

**СООТНОСИТЕЛЬНЫЙ ВКЛАД ГИПЕРЭКСПРЕССИИ И МУТАЦИЙ ГЕНА *ERG11* В  
ФОРМИРОВАНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *C. albicans* К ТРИАЗОЛОВЫМ  
ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ  
НЕСВИЖСКИЙ Ю.В.**

Научно-практический журнал «Актуальные вопросы биомедицинских исследований», Том 1, № 1. Опубликовано 29 декабря 2024

Цитирование: Соотносительный вклад гиперэкспрессии и мутаций гена *ERG11* в формирование резистентности *C. albicans* к триазоловым противогрибковым препаратам. (2025). Актуальные вопросы биомедицинских исследований, 1(1). <https://biomedscience.ru/index.php/journal/article/view/3>

## **ВВЕДЕНИЕ**

Проблема резистентности микробов к противомикробным антибиотическим препаратам не обошла стороной и грибы рода *Candida*, которые способны вызывать гнойно-воспалительные и септические процессы, особенно у иммунокомпрометированных пациентов [\*]. Однако широкое применение флуконазола в профилактике и терапии кандидозной инфекции привело к широкому распространению устойчивости этих грибов к азоловым препаратам [\*].

Одним из механизмов резистентности к антимикотикам у грибов *Candida spp.* является повышенная экспрессия генов, кодирующих синтез мишени лекарственного препарата. В этом плане немаловажную роль играет ген *ERG11*, определяющий структуру ланостерол 14 $\alpha$ -деметилазы, участвующей в синтезе эргостерола, важного компонента клеточной стенки гриба. Гиперэкспрессия гена *ERG11* обеспечивает синтез большого количества эргостерола, что в итоге делает грибы рода *Candida* малочувствительными к терапевтическим дозам препаратов азолового ряда [1].

Между тем, в последнее время в гене *ERG11* был обнаружен ряд несинонимичных мутаций, способных модифицировать эффекты данного гена, как в сторону снижения, так и повышения чувствительности грибов рода *Candida* к азолам [4-10]. Например, согласно полученным нами данным [\*], мутации в гене *ERG11* снижали эффекты его гиперэкспрессии и уменьшали МИК триазоловых препаратов в мутантных штаммах *Candida albicans* до 100 раз. При этом полной отмены исходной резистентности не наблюдалось. Примечательно, что гиперэкспрессия гена *ERG11* и его мутации проявляются в различных штаммах *Candida spp.* относительно независимо [\*,\*].

Совершенно очевидно, что оба отмеченных вида генетической изменчивости участвуют в формировании популяционного разнообразия грибов рода *Candida* по степени чувствительности к азолам. Однако до сих пор не ясен долевого вклад гиперэкспрессии и мутаций гена *ERG11* в это биологическое явление. Представляется, что исследование данного вопроса может составить четкое представление о стратегии выживания *Candida spp.* в условиях массивного медикаментозного воздействия и перспективных векторах управления эпидемией микробной резистентности.

Сказанное определило **ЦЕЛЬ** настоящего исследования: изучение соотносительного вклада гиперэкспрессии гена *ERG11* и его отдельных мутаций в формирование популяционного разнообразия чувствительности *C. albicans* к триазоловым противогрибковым препаратам.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

Исследование выполнено на 10 штаммах грибов *C. albicans*, из коллекции ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, изначально устойчивых к действию флуконазола и вориконазола.

Штаммы грибов *C. albicans* были выделены из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов в возрасте от 20 до 69 лет с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза, находившихся на стационарном лечении в КИБ №2 г. Москвы.

ВИЧ-инфекция у всех пациентов была диагностирована на основании клинико-эпидемиологических данных и подтверждена обнаружением специфических антител/антигенов методом иммуноферментного анализа и лизантного иммунного блотинга к белкам вируса иммунодефицита человека (*Profiblot 48 TECAN*, АвтоБлот 3000) в соответствии с клинической классификацией ВИЧ-инфекции по Покровскому В.И. (2001) в модификации 2006 г.<sup>1</sup>. У всех обследованных лиц было получено информированное согласие на использование данных лабораторных анализов в научных целях. Все исследования проведены с согласия Комитета по этике при ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 25.04.2014 г.) на основании требований Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» от июня 1964 г.

Видовая идентификация грибов *C. albicans* производилась различными методами:

- По биохимической активности при помощи тест-систем *Remel RapID YEAST PLUS* (США) и *ErbaLachema* (Чехия) при 37°C в соответствии с инструкцией производителя. Учет результатов производился визуально или полуавтоматически в каждой отдельной лунке, интерпретация - в соответствии с инструкцией производителя, либо с помощью официального программного обеспечения.

