

УДК: 579.61:615.282.23

[https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14\(32\)-941-955](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14(32)-941-955)

**Гринзовська Анастасія Анатоліївна** аспірант кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, проспект Берестейський, 34, м. Київ, 01601, тел.: (095)362-04-91, <https://orcid.org/0000-0002-2273-3331>.

**Бобир Віталій Васильович** доктор медичних наук, професор кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, проспект Берестейський, 34, м. Київ, 01601, тел.: (093)551-70-11, <https://orcid.org/0000-0002-8310-8011>.

**Вовк Ірина Миколаївна** кандидат медичних наук, доцент кафедри кафедри мікробіології, вірусології та імунології, Вінницький Національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, вул. Пирогова 56, м. Вінниця, 21018, тел.: (067) 793-96-65, <https://orcid.org/0000-0001-8343-0724>.

**Назарчук Олександр Адамович** доктор медичних наук, професор кафедри мікробіології, вірусології та імунології, Вінницький Національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, вул. Пирогова 56, м. Вінниця, 21018, тел.: (097)-729-37-61, <https://orcid.org/0000-0001-7581-0938>.

### **СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ГРИБІВ РОДУ CANDIDA В ПРОЦЕСІ ШТУЧНОГО ФОРМУВАННЯ У НИХ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО АЗОЛІВ**

**Анотація.** Розглянуто основні властивості і медичне значення представників роду *Candida*. З кожним роком кандидози стають не тільки більш поширеними, але й супроводжуються високими показниками смертності як у країнах, що розвиваються, так і в розвинених країнах. Водночас головною проблемою патології, спричиненої кандидами, є розвиток у даних збудників резистентності до сучасних протигрибкових препаратів. Поява стійких до антимікотиків штамів кандид підвищує частоту випадків неефективного лікування, ризик розвитку ускладнень і смертності а також обумовлює збільшення терміну перебування пацієнтів у стаціонарі.

Експериментальними дослідженнями встановлено, що в процесі штучної адаптації клінічних ізолятів роду *Candida* до фунгіцидів з хімічних груп триазолів та імідазолів, які використовуються в аграрній промисловості, відбувається повільна селекція популяцій, які характеризуються меншою чутливістю до фунгіцидних препаратів та змінюють свої вихідні біологічні

властивості. Встановлено, що штами кандид, які підлягали багаторазовому пасажуванню у поживному середовищі з суббактеріостатичними концентраціями фунгіцидів, уповільнювали свій ріст та утворювали дисоціативні малі культуральні форми.

В процесі штучної селекції резистентних штамів до дифенконазолу, тебуконазолу, флутриафолу, пропіконазолу (триазолі), імазалілу та прохлоразу (імідазолі) відбувались зміни в морфології резистентних до дії фунгіцидів клітин. За допомогою мікроскопічних методів у адаптованих до високих концентрацій фунгіцидів *C. krusei* доведено здатність утворювати гіфи або переходити в псевдогіфальний стан. Подібні морфологічні модифікації, однак менш виражені, були встановлені для штучно сформованих резистентних штамів *C. glabrata*. Крім того, електронно-мікроскопічними дослідженнями зафіксовано виражені структурно – морфологічні зміни *C. glabrata*, які формуються на десятому пасажі штучного моделювання у даних мікроорганізмів резистентності до пропіконазолу.

**Ключові слова:** дріжджоподібні гриби *Candida*, протигрибкові препарати, фунгіциди, резистентність, моделювання, електронна мікроскопія.

**Hrynzovska Anastasiia Anatolyivna** Postgraduate student, Bogomolets National Medical University, departments of microbiology and parasitology with basics, Docent, Beresteisky Ave., 34, Kyiv, 01601, tel.: (095) 362-04-91, <https://orcid.org/0000-0002-2273-3331>

**Bobyр Vitalii Vasyliovych** Doctor of Medical Sciences, Professor, Bogomolets National Medical University, microbiology, departments of microbiology and parasitology with basics, Professor, Beresteisky Ave., 34, Kyiv, 01601, tel.: (093) 551-70-11, <https://orcid.org/0000-0002-8310-8011>

**Vovk Iryna Mykolaivna** PhD, Associate Professor, National Pirogov Memorial Medical University, Department of Microbiology, Associate Professor, Pirogov St., 56, Vinnytsya, 21018, <https://orcid.org/0000-0001-8343-0724>

**Nazarchuk Oleksandr Adamovych** Doctor of Medical Sciences, Professor, National Pirogov Memorial Medical University, Department of Microbiology, Professor, Pirogov St., 56, Vinnytsya, 21018, (097)729-37-61, <https://orcid.org/0000-0001-7581-0938>.

## **STRUCTURAL AND MORPHOLOGICAL CHANGES OF FUNGI OF THE GENUS CANDIDA RESULTING FROM THE ARTIFICIAL RESISTANCE FORMATION TO AZOLES**

**Abstract.** The main properties and medical significance of fungi from *Candida* genus were considered. Regarding to scientific data review, infections,

caused by *Candida* spp. have tendency to become not only more common pathology, but also be accompanied by high mortality rates every year in developing as well as developed countries. At the same time, arising of resistant to modern antifungals isolates is seem to become the main problem of the pathology caused by candida. The arising of resistant strains increases the frequency of antifungal therapy failure, the risk of complications, mortality, as well as lead to longer stay inpatients in hospitals.

Experimental investigation established that in result of artificial adaptation of clinical *Candida* isolates to fungicides of the triazole and imidazole chemical groups, which are used in the agricultural industry, there was a slow selection of populations that were less sensitive to antifungals and changed their biological features. It was shown that *Candida* strains, which were selected by passaging in a nutrient medium with sub-inhibitory concentrations of fungicides, grew slower than non-selected strains and formed dissociative small cultural forms.

In the process of artificial selection of resistant strains to difenoconazole, tebuconazole, flutriafol, propiconazole (triazoles), imazalil and prochloraz (imidazoles) it was revealed, that resistant to antifungals cells were morphologically changed. It was proven by microscopy that *C. krusei*, which was adapted to high concentrations of fungicides, was able to form hyphae or transform to a pseudohyphal state. Similar morphological modifications, however less apparent, were established for artificially selected resistant strains of *C. glabrata*. In addition, significant structural and morphological changes of *C. glabrata*, which arose in resistant cells after ten passages along artificial formation of resistance to propiconazole, were demonstrated under electron microscopy.

