218. Van Wamel, W.J. Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation / W. J. Van Wamel, A. P. Hendrickx, M. J. Bonten, J. Top, G. Posthuma, R. J. Willems // Infect. Immun. – 2007. – Vol. 75(2). – P. 924-931.

219. Vandenbon, A. Systems biology approaches to toll-like receptor signaling / A. Vandenbon, S. Teraguchi, S. Akira, K. Takeda, D. M. Standley // Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. – 2012. – Vol. 4(5). – P. 497-507.

220. Verstrepen, K. J. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts / K. J. Verstrepen, F. M. Klis // Mol. Microbiol. – 2006. – Vol. 60(1). – P. 5-15.

221. Vimont, A. Bacteriocin-Producing *Enterococcus faecium* LCW 44: A High Potential Probiotic Candidate from Raw Camel Milk [Электронный ресурс] / A. Vimont, B. Fernandez, R. Hammami, A. Ababsa, H. Daba, I. Fliss // Front. Microbiol. – doi: 10.3389/fmicb.2017.00865.2017. – 2017. – Режим доступа https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
222. Vitkov, L. *Candida* attachment to oral epithelium / L. Vitkov, W.D. Krautgartner, M. Hannig, R. Weitgasser, W. Stoiber // Oral. Microbiol. Immunol. – 2002. – Vol. 17 (1). – P. 60-64.
223. Vogkou, C.T. The causative agents in infective endocarditis: a systematic review comprising 33,214 cases / C. T. Vogkou, N.I. Vlachogiannis, L. Palaiodimos, A. A.Kousoulis // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2016. – Vol. 35. – № 8. – P. 1227-1245.
224. Vriens, K. The radish defensins RsAFP1 and RsAFP2 act synergistically with caspofungin against *Candida albicans* biofilms / K. Vriens, T.L. Cools, P.J. Harvey, D.J. Craik, A. Braem, J. Vleugels, B. De Coninck, B.P. Cammue, K. Thevissen // Peptides. – 2016. – Vol. 75. – P. 71-79.
225. Wächtler, B. *Candida albicans*-Epithelial Interactions: Dissecting the Roles of Active Penetration, Induced Endocytosis and Host Factors on the Infection Process [Электронный ресурс] / B. Wächtler, F. Citiulo, N. Jablonowski, S. Förster, F. Dalle, M. Schaller, D. Wilson, B. Hube // PLoS One. - doi: 10.1371/journal.pone.0036952. – 2012. – Режим доступа https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
226. Wächtler, B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells [Электронный ресурс] / B. Wächtler, D. Wilson, K. Haedicke, F. Dalle, B. Hube // PLoS One. – doi: 10.1371/journal.pone.0017046. – 2011. – Режим доступа https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
227. Waters, C. M. An amino-terminal domain of *Enterococcus faecalis* aggregation substance is required for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid / C.M. Waters, H. Hirt, J.K. McCormick, P. M.

Schlievert, C. L. Wells, G. M. Dunny // Mol. Microbiol. – 2004. – Vol. 52(4). – P. 1159-1171.

228. Weindl, G. Epithelial cells and innate antifungal defens / G. Weindl, J. Wagener, M. Schaller // J. Dent. Res. – 2010. – Vol. 89(7). – P. 666-675.

229. Williams, D.W. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces / D.W. Williams, R. P. Jordan, X.Q. Wei, C.T. Alves, M. P. Wise, M.J. Wilson, M.A. Lewis // J. Oral. Microbiol. – 2013. - Vol. 5. - № 10. - P. 340-358.

230. Xu, H. *Streptococcal* co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response / H. Xu, T. Sobue, A. Thompson, Z. Xie, K. Poon, A. Ricker, J. Cervantes, P. I. Diaz, A. Dongari-Bagtzoglou // Cell. Microbiol. – 2014. – Vol. 16. - № 2. – P. 214-231.

231. Ya, W. Efficacy of vaginal probiotic capsules for recurrent bacterial vaginosis: a double blind, randomized, placebo-controlled study / W. Ya, C. Reifer, L.E. Miller // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2010. – Vol. 203. – P. 1200-1208.

232. Zakikhany, K. In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination / K. Zakikhany, J. R. Naglik, A. Schmidt-Westhausen, G. Holland, M. Schaller, B. Hube // Cell. Microbiol. – 2007. – Vol. 9. – P. 2938–2954.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает признательность сотрудникам ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава РФ доцентам кафедры микробиологии и иммунологии к.м.н. Махровой Т.В., 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 (г. Нижний Новгород) д.м.н. Соловьевой за предоставленную возможность проведения экспериментов с использованием масс-спектрометрии. Также автор благодарит всех соавторов, принимавших участие в научном исследовании.