- В мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием набора реагентов для одновременного выявления ДНК *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. krusei* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс *C. albicans/C. glabrata/C. krusei* – МУЛЬТИПРАЙМ-FL». Выделение ДНК проводили из чистых культур *Candida spp.* с помощью наборов реагентов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «ДНК-сорб-АМ» в соответствии с инструкцией производителя. При постановке ПЦР-РВ применяли амплификатор *Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System* (США).

Исследовали чувствительность к представителям триазолов (позаконазол, вориконазол, итраконазол, флуконазол) и эхинокандинов (анидулафунгин, микафунгин, каспофунгин). Анализ проводили в соответствии с рекомендациями Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, основанных на стандартах *CLSI M44* и *M60* для грибов и стандартах и критериях Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам (*EUCAST*) для метода микроразведений и бактериальных культур<sup>2</sup>.

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) препарата в мг/мл определяли методом серийных микроразведений с помощью планшетов *Sensititre YeastOne10 (Trek diagnostic system, Великобритания)* в соответствии с инструкцией производителя. Для этого инокулят подготавливался аналогично диско-диффузионному методу, после чего вносился в модифицированную среду *RPMI-1640* и распределялся по 96-луночным планшетам для серийных микроразведений с предварительно внесенными субстанциями антимикотиков [11]. Учет

<sup>1</sup> Российская клиническая классификация ВИЧ-инфекции. (Приказ МЗ СР РФ от 17.03.2006 №166) // <https://base.garant.ru/12145892/>

Russian clinical classification of HIV infection (Order of the Ministry of health CP of the Russian Federation of 17.03.2006 №166). <https://base.garant.ru/12145892/> (In Russ.)

<sup>2</sup> Рекомендации МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2021)» <https://www.antibiotic.ru/minzdrav/category/clinical-recommendations/> МАКМАН Recommendations "Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs (2021)" <https://www.antibiotic.ru/minzdrav/category/clinical-recommendations/>

результатов производился визуально, по сравнению с ростом в лунке с положительным контролем в соответствии с критериями *EUCAST* [12].

Для обеспечения сопоставимости данных результаты отдельных исследований МИК штаммов *C. albicans* к каждому антимикотическому препарату были взвешены по среднему значению МИК для данного препарата. В дальнейшем анализировали приведенные/полученные значения.

Уровни экспрессии гена *ERG11* были измерены с помощью количественной ПЦР и метода  $2\text{-}\Delta\Delta C_t$  для анализа [13]. Выделение РНК проводилось из суточной чистой культуры исследуемых штаммов с помощью реагента для выделения суммарной РНК *ExtractRNA* (ЗАО Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Обратная транскрипция проводилась с помощью набора Реверта-*L* (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя: 30 минут при  $37^\circ\text{C}$ . В работе использовались следующие праймеры:

- *ERG11-F aactacttttgtttataatttaagatggactattga*
- *ERG11-R aatgatttctgctggttcagtaggt*
- *PMA1-F ttgaagatgaccaccaatcc*
- *PMA1-R gaaacctctggaagcaaatgg*
- *ACT1-F ttggtgatgaagcccaatcc*
- *ACT1-R catatcgtcccagttggaaca*

Аmplификация проводилась с помощью набора реактивов для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя Sybr-Green I (ЗАО Синтол, Россия) с использованием амплификатора Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (США) со следующими параметрами:  $95^\circ\text{C}$ , 3 минуты, 40 циклов  $95^\circ\text{C}$ , 10 секунд,  $55^\circ\text{C}$ , 20 секунд.

Гены домашнего хозяйства *ACT* и *PMA* использовались в качестве контрольных генов. Базовые значения  $2\text{-}\Delta\Delta C_t$  для гена *ERG11* получены при исследовании чувствительных изолятов ( $n=7$ ). Уровень экспрессии исследуемого штамма считался достоверно повышенным в случае, если он превышал базовые средние значения для чувствительных изолятов ( $m$ ) более чем на 3 стандартных отклонения ( $3\sigma$ ).