**Keywords:** yeast-like fungi *Candida*, antifungals, fungicides, resistance, selection, microscopy.

**Постановка проблеми.** *Candida* – рід дріжджоподібних грибів, які спричиняють захворювання слизових оболонок, шкіри, нігтів та внутрішніх органів. Кандиди мешкають на рослинах, плодах, є частиною нормальної мікрофлори ссавців та людини. Види роду *Candida*, що є частиною нормальної мікрофлори, можуть проникати в тканини, розмножуватись та спричиняти розвиток кандидозу в пацієнтів із ослабленим імунним захистом (ендогенна інфекція). Рідше інфекції виникають в результаті передачі збудника дітям при народженні, грудному вигодовуванні. При передачі статевим шляхом можливий розвиток уrogenітального кандидозу.

Серед найбільш відомих грибкових патогенів людини є представники роду *Candida*, який налічує близько 200 видів. *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* та інші є найбільш поширеними збудниками кандидозу; крім того спектр збудників кандидозу доповнюється новими видами роду *Candida*, які можуть призвести до важкої інвазивної інфекції, особливо у пацієнтів з ослабленим імунітетом [1].

З кожним роком інфекції, що викликаються кандидами, не тільки стають все більш поширеними, але й характеризуються зростанням показників летальності як у країнах, що розвиваються, так і в розвинених країнах [2, 3].

Такі фактори як неконтрольоване і/або нераціональне застосування антибіотиків, збільшення в популяції кількості осіб з імуносупресією або імунodefіцитом, хворих на цукровий діабет та ін. сприяють збільшенню частоти опортуністичних мікозів, до яких відноситься кандидоз. В наш час однією з основних проблем лікування кандидозів є зростання числа резистентних до протигрибкової терапії штамів. Поява стійких до антимікотиків мікробів підвищує частоту випадків неефективного лікування, ризик розвитку ускладнень і смертності, а також обумовлює збільшення терміну перебування пацієнта у стаціонарі. Крім того, сьогодні активно обговорюють питання впливу використання фунгіцидів в немедичних галузях (аграрна, харчова промисловості, тощо) на формування резистентності до медичних протигрибкових препаратів подібної хімічної структури у грибів, які спроможні викликати інфекції у людини.

Все це свідчить про важливість вивчення проблеми резистентності грибів і цілком очевидно, що першим кроком у подоланні даної проблеми є комплексне і фундаментальне дослідження механізмів розвитку резистентності та факторів, які впливають на даний процес.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Не зважаючи на те, що кандиди давно відомі, останні десятиліття ознаменувались появою нових даних щодо їх біологічних властивостей. Наприклад, електронно-мікроскопічними дослідженнями встановлено можливість внутрішньоклітинного паразитування представників роду *Candida*, зокрема шляхом інвазії псевдоміцелію в епітеліальні клітини з формуванням в них фагосом, які слугують резервуарами інфекції у хворих з кандидозним вульвовагінітом [4].

Електронна мікроскопія дозволила зафіксувати низку ультраструктурних змін в рибосомах, системних вакуолях, а також у ядерній і клітинній оболонці грибів роду *Candida*, які формуються під дією антимікотичних препаратів [5]. Крім того, встановлено, що характер прояву деструктивних змін грибової клітини залежить від тривалості інкубації мікроорганізмів в присутності препаратів, а також від концентрації та виду протигрибкових лікарських засобів [6, 7, 8].

Іншими дослідниками встановлено етіологічно значущі форми мікроскопічних грибів та їхні біологічні властивості, які мають значення в патогенезі грибової інфекції. Під час вивчення характеру взаємовідносин різних форм вегетації кандид та клітин макроорганізму виявлено підвищену адгезію грибів роду *Candida* до епітелію слизових оболонок та пригнічення природних механізмів їхнього очищення при кандидозній патології, що сприяє тривалій персистенції збудника в органах і системах та поширенню інфекційного мікотичного процесу. Згідно наукових джерел, клітини, що

брунькуються, у глибоких шарах епітелію демонструють більш виражену патологічну дію, яка проявляється каріолізисом, цитолізисом та посиленням ексфоціації клітин. Нитки псевдоміцелію гриба здатні пронизувати увесь епітеліальний шар, спричиняючи його деструкцію та відторгнення. На думку авторів поява псевдоміцелію свідчить про глибоку інвазію грибів, брунькуючих клітин — про активізацію запального процесу, а бластоспор — про формування кандидоносійство. Описані морфологічні стани епітеліальних клітин, характер взаємодії збудника та епітеліоцитів свідчать про ступінь агресії збудника та можуть бути визначені як одні з критеріїв прогнозу захворювання. [9] Крім того, виявлені шляхом просвічуючої електронної мікроскопії особливості біологічних властивостей кандид вказують на спроможність даних збудників до тривалої персистенції та резистентності до специфічної етіотропної терапії.

Отже, за результатами аналізу сучасних досліджень з даного питання можна зробити висновок, що розвиток інфекційного процесу, асоційований з кандидами безпосередньо залежить від біологічних властивостей самого інфекційного чинника. Водночас, питання дослідження структурно-морфологічних особливостей вказаної групи мікроорганізмів після формування у них резистентності до препаратів азолового ряду є новим і таким, що потребує глибокого та детального вивчення.

**Мета статті** - вивчити морфологічні особливості грибів роду *Candida* після штучного моделювання у них резистентності до основних груп фунгіцидів немедичного призначення.

**Матеріали та методи.** З метою послідовної адаптації клінічних ізолятів кандид до фунгіцидів різної хімічної структури (дифенконазолу, тебуконазолу, пропіконазолу, флутриафолу, імазалілу та прохлоразу) використовували метод серійних розведень в рідкому поживному середовищі Сабуро з подальшим визначенням мінімальних фунгіцидних концентрацій (МФцК) за загальноприйнятою методикою [10]. Вихідний розчин фунгіциду готували шляхом розведення 800 мг препарату у 10 мл диметилсульфоксиду до повного розчинення препарату. В зв'язку з тим, що пропіконазол є в'язкою рідиною – розчин готували у об'ємних відсотках: 0,8 мл рідкого фунгіциду розчиняли у 10 мл диметилсульфоксиду. Для приготування двократних розведень розчину фунгіциду у поживному середовищі готували ряд пробірок, в кожен з яких вносили по 2 мл стерильного рідкого середовища Сабуро. В першу пробірку ряду додавали 2 мл 8% розчину фунгіциду, потім переносили 2 мл вмісту в наступну пробірку, послідовно повторюючи процедуру до останньої пробірки в ряду, з якої надалі виливали 2 мл розчину для збереження однакової кількості розчину в кожній пробірці ряду. Таким чином отримували ряд послідовних розведень фунгіциду в поживному середовищі з концентрацією фунгіциду від 40 мг/мл в першій пробірці до 0,039 мг/мл в останній пробірці ряду.

