

Моделирование биопленок *Candida*: прошлое и настоящее

Н.П. Сачивкина¹, Е.М. Ленченко², Р.Т. Маннапова³,
А.А. Стрижаков¹, Е.В. Романова¹, Д.М. Лукина¹

¹Российский университет дружбы народов;

Российская Федерация, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;

²Московский государственный университет пищевых производств;

Российская Федерация, 125080, Москва, Волоколамское ш., д. 11;

³Российский аграрный университет им. К.А.Тимирязева;

Российская Федерация, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Сачивкина Надежда Павловна – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии медицинского факультета Российского университета дружбы народов. Тел.: +7 (919) 962-63-09. E-mail: sachivkina@yandex.ru

Ленченко Екатерина Михайловна – доктор ветеринарных наук, профессор кафедры ветеринарной медицины Московского государственного университета пищевых производств. Тел.: +7 (905) 741–99-86. E-mail: lenchenko.ekaterina@yandex.ru

Маннапова Рамзия Тимергалеевна – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии и иммунологии Российского аграрного университета – Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева, факультет почвоведения, агрохимии и экологии. Тел.: +7 (968) 089-30-30. E-mail: ram.mannapova55@mail.ru

Стрижаков Александр Анатольевич – доктор биологических наук, профессор кафедры департамента ветеринарной медицины Российского университета дружбы народов. Тел.: +7 (903) 647-40-64. E-mail: strizhakov-aa@rudn.ru

Романова Елена Валерьевна – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры генетики, растениеводства и защиты растений Аграрного факультета Российского университета дружбы народов. Тел.: +7 (916) 676-93-28. E-mail: romanova-ev@rudn.ru

Лукина Дарья Михайловна – заведующая лабораторией паразитологии департамента ветеринарной медицины Российского университета дружбы народов. Тел.: +7 (916) 173-58-44. E-mail: tell_tell@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Микозы часто связаны с биопленками – микробными сообществами, заключенными в богатый полисахаридами внеклеточный матрикс. Виды дрожжеподобных грибов рода *Candida* – наиболее распространенные возбудители микозов, вызывающие поверхностные, глубокие и системные заболевания. В последнее время микроорганизмы, входящие в состав биопленки, демонстрируют снижение восприимчивости к большинству терапевтических препаратов, что способствует долгой персистенции инфекции. В настоящий момент происходит формирование новой ветви профилактической и терапевтической медицины, нуждающейся в разработке фармацевтических препаратов, предупреждающих образование биопленок или разрушающих уже образовавшиеся. Последние технологические достижения способствовали разработке новых подходов к изучению процесса формирования биопленок и их моделей, а также накоплению обширных знаний о влиянии различных переменных на формирование биопленки, морфологию и архитектуру. Представлена информация о современных способах моделирования кандидозных биопленок, их преимуществах или недостатках в строении и механизмах.

Ключевые слова: кандиды, *Candida* spp., биопленки, матрикс, моделирование.

Для цитирования: Сачивкина Н.П., Ленченко Е.М., Маннапова Р.Т., Стрижаков А.А., Романова Е.В., Лукина Д.М. Моделирование биопленок *Candida*: прошлое и настоящее. Фармация, 2019; 68 (3): 18–22. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-03-03>

CANDIDA BIOFILM MODELING: PAST AND PRESENT

N.P. Sachivkina¹, E.M. Lenchenko², R.T. Mannapova³, A.A. Strizhakov¹, E.V. Romanova¹, D.M. Lukina¹

¹Peoples' Friendship University of Russia, 6, Miklukho-Maklai St., Moscow 117189, Russian Federation;

²Moscow State University of Food Production, 11, Volokolamskoe Sh., Moscow 125080, Russian Federation;

³K.A. Timiryazev Russian Agrarian University, 49, Timiryazevskaya St., Moscow 127550, Russian Federation

INFORMATION ABOUT OF THE AUTHORS

Sachivkina Nadezda Pavlovna – PhD in Biological Sciences, Associate Professor of Microbiology and Virology Department, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Medical faculty. Phone: +7 (919) 962-63-09. E-mail: sachivkina@yandex.ru