Для секвенирования гена *ERG11* по Сэнгеру [14] использовались праймеры:

- *ERG11-1-F atggctattgtgaaactgtcatt*
- *ERG11-1-R ggatcaatatacaccagttctc*
- *ERG11-2-F attggagacgtgatgctgtctcaa*
- *ERG11-2-R ccaaatgatttctgctggttcagt*

Аmplификация гена *ERG11* для секвенирования проводилась с использованием набора реактивов *Qiagen PCR Master Mix*, 2x (Германия) по следующей программе с использованием прибора *Applied Biosystems Veriti* (США):  $95^\circ\text{C}$  15 минут, 35 циклов  $95^\circ\text{C}$  40 секунд,  $60^\circ\text{C}$  40 секунд,  $72^\circ\text{C}$  1,5 минуты, затем  $72^\circ\text{C}$  10 минут. Очистка продуктов ПЦР проводилась с помощью набора *ExoSAP-IT* (Thermo Fisher Scientific Inc, США) в соответствии с инструкцией производителя. Реакция секвенирования проводилась с помощью набора реагентов *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied biosystems, США) со следующими параметрами:  $95^\circ\text{C}$  15 минут, 35 циклов  $95^\circ\text{C}$  15 секунд,  $55^\circ\text{C}$  15 секунд,  $72^\circ\text{C}$  30 секунд, затем  $72^\circ\text{C}$  7 минут.

Очистка продуктов производилась с помощью набора реагентов *BigDye Xterminator Purification Kit* (Applied biosystems, США). Для секвенирования использовался генетический анализатор 3500 Applied Biosystems (*Applied Biosystems*, США).

Для статистического анализа и визуализации данных использовалось программное обеспечение *Microsoft Excel*, *SciPy* [15], *Matplotlib* [16]. Для оценки значимости различий между группами использовался точный критерий Фишера для дискретных величин и *U*-критерий Манна-Уитни для непрерывных. Анализ тесноты связей определяли корреляционным анализом Пирсона. Вклад фактора в популяционную изменчивость признака оценивали в одно и двухфакторном анализе с повторами (ANOVA). Критический уровень ошибки при проверке статистических гипотез принимался за общепринятую в медицине величину  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования в 7 из 10 исследованных штаммов *C. albicans* (70,0%) были обнаружены те или иные генетические изменения, в том числе, в 6 штаммах (60,0%) была выявлена повышенная экспрессия гена *ERG11*, в 7 штаммах (70,0%) в структуре гена *ERG11* – различные мутации.

Общее число обнаруженных мутаций составило 13, или в среднем 1,86 на штамм. Было идентифицировано 5 вариантов мутаций: E266D, G464S, I471L, D116E и V488I (Табл. 1). Наиболее частой была мутация E266D (57,1% штаммов), редкой – I471L (8,3%). При этом 6 штаммов из 7 оказались носителями сочетанных, двукомпонентных мутаций, 1 штамм - изолированной мутации G464S.

Таблица 1

Mutations identified in the ERG11 gene

Mutations	Abs.	%
E266D	4	30,8
G464S	2	15,4
I471L	1	7,7
D116E	3	23,1
V488I	3	23,1
Всего	13	100,0

Все исследованные штаммы *C. albicans* были подразделены на 3 группы в соответствии с обнаруженными генетическими изменениями: 1 группа (2 штамма) обладают только повышенной экспрессией гена *ERG11*, 2 группа (3 штамма) - только мутациями в данном гене и 3 группа (4 штамма) - одновременно экспрессируют оба вида генетических изменений.

МИК антимикотических препаратов при различных генетических изменениях в *C. albicans* ( $X \pm m$ ) представлены в Табл. 2, из которой видно, что различия между отдельными препаратами внутри фармацевтических групп для каждого из вариантов генетических изменений отсутствуют и имеют единую направленность ( $p > 0,05$ ). Данный факт позволил нам объединить результаты исследования МИК в соответствии со структурой фармакологических препаратов в 2 группы: «Триазолы» и «Эхинокандины». Суммарные результаты исследования представлены в Табл. 3 и 4.

Сравнительный анализ МИК Триазолов и Эхинокандинов показал, что в 1 группе штаммов МИК первых была в 1,47 раза выше, чем вторых ( $p > 0,05$ ), во 2 группе - в 9,79 раз ( $p < 0,001$ ), а в 3 группе – в 3,22 раза ( $p < 0,001$ ). Кроме того, МИК Триазолов в 1 группе был в 16,59 раз ( $p < 0,05$ ) выше, чем в группе 2, и в 5,22 раза выше ( $p < 0,05$ ), чем в 3 группе. В то же время МИК Триазолов в 3 группе была выше, чем во 2 группе в 3,22 раза ( $p > 0,05$ ). 1 группу штаммов по сравнению с другими отличала наиболее высокая дисперсия значений МИК Триазолов ( $p < 0,001$ ). Группы 2 и 3 не отличались по данному показателю. Сравнимые группы штаммов существенно не

отличались между собой по средней величине и дисперсии значений МИК Эхинокандинов ( $p > 0,05$ ).