Вихідну суспензію мікроорганізмів виготовляли із добової культури кандид шляхом емульгування декількох колоній в стерильному ізотонічному розчині, доводили мутність до 0,5 Од за МакФарландом, що відповідає концентрації  $1,5 \times 10^8$  КУО/мл. В кожную пробірку ряду вносили по 0,2 мл інокуляту дослідної культури *Candida spp.* в концентрації  $10^6$  КУО/мл, який готували шляхом розведення маточного завису у 100 разів. Інкубацію посівів проводили при температурі 35°C впродовж 24 год.

У зв'язку з неможливістю визначити мінімальну інгібуючу концентрацію внаслідок помутніння середовища при додаванні розчину фунгіциду проводили визначення мінімальної фунгіцидної концентрації (МФцК) шляхом висіву вмісту кожної пробірки на щільне поживне середовище Сабуро. Результати враховували після інкубації у термостаті через 24 год. Мінімальну концентрацію фунгіциду, яка викликала загибель культури, про що свідчила відсутність росту на поживному середовищі, визначали як МФцК. Дослідження повторювали в трьох серіях для кожного із клінічних ізолятів *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* для визначення достовірних середніх значень МФцК.

З метою вивчення можливості адаптації клінічних штамів кандид до досліджуваних фунгіцидів нами були відібрані по 2 штами видів *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, з якими проводили послідовні дослідження чутливості мікроорганізмів методом серійних розведень в рідкому поживному середовищі (пасажування). Поживні середовища із різною концентрацією фунгіциду засівали культурою *Candida spp.*, яка росла в присутності половинної мінімальної фунгіцидної концентрації даного фунгіциду. Після інкубації в термостаті впродовж 24 год та 48 год вміст кожної пробірки висівали на щільне поживне середовище для врахування МФцК, інкубували в термостаті та враховували результати через 24 та 48 годин. Вирощені культури використовували для наступного пасажу дослідження біологічної активності фунгіциду та визначення МФцК. Кількість пасажів коливалась від 10 до 20 в залежності від виду *Candida spp.*

Структурно-морфологічні особливості кандид порівнювали до та після формування резистентності шляхом використання світлової мікроскопії та електронної просвічуючої мікроскопії. Для роботи використовували добову культуру, вирощену на МПБ. Препарати для світлової мікроскопії забарвлювали 1 % водним розчином метиленового синього протягом 3 хв.

Електронно-мікроскопічні дослідження виконували у лабораторії електронної мікроскопії кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України. Свіжі культури грибів досліджували в електронних мікроскопах Jeol JEM 100 CX II (Японія) та ПЕМ-125 (Україна) за стандартною методикою. Об'єкти поміщали на плівку підкладку з формвару або колодію, попередньо укріплену вуглецем [11]. Препарати не

контрастували. Контролем слугували вихідні культури *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*.

Результати досліджень були оброблені статистично з використанням програмного забезпечення для статистичного аналізу Microsoft Excel 2016 та «Statistica 5.5» (належить ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний № AXXR910A374605FA). Аналіз вірогідності проводили за t-критерієм Стюдента. Різницю між показниками вважали статистично значимою при ймовірності нульової гіпотези менше 5% ( $p < 0,05$ ).

**Виклад основного матеріалу.** В результаті експериментальних досліджень встановлено, що пасажування дослідних штамів *Candida spp.* в присутності фунгіцидів для сільськогосподарського застосування призводило до змін чутливості досліджуваних культур мікроорганізмів, які мали свої особливості в залежності від виду та хімічної структури використаного фунгіциду (табл. 1, 2, 3).

Таблиця 1.

### Динаміка формування резистентності до фунгіцидів у *Candida albicans*

| Назва препарату | МФЦК вихідна (мкг/мл або об%*) | МФЦК після пасажування (мкг/мл або об%) | Кількість пасажів | Зростання стійкості (в п разів) |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| Дифеноконазол   | 312,5                          | 312,5                                   | 12                | немає                           |
| Тебуконазол     | 312,5                          | 625,0                                   | 11                | 2                               |
| Флутриафол      | 625,0                          | 1250,0                                  | 7                 | 2                               |
| Пропіконазол    | 0,0039*                        | 0,0156*                                 | 8                 | 4                               |
| Імазаліл        | 78,1                           | 625,0                                   | 12                | 8                               |
| Прохлораз       | 1250,0                         | 2500,0                                  | 12                | 2                               |

Таблиця 2.

### Динаміка формування резистентності до фунгіцидів у *Candida glabrata*

| Назва препарату | МФЦК вихідна (мкг/мл або об%*) | МФЦК після пасажування (мкг/мл або об%) | Кількість пасажів | Зростання стійкості (в п разів) |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| Дифеноконазол   | 10000,0                        | 20000,0                                 | 10                | 2                               |
| Тебуконазол     | 156,3                          | 1250,0                                  | 10                | 8                               |
| Флутриафол      | 10000,0                        | 10000,0                                 | 10                | немає                           |
| Пропіконазол    | 0,0156*                        | 0,25*                                   | 10                | 16                              |
| Імазаліл        | 312,5                          | 625,0                                   | 10                | 2                               |
| Прохлораз       | 10000,0                        | 20000,0                                 | 10                | 2                               |

