



Железозависимость биологических свойств *Candida albicans*

Леонов В.В.¹ • Миронов А.Ю.²

Леонов Вадим Вячеславович – канд. техн. наук, доцент кафедры микробиологии лечебного факультета¹

Миронов Андрей Юрьевич – д-р мед. наук, профессор, руководитель отдела микробиологии²

✉ 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, Российская Федерация.
Тел.: +7 (495) 380 20 19.
E-mail: andy.60@mail.ru

Актуальность. Кандидозы возникают у иммунокомпromетированных лиц с дефектами гуморального или клеточного звеньев иммунитета. Любые нарушения обмена железа способствуют развитию иммунодефицита и изменению инфекционной чувствительности. Возможность изменения биологических свойств грибов рода *Candida* при нарушениях обмена железа не обсуждалась. **Цель** – выяснить влияние нарушений обмена железа на модификацию биологических свойств *C. albicans*. **Материал и методы.** С помощью турбидиметрического метода изучалась кинетика роста референтного штамма (24433 ATCC) и клинических изолятов *C. albicans* в бульоне (n=20) в зависимости от концентрации ионов Fe²⁺ и в сыворотке крови доноров с разным вариантом обмена железа (n=2). Определялась экспрессия гена адгезии (*als3*), генов фосфолипаз C (*plb1*, *plb2*, *plc*), гена аспартильной протеазы (*sap1*) в сыворотке крови доноров с разным содержанием железа. **Результаты.** Активность роста всех изученных штаммов *C. albicans* зависит от концентрации железа в питательной среде. Расчет значений константы сродства к ионам Fe²⁺ (K_s) для штаммов *C. albicans* показал, что они изменяются от 179,5 до 1863,3 мкМ. Клинические

изоляты отличаются большей железозависимостью (179,5 < K_s < 1000 мкМ) по сравнению с референтным штаммом 24433 ATCC (K_s = 1199,5 ± 28,3 мкМ). Оптимальная концентрация железа для роста в бульоне составляет 30–50 мкМ. Сыворотка крови с нормальным обменом железа ингибирует ростовую активность *C. albicans* и увеличивает экспрессию всех изученных генов патогенности. Культивирование *C. albicans* в железodefицитной и железонагруженной сыворотках увеличивает скорость роста до 0,017 ч⁻¹ и 0,012 ч⁻¹ соответственно, но уменьшает экспрессию основных генов патогенности. **Заключение.** Биологические свойства *C. albicans* изменяются в зависимости от состояния обмена железа организма хозяина. При нормальном обмене железа иммунная система подавляет развитие кандид. Избыточное накопление железа способствует возникновению кандидоза, при дефиците железа исход инфекции будет зависеть от состояния иммунного статуса организма хозяина.

Ключевые слова: *Candida albicans*, кандидоз, обмен железа, биопленки, кинетика роста, фосфолипазы C, адгезия, аспартильные протеазы

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-133-137

¹ БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия»; 628011, г. Ханты-Мансийск, ул. Мира, 40, Российская Федерация

² ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, Российская Федерация

Грибы рода *Candida* входят в состав нормальной микробиоты организма человека. Для возникновения кандидозов нужны условия, при которых эти грибы начинают проявлять свои патогенные свойства. Факторы,

способствующие развитию кандидозов, разделяют на экзогенные и эндогенные. Результатом заболевания, патогенез которого обусловлен активацией факторов эндогенного происхождения, становится иммунодефицит организма хозяина

[1]. Нарушения обмена железа как в сторону избыточного его накопления, так и дефицита угнетают клеточное и гуморальное звенья иммунитета, ведя к изменению инфекционной чувствительности организма хозяина [2, 3]. Опубликовано немало работ, посвященных биологии грибов рода *Candida* и кандидозам [1]. Возможность изменения биологических свойств грибов рода *Candida* при нарушениях обмена железа не обсуждалась. Цель нашей работы – выяснить влияние нарушений обмена железа на изменение биологических свойств *C. albicans*.