Lenchenko Ekaterina Mikhailovna – Doctor of Veterinary Sciences, Professor of Veterinary Medicine Department, Moscow state

University of Food Production. Phone: +7 (905) 741-99-86. E-mail: lenchenko.ekaterina@yandex.ru

Mannapova Ramziya Timergaleevna – Doctor of Biological Sciences, Professor of Microbiology and Immunology Department, Russian State Agrarian University – The Moscow Agricultural Academy n.a. K.A. Timiryazev, faculty of soil science, agrochemistry and ecology. Phone: +7 (968) 089-30-30. E-mail: ram.mannapova55@mail.ru

Strizhakov Alexander Anatolievich – Doctor of Biological Sciences, Professor of Veterinary Medicine Department, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University). Tel: +7 (903) 647-40-64. E-mail: strizhakov-aa@rudn.ru

Romanova Elena Valerievna – PhD in Agricultural Sciences, associate Professor of genetics, crop production and plant protection, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University). Tel: +7 (916) 676-93-28. E-mail: romanova-ev@rudn.ru

Lukina Daria Mikhailovna – head of the Parasitology laboratory of Veterinary Medicine Department, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University). Phone: +7 (916) 173-58-44. E-mail: tell_tell@mail.ru

SUMMARY

Mycoses are often associated with biofilms that are microbial communities encapsulated in a polysaccharide-rich extracellular matrix. Species of yeast-like fungi belonging to the genus *Candida* are the most common pathogens that cause superficial, deep, and systemic mycoses. Microorganisms that make up the biofilm have recently demonstrated decreased susceptibility to most therapeutic drugs, which contributes to the long-term persistence of infection. At the moment, there is a new branch of preventive and therapeutic medicine, which needs pharmaceuticals to be designed to prevent the formation of biofilms or the destruction of the already formed ones. Recent technological advances have contributed to the elaboration of new approaches to investigating the formation of biofilms and their models and to accumulating extensive knowledge about the influence of different variables on biofilm formation, morphology, and architectonics. There is information on current methods for modeling *Candida* biofilms and on their advantages or disadvantages in their structure and mechanisms.

Key words: *Candida*, *Candida* spp., biofilms, matrix, modeling.

— **For citation:** Sachivkina N.P., Lenchenko E.M., Mannapova R.T., Strizhakov A.A., Romanova E.V., Lukina D.M. *Candida* biofilm modeling: past and present. Farmatsiya (Pharmacy), 2019; 68 (3): 18–22. <https://doi.org/10/29296/25419218-2019-03-03>

Введение

В природе, как правило, микозы часто связаны с биопленками – микробными сообществами, заключенными в богатый полисахаридами внеклеточный матрикс. Течение инфекционных болезней может протекать с осложнениями именно из-за формирования в организме микробных биопленок. В последнее время микроорганизмы, входящие в состав биопленки, демонстрируют снижение восприимчивости к большинству терапевтических препаратов, что способствует долгой персистенции инфекции. Дрожжеподобные грибы (ДПГ) рода *Candida* – наиболее распространенные возбудители микозов, вызывающие поверхностные, глубокие и системные заболевания. В настоящее время профилактическая и терапевтическая медицина нуждается в препаратах, предупреждающих образование биопленок или разрушающих их. Поэтому необходима разработка новых подходов к изучению процесса формирования биопленок и их моделей.

Самые ранние работы по исследуемой проблеме относятся к 80–90 годам XX века. В одном из первых исследований, документирующих способность ДПГ формировать биопленки, Марри и Костертон сообщили о формировании биопленок *Candida parapsilosis* на сосудистых катетерах [1]. Первоначальные исследования так-

же показали, что биопленки *Candida* образуются на различных поверхностях, включая катетеры Хикмана, мягкие контактные линзы, стенты мочеочечника и роговицы [2–4]. Впоследствии доказали, что кандидозные биопленки могут образовываться на самых разнообразных внутренних медицинских устройствах, включая зубные протезы, центральные венозные катетеры и мочевые катетеры.