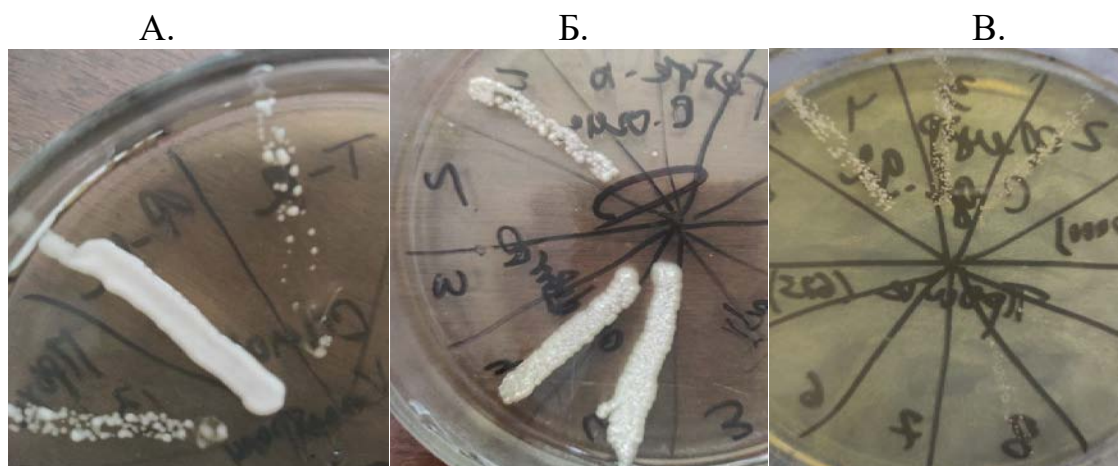
Таблиця 3.

Динаміка формування резистентності до фунгіцидів у *Candida krusei*

| Назва препарату | МФцК вихідна (мкг/мл або об%*) | МФцК після пасажування (мкг/мл або об%) | Кількість пасажів | Зростання стійкості (в п разів) |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| Дифеноконазол   | 1250,0                         | 10000,0                                 | 16                | 8                               |
| Тебуконазол     | 78,1                           | 2500,0                                  | 16                | 32                              |
| Флутриафол      | 78,1                           | 5000,0                                  | 16                | 64                              |
| Пропіконазол    | 0,00195*                       | 0,0313*                                 | 10                | 16                              |
| Імазаліл        | 78,1                           | 1250,0                                  | 12                | 16                              |
| Прохлораз       | 5000,0                         | 5000,0                                  | 16                | немає                           |

Отримані результати демонструють, що дослідні штами трьох видів кандид демонстрували різну чутливість до фунгіцидних препаратів та динаміку утворення більш стійких форм. У *C. albicans* спостерігалось повільне формування резистентності до триазолів (тебуконазолу, флутриафолу, пропіконазолу) та прохлоразу, в той час як чутливість до дифеноконазолу не змінювалась, а до імазалілу (прохлоразу) зростала в 8 разів після дванадцяти пасажів (табл. 1). Штам *C. glabrata* мав високу природну резистентність до дифеноконазолу, флутриафолу та прохлоразу (вихідні МФцК сягали 10 000 мкг/мл), однак стійкість до цих препаратів підвищилась тільки в 2 рази після десятого пасажу, за винятком флутриафолу, до якого не вдалось сформувати більш стійкий штам. Мінімальні фунгіцидні концентрації триазолів (тебуконазолу та пропіконазолу) зростали в 8 та 16 разів, відповідно, в процесі десятикратного пасажування (табл. 2). Успішне моделювання стійкості в процесі пасажування *C. krusei* спостерігали для всіх препаратів за винятком прохлоразу – фунгіциду групи імідазолів. Резистентність до тебуконазолу, флутриафолу формувалась найбільш виражено: мінімальні фунгіцидні концентрації зростали в 32 та 64 рази, відповідно, після 16 пасажів культури. Стійкість до пропіконазолу та імазалілу зростала в 16 разів після 10 та 12 пасажів, відповідно, а до дифеноконазолу – у 8 разів протягом 16 пасажів.

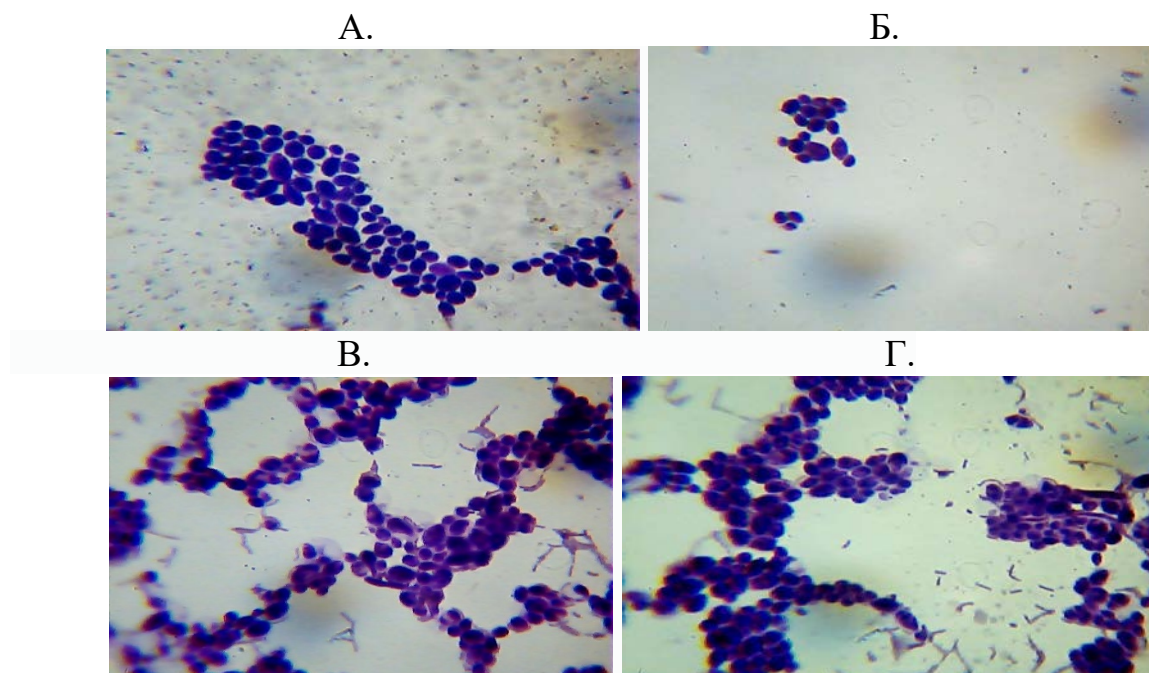
Слід зазначити, що в процесі пасажування відбувались коливання МФцК препаратів як в сторону збільшення, так і в сторону зменшення в порівнянні з вихідною МФцК. В зв'язку з уповільненням росту культур, поступовим зменшенням кількості клітин, спроможних до розмноження та росту, які спостерігали для всіх штамів незалежно від виду, кількість пасажів була обмежена, тобто в процесі селекції резистентних штамів відбувалось поступове “виснаження” популяції та припинення росту на поживних середовищах на 7-16 пасаж в залежності від виду кандид. Починаючи з п'ятого-сьомого пасажу в середовищі з фунгіцидами відбувались зміни культуральних властивостей кандид у вигляді дисоціації колоній та появи малих культуральних форм (рис. 1).