Материал и методы

Изучены биологические свойства 20 штаммов *C. albicans*, выделенных из фекалий, крови, влагалища, мокроты, раневого отделяемого больных Окружной клинической больницы г. Ханты-Мансийска. В качестве референтного использовали штамм *C. albicans* 24433 АТСС. Для всех штаммов изучалась кинетика роста в бульоне и сыворотке крови. Определение ростовой активности грибов осуществлялось посевом в физиологическом растворе микробной взвеси, стандартизированной до 3 McF в бульон Сабуро с разным содержанием железа и сыворотку доноров с разными вариантами обмена железа. Посевы выращивали с помощью прибора Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific) при 37 °С, позволяющего контролировать турбидиметрическим методом рост микроорганизмов в автоматическом режиме ($\lambda = 540$ нм). Скорость экспоненциального роста (μ) определяли по тангенсу угла наклона касательной к начальному участку кривой роста, построенной в полулогарифмических координатах. Для характеристики железозависимости штаммов рассчитаны константы сродства *C. albicans* к железу – K_s (мкМ). Значения K_s позволяют судить о степени железозависимости штамма [2, 4]: чем оно меньше, тем больше сродство *C. albicans* к железу, и наоборот.

Сыворотку крови получали общепринятыми методами. Для экспериментов по изучению кинетики роста использовали сыворотку доноров с нормальным обменом железа, железodefицитной анемией, а также избытком железа, который создавался искусственно путем добавления стерильного раствора цитрата железа. Контроль параметров обмена железа (содержание гемоглобина – Hb, ферритина, сывороточного железа – $[Fe^{2+}]_{сыв.}$, общая железосвязывающая способность сыворотки – ОЖСС) осуществляли на автоматическом биохимическом анализаторе Beckman Coulter AU480 (США) и феррозиновым способом с применением

набора IRON (ChronolabAG, Швейцария). Для подтверждения истинной железodefицитной анемии, согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения, использовали следующие показатели: $[Fe^{2+}]_{сыв.} < 10$ мкМ и ОЖСС > 70 мкМ на фоне снижения уровней ферритина и Hb. Содержание $[Fe^{2+}]_{сыв.}$ от 10 до 25 мкМ принимали за норму, $[Fe^{2+}]_{сыв.} \geq 50$ мкМ считали избыточным.

Изучение экспрессии генов патогенности в зависимости от концентрации сывороточного железа проводилось в сыворотке здоровых доноров, в которую добавляли цитрат железа (II) до $[Fe^{2+}]_{сыв.} \geq 50$ мкМ (моделирование избытка) и хелатора железа – феррозина (моделирование дефицита железа). Данный эксперимент позволил нивелировать влияние прочих условий на экспрессию генов. Для изучения экспрессии генов факторов патогенности *C. albicans* выбраны: ген *als3* – фактор адгезии; гены фосфолипаз *C plb1*, *plb2*, *plc*, ген аспартильной протеазы *sap1*. Считается, что этим факторам принадлежит главная роль в патогенезе кандидозов разной локализации [5, 6]. В качестве гена «домашнего хозяйства» использован ген изоцитратлиазы – *icl*. Праймеры и наборы для обратной транскрипции произведены ЗАО Евроген (Россия). Для проведения полимеразной цепной реакции использован термоциклер CFX 96 (Bio-Rad, США). Данные проанализированы ΔC_t -методом с применением референт-гена, который используется для относительной количественной оценки экспрессии генов [7]. Уровень экспрессии генов выражался в условных единицах. Структура праймеров и условия полимеразной цепной реакции описаны в работах [8–10].

Все исследования проведены в соответствии с принципами надлежащей клинической и лабораторной практики (Good Clinical Practice – GCP, Good Laboratory Practice – GLP), одобрены на заседании локального этического комитета БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия» (рег. номер 106 от 11.05.2016).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Office Excel 2003. Рассчитывали средние арифметические значения (M) и доверительные интервалы (δ). Для расчета границ доверительного интервала использовали t -критерий при доверительной вероятности $p=0,95$ и числе степеней свободы $f=2$ (кинетика роста) и 4 (экспрессия генов).

Результаты и обсуждение

Для всех штаммов *C. albicans* зависимость удельной скорости роста от $[Fe^{2+}]$ в питательной среде описывалась кривой с экстремумом (рис. 1).