Микробные биопленки подвергаются многоэтапным процессам роста, включающим физические, химические и биологические изменения. Из-за универсальности, с которой биопленки *Candida* могут развиваться в макроорганизме, возникла необходимость разработать воспроизводимые модели *in vitro* и *in vivo*, имитирующие эти формы/ситуации. Необходимо было разработать модели, которые могут установить общие и специфические характеристики морфологии кандиды-биопленки. В связи с этим изучались различные модельные системы для исследования свойств микробных биопленок *in vitro*. Они варьируются от простых анализов с катетерными дисками до более сложных проточных систем, таких как перфузионный ферментёр биопленки или реакторы и системы вращающихся дисков [5]. Следующие модельные системы *in vitro* включали в себя формирование биопленок на предметных и покровных стеклах,

различных пластинках, микроплашках, биопленочных чипах [6]. Формирование биопленки *in vitro* последовательно проходит через 3 этапа: предварительная обработка субстрата; прикрепление клеток; колонизация клеток и формирование матрицы.

В одной из первых моделей биопленок *Candida in vitro* S. Hawser и L. Douglas [7] сформировали биопленки *C. albicans* на дисках, вырезанных из различных катетеров: латексных, поливинилхлоридных, силиконовых, полиуретановых и из катетеров с эластомерным покрытием. Эти исследователи количественно определили рост биопленки с помощью колориметрического анализатора. В основу они взяли реакцию снижения концентрации соли тетразолия в растворе, коррелирующую с сухой массой биопленки.

Для облегчения скрининга противомикробных соединений на активность роста биопленок необходимо было разработать высокопроизводительные модели. G. Ramage и соавт. выращивали биопленки *C. albicans* в лунках микроплашки. Существенного роста биопленок удавалось достичь уже к 24 ч инкубации [8]. Как указывается в одной из работ, биопленки были сформированы не на дне самих лунок планшета, а на круглом диске, вырезанном из катетера и опущенном в лунку [9]. Преимущество этой модели заключается в том, что биопленки формируются на фактическом материале катетера, их удобно вынимать и, следовательно, биопленки кандид можно измерить количественно (например, по весу) и оценить микроскопически с помощью флуоресцентной, электронной, конфокальной микроскопии. Эта модель использовалась для оценки способности *C. glabrata* образовывать биопленки [6], для определения чувствительности биопленок к ионам металлов [10], для определения межвидовых соотношений и др. A. Srinivasan и соавт. разработали систему микрочипов *C. albicans* biofilmchipmicroarray (CaVChip), которая включает более 700 независимых и однородных нано-биопленок, инкапсулированных в коллагеновую матрицу. Несмотря на многократную миниатюризацию, биопленки, сформированные на чипе, имели схожие фенотипические характеристики с биопленками *in vitro*, а также высокий уровень лекарственной устойчивости, как у клинических образцов [11]. Такая модель представляет собой впечатляющие достижения в этой области и, вероятно, будет способствовать быстрому и углубленному

анализу внутренних механизмов, происходящих в микробном сообществе, что позволит быстро выделить потенциальные новые лекарства для лечения.

Известны работы, посвященные разработке модели *in vivo* для характеристики и определения роли биопленок у животных. Одной из первых была представлена катетер-ассоциированная модель биопленки *Candida* у грызунов. В крупные сосуды крыс и морских свинок вводили диски с биопленками, выращенными в течение суток в плашках. При извлечении биопленок исследователи могли сделать заключение об изменении состава микроорганизмов, архитектуре матрикса. Но самое главное, на таких моделях легко было изучать влияние антимикотиков и их концентраций на биопленки [12]. В 2016 г. T. Vila и соавт. продемонстрировали *in vivo* эффективность местного лечения милтефозином на мышшиной модели орофарингеального кандидоза [13]. В работе S. Kuchariková описана крысиная модель *in vivo* [14].