**Рис.1.** Малі культуральні форми. А. *Candida albicans*; Б. *Candida krusei*; В. *Candida glabrata*.

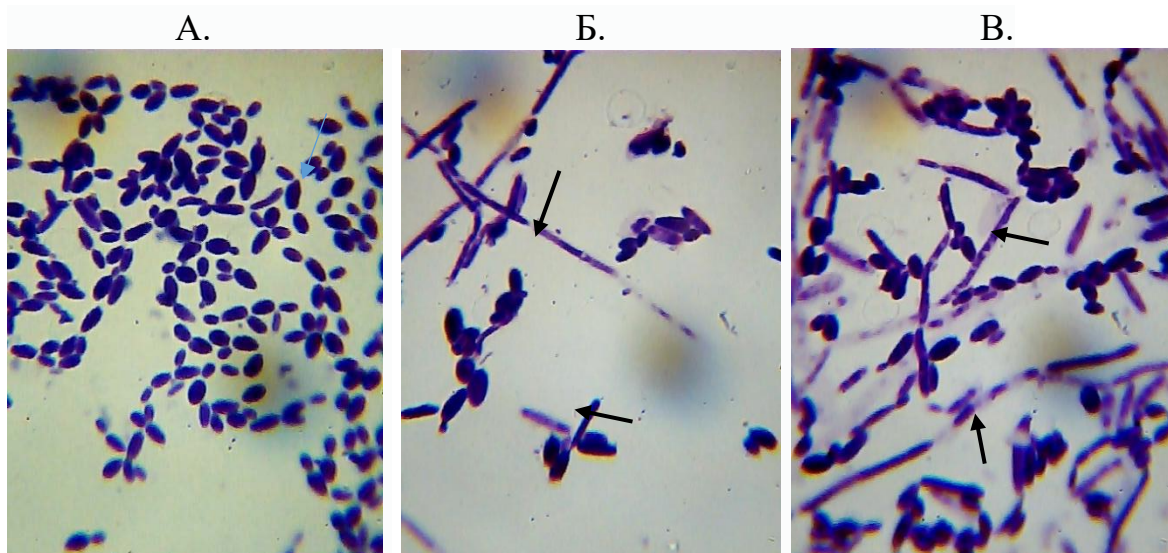
При проведенні світлової мікроскопії вихідної культури *Candida albicans* та резистентної до вказаних вище фунгіцидів різниці у структурно-морфологічних особливостях встановлено не було. В усіх випадках структурно-морфологічна картина даних мікроорганізмів відповідала *C. albicans*: одноклітинні мікроорганізми, бластоспори з округлою, овальною, еліпсоїдою, циліндричною або яйцевидною формою, від 10 до 20 мкм довжиною та від 5 до 10 мкм завширшки (рис. 2).

Електронно-мікроскопічно резистентні штами також не відрізнялись від вихідних.



**Рис. 2.** Морфологія *C. albicans*. А – резистентна до імазалілу; Б – мало резистентна до прохлоразу; В – резистентна до пропіконазолу; Г – – мало резистентна до флутриафолу. Світлова мікроскопія. Збільшення  $\times 900$ .

Разом з тим, порівнюючи структурно-морфологічні властивості вихідної популяції та резистентних штамів *C. krusei* вдалось встановити деякі закономірності: на відміну від вихідної популяції, резистентні до флутриафолу та тебуконазолу штами *C. krusei* статистично частіше набували здатності утворювати гіфи або переходити в псевдогіфальний стан (рис. 3). У всіх інших випадках морфологічних особливостей у порівнянні з вихідним штамом зафіксовано не було. Взагалі існує три морфотипи *Candida spp.*: дріжджі, гіфи та псевдогіфи, причому гіфи та псевдогіфи іноді асоціюють з ниткоподібним ростом [12, 13]. Представлені на рис. 2.Б-В псевдогіфи фенотипово відрізняються від гіф через їхню розгалужену природу. Хоча псевдогіфальний ріст зазвичай спостерігається серед представників роду *Candida*, види, ступінь і частота, з якою різні види можуть зазнавати псевдогіфального росту, а також довжина і зовнішній вигляд псевдогіф можуть істотно відрізнятися між видами. Нещодавно ниткоподібний стан росту описаний також у високовірулентного грибкового патогена *C. auris* [14, 15].



**Рис. 3.** Морфологія *C. krusei*. А – вихідна культура. Б – резистентна до тебуконазолу; В – резистентна до флутриафолу. Стрілками показано гіфи. Світлова мікроскопія. Збільшення  $\times 900$ .

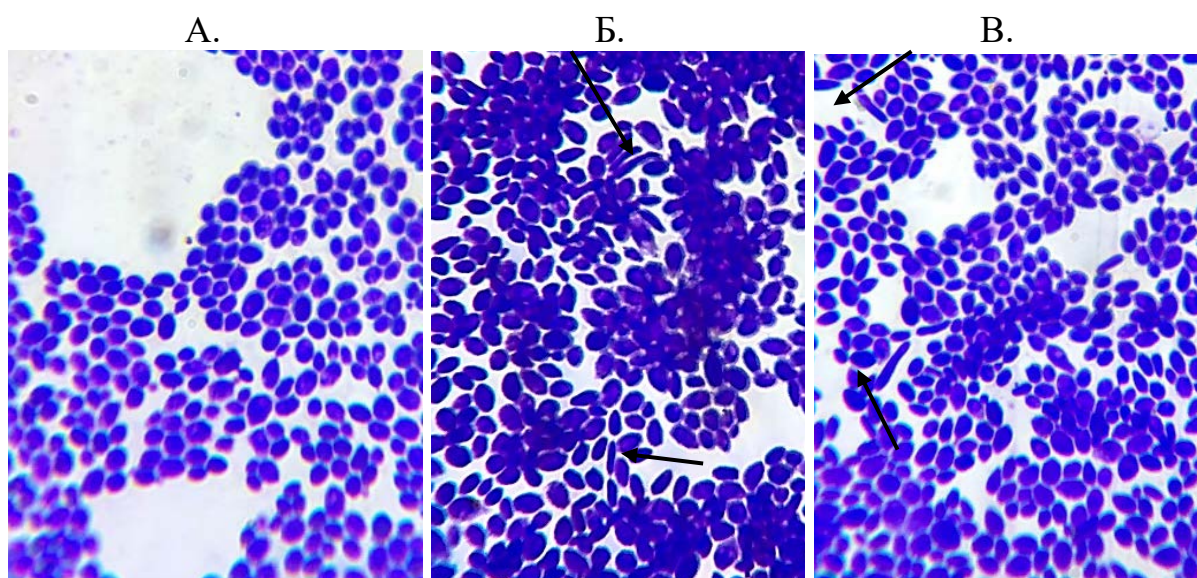
Серед *Candida spp.* лише певні види мають здатність проходити морфологічний перехід між дріжджовими та ниткоподібними станами росту. Найкраще вивченим з них є *C. albicans*, яка легко може переходити між дріжджовими, псевдогіфальними та гіфальними станами росту в різноманітних умовах середовища [16]. Можливість переходити між дріжджовими та псевдогіфальними станами числі *C. krusei* описана і іншими дослідниками, які на сьогодні такі біологічні властивості найчастіше характеризують як прояв вірулентності [17]. Водночас нами вперше показано