Рост эталонного штамма *C. albicans* ATCC 24433, в отличие от клинических изолятов, мало зависел от $[Fe^{2+}]$, скорость роста изменялась от 0,65 до 0,67 ч⁻¹. Для штамма 273 (кровь) кривая зависимости скорости роста от концентрации железа была наиболее выражена, наименьшая скорость роста 0,62 ч⁻¹ наблюдалась при отсутствии железа в среде, увеличение $[Fe^{2+}]$ до 50 мкМ вело к возрастанию скорости роста до максимального значения – 0,75 ч⁻¹. Ингибирование роста этого штамма при $[Fe^{2+}] = 60$ мкМ происходило сильнее, чем для других. Можно предположить, что штамм 273 более железозависим. Оптимальная $[Fe^{2+}]$ для роста всех исследованных штаммов *C. albicans* составляла 30–50 мкМ, увеличение концентрации до 60 мкМ вело к ингибированию роста.

Расчет значений K_s к ионам Fe^{2+} для штаммов *C. albicans* показал, что они изменяются от 179,5 мкМ для штамма 273 до 1863,3 мкМ для штамма 192 (влагище). В соответствии со значениями K_s все штаммы *C. albicans* разделены на две группы:

- $K_s < 1000$ мкМ – сильно железозависимые;
- $K_s \geq 1000$ мкМ – слабо железозависимые.

Из 20 исследованных штаммов *C. albicans* все штаммы, выделенные от пациентов, за исключением 192, отнесены к группе сильно железозависимых. Сравнение значений K_s с аналогичными показателями для бактерий ($K_s = 3–211$ мкМ) [4] позволяет сделать заключение, что *C. albicans* – микроорганизм, менее зависимый от содержания железа в среде культивирования.

Для приближения эксперимента к условиям *in vivo* на следующем этапе исследования изучалась кинетика роста и экспрессия специфических факторов патогенности *C. albicans* в сыворотках крови

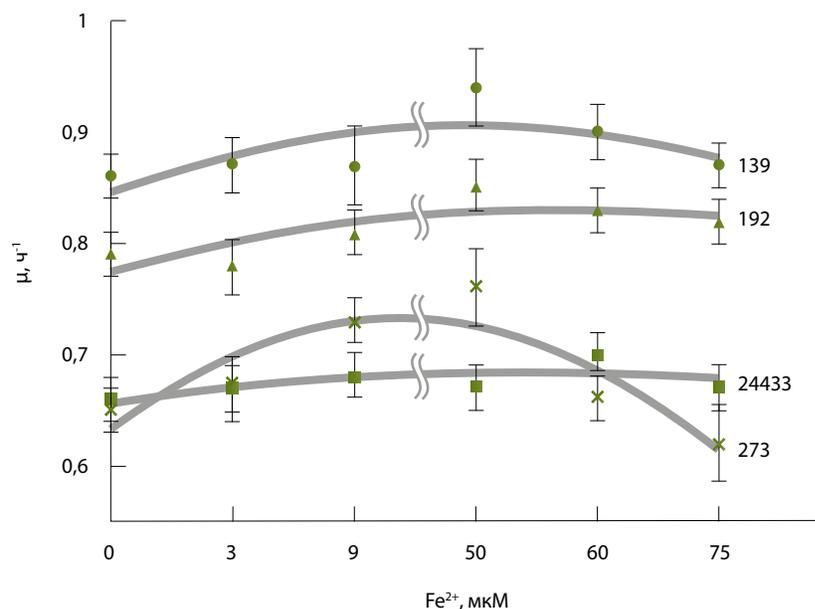


Рис. 1. Зависимость удельной скорости роста для штаммов *C. albicans* от $[Fe^{2+}]$ в питательной среде; μ – удельная скорость роста штамма, ч⁻¹; $[Fe^{2+}]$ – концентрация ионов Fe^{2+} в питательной среде, мкМ

здоровых доноров и доноров с нарушениями обмена железа.