Другая группа ученых разработала кроличью модель катетер-ассоциированной инфекции *C. albicans* [15] и показала, что через 7 дней вживления количественный прирост биомассы был на порядок выше подобной модели катетера *in vitro*. Подкожная модель биопленки была предложена M. Schinabeck и соавт., где мышам в область холки вводили катетеры, обработанные амфогелями (гели на основе амфотерицина В) [16]. Такая подкожная модель полезна в исследованиях, оценивающих модификацию поверхности катетера на способность ДПП формировать биопленки.

На сегодняшний день недостаточно данных о моделях формирования биопленок на поверхностях клеток-хозяина, а не на подложках-катетерах. Это связано с трудностями экстракции образцов тканей без повреждения матрикса. С этой проблемой впервые попытались справиться разработчики мукозальной модели орофарингеального кандидоза мышшей. Это заболевание характеризуется поражением слизистой оболочки полости рта, языка, десен, небных миндалин, глотки. Такая модель *in situ* впервые наглядно продемонстрировала, что в состав подобных биопленок, помимо ДПП, могут входить эпителиальные клетки, нейтрофилы и комменсальные оральные бактерии [17].

Представляет огромный интерес работа, в которой *C. albicans* формировала биопленки на влажном эпителии мышшей [18], так как пре-

дыдущие наши исследования были посвящены моделированию вагинального кандидоза у этих животных; при этом удалось спровоцировать развитие рецидива вагинального кандидоза на фоне дисбиоза, вызванного антибиотиками и искусственно индуцированной течи. В работе M. Naggiott и соавт. подчеркнуто одновременное нахождение в составе биопленки как дрожжевых форм кандид, так и гифальных. Эта вагинальная модель была реплицирована у иммунокомпетентных мышей, получавших эстрадиол, что делает наши работы немного схожими.

Анализ способов моделирования кандидозных биопленок показывает, что разработка моделей как *in vitro*, так и *in vivo* чрезвычайно важна, поскольку каждый способ имеет свои преимущества. В результате удалось провести детальные исследования по составу и механизмам развития биопленок, ответить на многие вопросы профилирования генов и белков рода *Candida*. Наличие моделей *in vivo* особенно важно, поскольку это позволяет проводить точные исследования, направленные на выяснение взаимодействия хозяина и патогена в биопленках.

Ранее кандидоз рассматривался как моноинфекция [19], однако, согласно общемировой тенденции, это мнение ошибочно. Для эффективного лечения нужно конструировать новые препараты, направленные на целый комплекс микроорганизмов – на биопленки. Раз инфекции становятся мультвалентными, то и лекарственные средства должны быть комплексными, т.е. в одном препарате должно сочетаться антибактериальное и антимикотическое действие. Например, такие свойства проявляют: препарат на основе прополиса, растительные витаминные сборы и др. [20]. Препарат «Литиказа» бактериального происхождения многократно подтвердил свою эффективность в отношении *Candida* spp. [21].

Заключение

Проблема подавления или разрушения кандидозных биопленок – чрезвычайно актуальная задача, так как классические методы антимикотической терапии зачастую малоэффективны или непредсказуемы из-за высокой устойчивости возбудителей в них. На сегодняшний день не существует средств, обеспечивающих прямое и полное уничтожение биопленок, но с помощью моделирования возможна разработка новых подходов по предотвращению образования, контролю роста и разрушению биопленок.