зростання прояву даних властивостей на фоні штучного формування у них резистентності до фунгіцидних препаратів.

Сьогодні існують дані про те, що стан гіф сприяє глибокій колонізації тканин, посилює утворення біоплівки та забезпечує захист від макрофагів [18]. Гіфи кандид також виділяють кандидалізін, пептидний токсин, який пошкоджує мембрани епітеліальних клітин господаря та стимулює сигнальні процеси в клітині господаря, що є критично важливим для вірулентності збудника[19].

Крім встановлених і описаних вище особливостей клітинного морфогенезу *C. krusei*, електронно-мікроскопічними дослідженнями не встановлено структурно-морфологічних змін даних мікроорганізмів, які б супроводжували процес формування резистентності у *C. krusei* (рис. 4А).

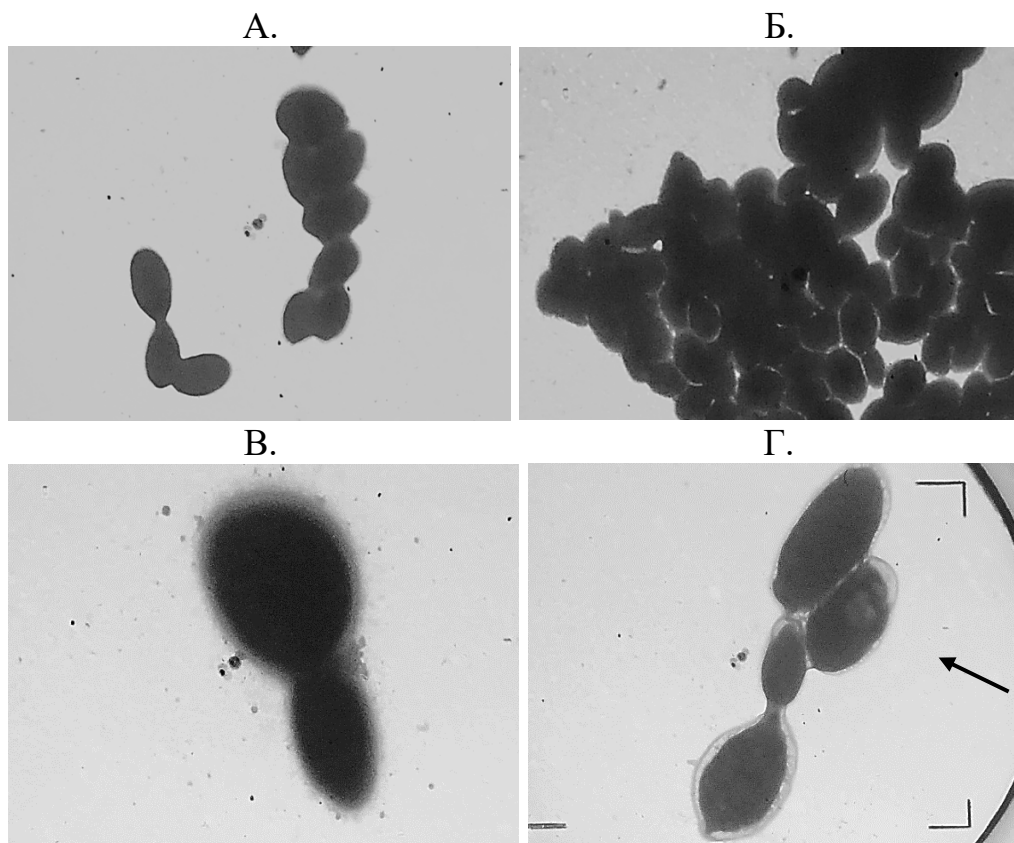
Водночас мікроскопічні дослідження морфологічних особливостей бульйонної культури *C. glabrata* після 10 пасажу формування резистентності до імазалілу та пропіконазолу дозволили встановити наступні особливості: в обох випадках виявлялись яйцеподібні поодинокі або згруповані клітини, які ростуть і діляться за допомогою осьового та біполярного брунькування. Водночас, на відміну від вихідної культури, при дослідженні резистентних штамів *C. glabrata* в поле зору інколи попадали мікробні клітини з характерними ознаками для форми гіф: витягнутий стан з рівномірною шириною та паралельними сторонами (рис. 4 Б-В.). В цілому можна сказати, що дані гриби після тривалого пасажування в присутності інгібуючих концентрацій антифунгальних засобів залишились в попередньому морфотипі.



**Рис.4.** Морфологія *C. glabrata*. А – вихідна культура. Б – штам, адаптований до імазаліла (чутливість зменшилась в 2 рази); В – штам, резистентний до пропіконазолу (фунгіцидна концентрація зросла в 16 разів). Стрілками показано гіфові форми грибів. Світ лова мікроскопія. Збільшення  $\times 900$ .