Рост *C. albicans* 24433 ATCC в сыворотке с нормальным обменом железа не наблюдался в течение всего периода культивирования (рис. 2). Скорость роста *C. albicans* 24433 ATCC в железодефицитной сыворотке составляла 0,017 ч⁻¹ и была незначительно выше скорости роста в сыворотке с избыточным содержанием железа 0,012 ч⁻¹. Несмотря на это, кривая роста кандид в железонагруженной сыворотке быстрее достигала стационарной фазы роста

Экспрессия генов патогенности *C. albicans* 24433 ATCC в сыворотке крови в зависимости от содержания железа

Ген	$[Fe^{2+}]_{сыв.}$, мкМ	
	0*	50,5 ± 0,01***
<i>als3</i>	2,8 ± 0,2	193,0 ± 3,3
<i>plc</i>	0,9 ± 0,3	17,2 ± 2,5
<i>plb1</i>	0,6 ± 0,3	1,9 ± 0,8
<i>plb2</i>	3,9 ± 0,5	82,8 ± 0,2
<i>sap1</i>	5,1 ± 1,6	385,9 ± 54,5

Данные представлены в виде среднего арифметического значения (M) и 95% доверительного интервала (δ)

* сыворотка с хелатором железа

** сыворотка с нормальным содержанием железа

*** сыворотка с цитратом железа (II)

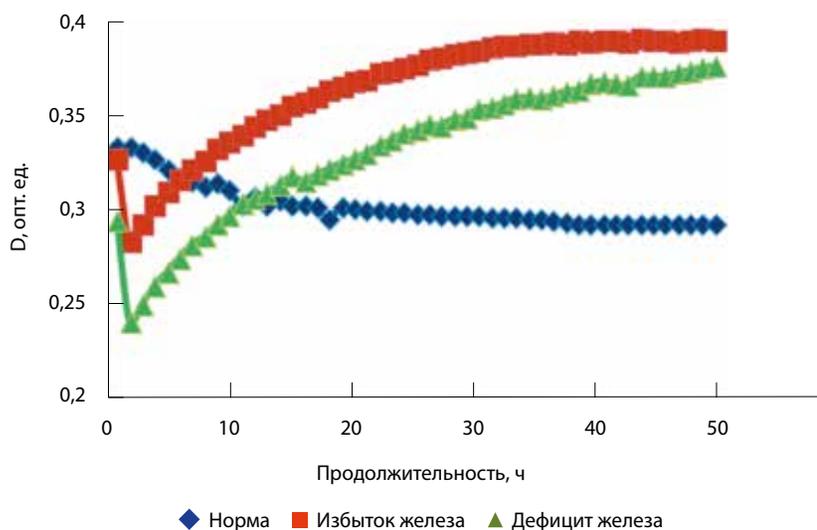


Рис. 2. Кривые роста *C. albicans* 24433 ATCC в сыворотке крови доноров с разным содержанием железа

и урожай культуры в железонагруженной сыворотке был выше, чем в сыворотке с дефицитом железа. Продолжительность лаг-фазы составляла 2,5–3 ч. Максимальная плотность популяции достигалась через 25–30 ч культивирования для *C. albicans* 24433 ATCC. Результаты принципиально не изменились при использовании клинических изолятов *C. albicans* и замене донора крови.

Изучена экспрессия наиболее важных факторов патогенности *C. albicans* в сыворотке в зависимости от варианта обмена железа (таблица). В железodefицитных условиях значения экспрессии факторов патогенности *C. albicans* очень низки. Таким образом, экспрессия этих генов в железodefицитной сыворотке практически не происходит. Сыворотка с нормальным содержанием железа (18,3 мкМ) инициировала экспрессию генов *als3*, *plb2*, *plc*, *sap1*, изменение экспрессии гена фосфолипазы *C plb1* не достоверно. Наибольшая зависимость от концентрации железа наблюдалась для генов *als3*, *plb2*, *sap1*, их экспрессия при увеличении концентрации

сывороточного железа возрастала в 199, 167, 335 раз соответственно. Наименьшая железозависимость экспрессии наблюдалась для гена *plc*, его экспрессия в указанных условиях увеличивалась лишь в 22 раза. Аналогичные тенденции выявлены при использовании вместо референтного штамма 24433 клинического изолята 9583 (кровь).