Будущее в лечении инфекций за многокомпонентными конструкциями, содержащими антимикотические, антибактериальные и другие составляющие.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Marrie T., Costerton J. Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *J.Clin.Microbiol.*, 1984; 19: 87–693.
2. Tchekmedyan N., Newman K., Moody M., Costerton J. Special studies of the Hickman catheter of a patient with recurrent bacteremia and candidemia. *Am. J. Med. Sci.*, 1986; 291: 419–24.
3. Reid G., Denstedt J., Kang Y. Microbial adhesion and biofilm formation on ureteral stents *in vitro* and *in vivo*. *J. Urol.*, 1992; 148: 1592–4.
4. Elder M., Matheson M. Biofilm formation in infectious crystalline keratopathy due to *Candida albicans*. *Cornea*. 1996; 15: 301–4.
5. Chandra J., Mukherjee P., Leidich S., Faddoul F. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *J. Dent. Res.*, 2001; 80: 903–8.
6. Almshawit H., Macreadie I., Grando D. A simple and inexpensive device for biofilm analysis. *J.Microbiol.Methods.*, 2014; 98: 59–63.
7. Hawser S., Douglas L. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect. Immun.* 1994; 62: 915–21.
8. Ramage G., Vande W., Wickes B., Lopez-Ribot J. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 3234–40.
9. Chandra J., Mukherjee P., Ghannoum M. *In vitro* growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat. Protoc.* 2008; 3: 1909–24.
10. Harrison J., Ceri H., Yerly J., Rabiei M., Hu Y., Martinuzzi R., Turner R. Metal ions may suppress or enhance cellular differentiation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. *Appl. Environ.Microbiol.* 2007; 272: 172–81.
11. Srinivasan A., Uppuluri P. Development of a high-throughput *Candida albicans* biofilm chip. *PLoS One*. 2011; 6:e19036. <https://doi.org/10.3791/3845>.
12. Andes D., Nett J., OschelP. Development and characterization of an *in vivo* central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 6023–31.
13. Vila T., Ishida K., Seabra S., Rozental S. Miltefosine inhibits *Candida albicans* and non-albicans *Candida* spp. biofilms and impairs the dispersion of infectious cells. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2016; 48 (5): 512–20.
14. Kuchariková S., Tournu H., Holtappels M. *In vivo* efficacy of anidulafungin against mature *Candida albicans* biofilms in a novel rat model of catheter-associated Candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54 (10): 4474–5.

15. Andes D.R., Nett J., Oschel P., Albrecht R., Marchillo K., Pitula A. Development and characterization of an *in vivo* central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect. Immun.* 2004; 72: 6023–31.

16. Schinabeck M.K., Long L.A., Hossain M.A., Chandra J., Mukherjee P.K., Mohamed S., Ghannoum M.A. Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: liposomal Amphotericin B antifungal lock therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 1727–32.

17. Bertolini M.M., Xu H., Sobue T., Nobile C.J., Del BelCury A.A. *Candida-streptococcal* mucosal biofilms display distinct structural and virulence characteristics depending on growth conditions and hyphal morphotypes. *Mol. Oral Microbiol.* 2015; 30 (4): 307–22. <https://doi.org/10.1111/omi.12095>. Epub 2015 Apr 20.

18. Harriott M.M., Lilly E.A., Rodriguez T.E., Fidel P.L.Jr, Noverr M.C. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology.* 2010; 156: 3635–44.

19. Sachivkina N.P., Kravtsov E.G., Wasileva E.A., Anokchina I.V., Dalin M.V. Efficiency of lyticase (bacterial enzyme) in experimental candidal vaginitis in mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2010; 149 (6): 727–30.

20. Жилкина В.Ю., Сачивкина Н.П., Марахова А.И. и др.

Изучение антимикробной и антимикотической активности витаминных сборов и препаратов на их основе. Современные проблемы науки и образования, 2017; 5: 124. [Zhilkina V.Yu., Sachivkina N.P., Marakhova A.I. et al. The study of the antimicrobial and antimycotic activity of vitamin fees and preparations based on them. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*, 2017; 5: 124 (in Russian)].

21. Сачивкина Н.П., Кравцов Э.Г., Васильева Е.А. Изучение фермента литиказы как нового антимикотического препарата. Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2008; 3: 37–43. [Sachivkina N.P., Kravtsov E.G., Vasil'yeva E.A. The study of the enzyme liticase as a new antimycotic drug. *Vestnik Rossiyskogo Universiteta Druzhby Narodov. Seriya: Agronomiya i zhivotnovodstvo.* 2008; 3: 37–43 (in Russian)].

Поступила 20 января 2019 г.

Received 20 January 2019

Принята к публикации 25 февраля 2019 г.

Accepted 25 February 2019