Наведені експериментальні дані зменшення вірулентності або повна втрата останньої у випадку, коли поліморфні *Candida spp.* замикаються в тому чи іншому морфотипі [19]. Це вказує на те, що специфічні функції, які демонструє кожен морфотип, безпосередньо відповідають за загальну вірулентність цих поліморфних патогенів. Однак, в роду *Candida* є види, які існують переважно в морфології дріжджів, але залишаються вірулентними. Наприклад, є повідомлення про те, що *C. glabrata* зазвичай є дріжджами, здатними бути високо вірулентними [20]. Водночас ми з свого боку можемо лише додати, що навіть після того як дані мікроорганізми набули більш або менш вираженої стійкості, вони залишились переважно в стані дріжджів, що і є особливістю даного виду даних патогенів.

Вивчення морфології *C. glabrata* методом електронної мікроскопії показали типову для даного виду мікроорганізмів ультраструктурну організацію контрольних зразків – вихідних штамів *C. glabrata*: клітини *C. glabrata* зазвичай мали сферичну форму, інколи реєстрували поодинокі клітини, але частіше в полі зору відмічались скупчення даних мікроорганізмів у вигляді коротких ланцюжків (рис. 5А.). Розміри клітин вихідної популяції *C. glabrata* коливались від 2 до 4 мікрометрів.



**Рис. 5.** Електронна мікроскопія. Вплив формування резистентності на ультраранню *C. glabrata*. А. Вихідна культура,  $\times 3200$ ; Б. Зростання електронної щільності і зовнішнього шару  $\times 3200$ ; В. Відшаровування зовнішньої оболонки від цитоплазми  $\times 6400$ ; Г. Нерівномірність розподілу органел  $\times 4800$ .

Водночас, при електронній мікроскопії клітин *C. glabrata* після десятого пасажу в умовах формування резистентності до пропіконозолу, були зареєстровані виражені структурно – морфологічні зміни у даних мікроорганізмів, що проявлялись підвищеною електронною щільністю зовнішнього шару, яка на електронограмах проявлялась просвітленнями по периметру зовнішньої оболонки (рис. 5Б). В окремих випадках фіксували клітини з сегментарними змінами оболонки з втратою типової для неї чіткої структури, оболонка деяких клітин мала хвилясту форму і інколи відшаровувалась від цитоплазми (рис. 5В). Виявляли також нечіткість країв грибів. Цитоплазма на цьому тлі мала строкатий малюнок, очевидно, за рахунок нерівномірного розподілу органел (рис. 5Г). Однак подібні особливості морфології та ультраструктури клітин, які селекціювали в присутності інших фунгіцидів, зафіксовані не були.

**Висновки.** В результаті експериментальних досліджень встановлено, що тривалий вплив антифунгальних засобів на представників роду *Candida* spp призводить до зміни культуральних властивостей, зокрема уповільнення росту та появи малих дисоціативних культуральних форм. Зміна морфогенезу грибів в процесі набуття ними резистентності залежить в першу чергу від виду патогену, а також, від хімічної структури протигрибкового препарату. Зокрема зафіксовано виражену здатність *C. krusei* в процесі штучного моделювання резистентності до фунгіцидів групи триазолів утворювати гіфи або переходити в псевдогіфальний стан. В меншій мірі дані властивості характерні для *C. glabrata*. Крім того, електронно-мікроскопічними дослідженнями показано виражені структурно – морфологічні зміни *C. glabrata*, які формуються на 10 пасажі моделювання резистентності до пропіконозолу і проявляються підвищеною електронною щільністю зовнішнього шару, втратою типової чіткої структури та не рівномірним розподілом органел.

Таким чином, проведені експериментальні дослідження дозволили зробити аргументоване припущення, що між морфогенезом окремих видів грибів і формуванням резистентності існує складний та, можливо, еволюційний зв'язок, і якщо результати дослідження зв'язку морфогенезу мікроскопічних грибів та їх вірулентності вже відомі та активно обговорюються [28], то вплив тривалої дії протигрибкових препаратів на біологічні властивості кандид потрєбує подальшого поглибленого вивчення.

#### **Література:**

1. Wu, P.F.; Liu, W.L.; Hsieh, M.H.; Hii, I.M.; Lee, Y.L.; Lin, Y.T.; Ho, M.W.; Liu, C.E.; Chen, Y.H.; Wang, F.D. Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-albicans *Candida* species from cancer patients. *Emerg. Microbes Infect.* 2017, 6, e87.
2. Doi, A.M.; Pignatari, A.C.C.; Edmond, M.B.; Marra, A.R.; Camargo, L.F.A.; Siqueira, R.A.; da Mota, V.P.; Colombo, A.L. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. *PLoS ONE* 2016, 11, e0146909.
3. Bongomin, F.; Gago, S.; Oladele, R.O.; Denning, D.W. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J. Fungi (Basel)* 2017, 3, 57.

4. Gregory M., Schulman J. Antemortem diagnosis of disseminated fungal infection // *N. Engl. J. Med.*— 1985.— Vol. 312, N 2.— P. 124.
5. Ахрарова Л.М. Комплексная терапия больных кандидозным вульвовагинитом: Автореф. дис. ...канд. мед. наук.—М., 1993.— 18 с.
6. Belanger P., Nast C., Fratti R. et al. Voriconazole inhibits the growth and alters the morphology of fluconazole — susceptible and resistant *Candida* species // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 1997.— Vol. 41.— P. 1840—1842.
7. Braga P.C., Maci S., DallSasso M. et al. Alteration of surface morphology of *Candida albicans* produced by rilopirox: scanning electron microscopy study // *J. Chemother.*— 1995.— Vol. 7.— P. 519—524.
8. Nishiyama H., Itoyama T., Vamaguchi H. Ultrastructural alterations of *Candida albicans* induced by a new imidazole antimycotic omoconazole nitrate // *Microbiol. Immunol.*—1997.— Vol. 41.— P. 395—402.
9. Коновалова Т.С., Волощук О.М., Степаненко В.І., Широбоков В.П. Дослідження чутливості та структурно-морфологічних змін грибів роду *Candida* до системних антимікотиків триазолового ряду // *Науковий вісник Національного медичного університету імені О.О. Богомольця* – 2007. №1 (11).- 175 -188.
10. Методичні вказівки МВ 9.9.5-143-2007. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. Київ: МОЗ України (2007).
11. Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting/ Michael J. Dykstra and Laura E. Reuss –2 nd.ed. 2003. P. 535.
12. Desai, J. *Candida albicans* hyphae: from growth initiation to invasion. *J. Fungi* 2018, 4, 10
13. Sudbery, P.; Gow, N.; Berman, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2004, 12, 317–324.
14. Wang, X.; Bing, J.; Zheng, Q.; Zhang, F.; Liu, J.; Yue, H.; Tao, L.; Du, H.; Wang, Y.; Wang, H.; et al. The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects. *Emerg. Microbes Infect.* 2018, 7, 93.
15. Kim, S.H.; Iyer, K.R.; Pardeshi, L.; Muñoz, J.F.; Robbins, N.; Cuomo, C.A.; Wong, K.H.; Cowen, L.E. Genetic analysis of *Candida auris* implicates Hsp90 in morphogenesis and azole tolerance and Cdr1 in azole resistance. *MBio* 2019, 10, e02529-18.
16. Shapiro, R.S.; Robbins, N.; Cowen, L.E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2011, 75, 213–267.
17. Murad, A.M.; Leng, P.; Straffon, M.; Wishart, J.; Macaskill, S.; MacCallum, D.; Schnell, N.; Talibi, D.; Marechal, D.; Tekaiia, F.; et al. NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J.* 2001, 20, 4742–4752.
18. Sudbery, P.E. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011, 9, 737–748.
19. Moyes, D.L.; Wilson, D.; Richardson, J.P.; Mogavero, S.; Tang, S.X.; Wernecke, J.; Höfs, S.; Gratacap, R.L.; Robbins, J.; Runglall, M.; et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature* 2016, 532, 64–68.
20. Porman, A.M.; Hirakawa, M.P.; Jones, S.K.; Wang, N.; Bennett, R.J. MTL-independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for Wor1 in regulating switching and filamentation. *PLoS Genet.* 2013, 9, e1003369.
21. Thompson, D.S.; Carlisle, P.L.; Kadosh, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot. Cell* 2011, 10, 1173–1182.