Несмотря на стимуляцию экспрессии факторов патогенности сывороткой с нормальным обменом железа, рост кандид подавляется эффекторными механизмами врожденного иммунитета. Нарушения обмена железа в сторону избыточного накопления стимулируют активность роста *C. albicans* и экспрессию ведущих генов патогенности. При дефиците сывороточного железа подавляется экспрессия всех изученных генов патогенности при одновременной стимуляции активности роста. Полученные результаты позволяют высказать предположение об инфектологических механизмах возникновения кандидозной инфекции на фоне нарушений обмена железа. При нормальном обмене железа гуморальные и клеточные механизмы врожденного иммунитета подавляют развитие кандидоза. Избыточное накопление железа способствует возникновению кандидоза, при дефиците железа исход инфекции будет зависеть от активности механизмов врожденного иммунитета.

Заключение

Биологические свойства *C. albicans* изменяются в зависимости от обмена железа организма хозяина. Оптимальная концентрация железа для роста в бульоне составляет 30–50 мкМ. Клинические изоляты отличаются большей железозависимостью по сравнению с референтным штаммом 24433 ATCC. Сывороточное железо регулирует экспрессию генов патогенности *als3*, *sap1*, *plb1*, *plb2*, *plc*, кодирующих наиболее важные факторы адгезии и инвазии *C. albicans*; максимальная экспрессия данных генов наблюдается при $[Fe^{2+}]_{сыв.}$, соответствующей физиологической норме, и уменьшается при избытке и дефиците $[Fe^{2+}]_{сыв.}$ Ⓔ

Литература

1. Реброва РН. Грибы рода *Candida* при заболеваниях негрибковой этиологии. М.: Медицина; 1989. 132 с.
2. Леонов ВВ, Миронов АЮ. Железо и микроорганизмы. Ханты-Мансийск: Печатный мир г. Ханты-Мансийск; 2016. 190 с.
3. Миронов АЮ, Леонов ВВ. Железо, вирулентность и межмикробные взаимодействия условно-патогенных микробов. Успехи современной биологии. 2016;136(3):301–10.
4. Леонов ВВ, Молчанова ТН. Влияние железа на ростовые характеристики условно-патогенных бактерий. Медицинская наука и образование Урала. 2011;(4):41–3.
5. Fallon K, Bausch K, Noonan J, Huguene E, Tamburini P. Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun*. 1997;65(2):551–6.
6. Чеботарь ИВ. Аспаратат протеазы грибов рода *Candida* – потенциальная мишень для антивирулентной терапии. Клиническая дерматология и венерология. 2012;10(1): 33–8.
7. Ермилова ЕВ, Залуцкая ЖМ, Лапина ТВ, Матвеева ТВ. Количественный анализ экспрессии генов. Учебное пособие. СПб.: ТЕС-СА; 2010. 104 с.
8. Nas T, Kalkanci A, Fidan I, Hizel K, Bolat S, Yolbakan S, Yilmaz E, Ozkan S, Kustimur S. Expression of ALS1, HWP1 and SAP4 genes in *Candida albicans* strains isolated from



women with vaginitis. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008;53(2):179–83.

9. Samaranayake YH, Cheung BP, Yau JY, Yeung SK, Samaranayake LP. Human serum promotes *Candida albicans* biofilm growth

and virulence gene expression on silicone biomaterial. *PLoS One*. 2013;8(5):e62902. doi: 10.1371/journal.pone.0062902.

10. Леонов ВВ, Булатов ИА, Миронов АЮ. Рост и экспрессия факторов вирулентности

условно-патогенных микроорганизмов в сыворотке крови при разных вариантах гомеостаза железа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016;61(8):498–501. doi: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-498-501.

References

1. Rebrova RN. Fungi of the genus *Candida* fungus-free at disease etiology. Moscow: Meditsina; 1989. 132 p. Russian.
2. Leonov VV, Mironov AYU. Iron and microorganisms. *Khanty-Mansiysk: Pechatnyy mir g. Khanty-Mansiysk*; 2016. 190 p. Russian.
3. Mironov AYU, Leonov VV. Iron, virulence and intermicrobial interactions of opportunistic pathogens. *Biology Bulletin Reviews*. 2016;136(3):301–10. Russian.
4. Leonov VV, Molchanova TN. Effect of iron on the growth characteristics of opportunistic bacteria. *Medical Science and Education of Ural*. 2011;(4):41–3. Russian.

5. Fallon K, Bausch K, Noonan J, Huguenel E, Tamburini P. Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun*. 1997;65(2):551–6.
6. Chebotar' IV. Aspartate proteases of *Candida* fungi – a potential target for anti-virulent therapy. *The Russian Journal of Dermatology and Venereology*. 2012;10(1):33–8. Russian.
7. Ermilova EV, Zalutskaya ZhM, Lapina TV, Matveeva TV. Quantitative analysis of gene expression. Saint Petersburg: TESSA; 2010. 104 p. Russian.
8. Nas T, Kalkanci A, Fidan I, Hizel K, Bolat S, Yobakan S, Yilmaz E, Ozkan S, Kustimur S. Expression of ALS1, HWP1 and SAP4 genes in *Candida*

- albicans strains isolated from women with vaginitis. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008;53(2):179–83.
9. Samaranayake YH, Cheung BP, Yau JY, Yeung SK, Samaranayake LP. Human serum promotes *Candida albicans* biofilm growth and virulence gene expression on silicone biomaterial. *PLoS One*. 2013;8(5):e62902. doi: 10.1371/journal.pone.0062902.
10. Leonov VV, Bulatov IA, Mironov AYU. The increasing and expression of virulence factors of opportunistic microorganisms in blood serum under various alternatives of iron homeostasis. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2016;61(1):498–501. Russian. doi: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-498-501.

Iron-dependency of biological properties of *Candida albicans*

Leonov V.V.¹ • Mironov A.Yu.²

Background: Candidal infections occur in individuals with humoral or cell immunity deficiency. Any disorders of iron metabolism promote immune deficiency and abnormal sensitivity to infections. Potential modification of biological properties of *Candida* spp. in disorders of iron metabolism has not been discussed. **Aim:** To clarify the effects of iron metabolism disorders on the modification of biological properties of *C. albicans*. **Materials and methods:** Growth kinetics of reference strain (24433 ATCC) and clinical isolates of *C. albicans* (n=20) depending on the concentration of Fe²⁺ ions in the broth and serum of blood donors with various types of iron metabolism (n=2) was studied by turbidimetry. We also assessed the expression of the adhesion gen (*als3*), hemolytic phospholipase C genes (*plb1*, *plb2*, *plc*) and aspartic protease gene (*sap1*) in serum of donors with various iron levels. **Results:** Growth parameters of all *C. albicans* strains studied depends on the iron levels in the medium. The calculated constant of affinity to Fe²⁺ (K_s) for *C. albicans* strains was in the range from 179.5 to 1863.3 μM. Clinical isolates are more iron-dependent (179.5 < K_s < 1000 μM), compared to the

reference strain ATCC 24433 (K_s = 1199.5 ± 28.3 μM). The optimal concentration of iron for the growth in the broth is 30 to 50 μM. The serum from individuals with normal iron metabolism inhibits the growth activity of *C. albicans* and is associated with overexpression of all virulence genes studied. Incubation of *C. albicans* with iron-deficient and iron-loaded sera results in an increase in the growth rate up to 0.017 h⁻¹ and 0.012 h⁻¹, respectively, but is associated with a reduction in expression of the major virulence genes. **Conclusion:** Biological properties of *C. albicans* are modified depending on the iron metabolism of the host. In those with normal iron metabolism, immune system suppresses *Candida* growth. Excess iron levels may promote candidiasis, whereas in iron deficient states the outcome of infection depends on the immune status of the host.

Key words: *Candida albicans*, candidiasis, iron metabolism, biofilm, growth kinetics, phospholipases C, adhesion, aspartic proteases

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-133-137

Leonov Vadim V. – PhD (in Engineering), Associate Professor, Chair of Microbiology¹

Mironov Andrey Yu. – MD, PhD, Professor, Chief of Department of Microbiology²

✉ 10 Admirala Makarova ul., Moscow, 125212, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 380 20 19. E-mail: andy.60@mail.ru

¹ Khanty-Mansiysk State Medical Academy; 40 Mira ul., Khanty-Mansiysk, 628011, Russian Federation

² G.N. Gabrichevsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 10 Admirala Makarova ul., Moscow, 125212, Russian Federation