### References:

1. Wu, P.F.; Liu, W.L.; Hsieh, M.H.; Hii, I.M.; Lee, Y.L.; Lin, Y.T.; Ho, M.W.; Liu, C.E.; Chen, Y.H.; Wang, F.D. Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-*albicans Candida* species from cancer patients. *Emerg. Microbes Infect.* 2017, 6, e87.

2. Doi, A.M.; Pignatari, A.C.C.; Edmond, M.B.; Marra, A.R.; Camargo, L.F.A.; Siqueira, R.A.; da Mota, V.P.; Colombo, A.L. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. *PLoS ONE* 2016, 11, e0146909.
3. Bongomin, F.; Gago, S.; Oladele, R.O.; Denning, D.W. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J. Fungi (Basel)* 2017, 3, 57.
4. Gregory M., Schulman J. Antemortem diagnosis of disseminated fungal infection // *N. Engl. J. Med.*— 1985.— Vol. 312, N 2.— P. 124.
5. Akhrrarova L.M. Kompleksnaia terapiia bolnykh kandydoznym vulvovagynitom: Avtoref. dys. ...kand. med. nauk.—M., 1993.— 18 s.
6. Belanger P., Nast C., Fratti R. et al. Voriconazole inhibits the growth and alters the morphology of fluconazole — susceptible and resistant *Candida* species // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 1997.— Vol. 41.— P. 1840—1842.
7. Braga P.C., Maci S., DallSasso M. et al. Alteration of surface morphology of *Candida albicans* produced by rilopirox: ascannin electron microscopy study // *J. Chemother.*— 1995.— Vol. 7.— P. 519—524.
8. Nishiyama H., Itoyama T., Vamaguchi H. Ultrastructural alterations of *Candida albicans* induced by a new imidasole antimycotic omoconazole nitrate // *Microbiol. Immunol.*—1997.— Vol. 41.— P. 395—402.
9. Konovalova T.S., Voloshchuk O.M., Stepanenko V.I., Shyrobokov V.P. Doslidzhennia chutlyvosti ta strukturno-sorfolohichnykh zmin hrybiv rodu *Candida* do systemnykh antymikotyktiv triazolovoho riadu // *Naukovyi visnyk Natsionalnoho medychnoho universytetu imeni O.O. Bohomoltsia* – 2007. №1 (11).- 175 -188. [in Ukrainian].
10. Metodychni vказivky MV 9.9.5-143-2007. Vyznachennia chutlyvosti mikroorhanizmiv do antybakterialnykh preparativ. Kyiv: MOZ Ukrainy (2007). [in Ukrainian].
11. Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting/ Michael J. Dykstra and Laura E. Reuss –2 nd.ed. 2003. P. 535.
12. Desai, J. *Candida albicans* hyphae: from growth initiation to invasion. *J. Fungi* 2018, 4, 10
13. Sudbery, P.; Gow, N.; Berman, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2004, 12, 317–324.
14. Wang, X.; Bing, J.; Zheng, Q.; Zhang, F.; Liu, J.; Yue, H.; Tao, L.; Du, H.; Wang, Y.; Wang, H.; et al. The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects. *Emerg. Microbes Infect.* 2018, 7, 93.
15. Kim, S.H.; Iyer, K.R.; Pardeshi, L.; Muñoz, J.F.; Robbins, N.; Cuomo, C.A.; Wong, K.H.; Cowen, L.E. Genetic analysis of *Candida auris* implicates Hsp90 in morphogenesis and azole tolerance and Cdr1 in azole resistance. *MBio* 2019, 10, e02529-18.
16. Shapiro, R.S.; Robbins, N.; Cowen, L.E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2011, 75, 213–267.
17. Murad, A.M.; Leng, P.; Straffon, M.; Wishart, J.; Macaskill, S.; MacCallum, D.; Schnell, N.; Talibi, D.; Marechal, D.; Tekai, F.; et al. NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J.* 2001, 20, 4742–4752.
18. Sudbery, P.E. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011, 9, 737–748.
19. Moyes, D.L.; Wilson, D.; Richardson, J.P.; Mogavero, S.; Tang, S.X.; Wernecke, J.; Höfs, S.; Gratacap, R.L.; Robbins, J.; Runglall, M.; et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature* 2016, 532, 64–68.
20. Porman, A.M.; Hirakawa, M.P.; Jones, S.K.; Wang, N.; Bennett, R.J. MTL-independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for Wor1 in regulating switching and filamentation. *PLoS Genet.* 2013, 9, e1003369.
21. Thompson, D.S.; Carlisle, P.L.; Kadosh, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot. Cell* 2011, 10, 1173–1182.