Оценка влияния различных генетических изменений на степень варьирования МИК Триазолов в исследованной популяции *C.albicans* с использованием однофакторного анализа показало (Рис. 1), что совокупный эффект этих факторов составляет 33,45% ( $p < 0,001$ ). При этом наибольшую значимость в генезе этого явления имеет изолированное действие повышенной экспрессии гена *ERG11*, что в 2,67 раза превосходит эффект изолированного действия мутаций и в 6,67 раз – сочетанного действия гиперэкспрессии и мутаций.

Для расчета соотносительного влияния рассматриваемых генетических изменений в популяционном рассеянии уровней МИК Триазолов в исследуемой популяции *C.albicans* применили двухфакторный дисперсионный анализ (Рис. 2). Как можно видеть, на долю изолированного действия гиперэкспрессии гена *ERG11* приходится почти половина (49,1%) эффектов всех генетических изменений, что более, чем в 2 раза, превышает вклад изолированных мутаций. При этом Совокупный вклад всех случаев гиперэкспрессии гена *ERG11* в формирование дисперсии уровней МИК Триазолов превышает таковой всех случаев мутаций того же гена в 1,5 раза.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом в ходе исследования мы подтвердили, что гиперэкспрессия гена *ERG11* приводит к существенному повышению МИК Триазолов, т.е. усиливает резистентность *C.albicans* к данной группе препаратов. [\*\*\*]. Мутации в гене *ERG11* также обладают сходным эффектом с гиперэкспрессией этого гена, хотя и менее выраженной, что также совпадает с данными других авторов [\*\*\*]. Вместе с тем отмеченные генетические изменения не влияют на чувствительность штаммов *C.albicans* к Эхинокандинам.

Примечательно, что повышенная экспрессия и мутации гена *ERG11* могут влиять на чувствительность исследованных штаммов *C.albicans* как самостоятельно, так и в комбинации. Однако эффект гиперэкспрессии гена *ERG11* намного превосходит таковой его изолированных несинонимичных мутаций. Исходя из полученных нами данных, мутации снижают МИК Триазолов при одновременном действии с повышенной экспрессией гена *ERG11*. Данный факт можно расценить как региональную особенность нашей коллекции штаммов *C.albicans*.

В ходе анализа данных было отмечено, что популяционное разнообразие данных грибов по чувствительности к препаратам триазолового ряда определяется как минимум двумя векторами: как гиперэкспрессией гена *ERG11*, так и его мутациями. При этом дисперсионный анализ установил доминирующую роль повышенной экспрессии гена *ERG11* в этом процессе. Между тем не исключено действие иных факторов внутри- и внемикробной этиологии, которые еще предстоит изучить.

На основании полученных данных мы заключили, что гиперэкспрессия гена *ERG11*, и связанная с ней гиперпродукция молекулы ланостерол 14 $\alpha$ -деметилазы, намного эффективнее защищает *C.albicans* от пагубного воздействия препаратов триазолового ряда, чем синтез генетически измененных вариантов молекулы. Однако точечные несинонимичные мутации в этом гене явно способствуют повышению биологического разнообразия данного дрожжеподобного гриба, не усугубляя в значительной мере его медицинскую опасность в краткосрочной перспективе. Исходя из сказанного, с практической точки зрения представляется целесообразным акцентировать внимание на выявлении гиперэкспрессии гена *ERG11* с целью прогнозирования риска возникновения антимикробной резистентности штаммов *C.albicans*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Резистентность *C.albicans* к триазоловым препаратам обеспечивается кооперативным действием гиперэкспрессии гена ERG11 и его мутаций.
2. Эффект гиперэкспрессии гена ERG11 существенно превосходит таковой его несинонимичных мутаций.
3. Гиперэкспрессия гена ERG11 по сравнению с его мутациями является доминантной в формировании популяционного разнообразия *C.albicans* по резистентности к препаратам триазолового ряда.

Таблица 2.

MIC of antifungal drugs in the different types of genetic variations of *C. albicans* ( $X \pm m$ )

<b>Генетические изменения</b>	<b>n</b>	<b>Anidulafungin</b>	<b>Micafungin</b>	<b>Caspofungin</b>	<b>Posaconazole</b>	<b>Voriconazole</b>	<b>Itraconazole</b>	<b>Fluconazole</b>
Только гиперэкспрессия гена <i>ERG11</i>	2	1,200±0,400	0,943±0,287	1,071±0,357	1,643±1,631	1,349±1,190	1,644±1,632	1,667±1,566
Только мутации в гене <i>ERG11</i>	3	0,800±0,000	1,038±0,191	0,952±0,238	0,010±0,002	0,159±0,000	0,010±0,002	0,202±0,000
Сочетание гиперэкспрессии гена <i>ERG11</i> и его мутаций	4	0,900±0,252	0,943±0,166	1,071±0,206	0,033±0,023	0,437±0,278	0,032±0,024	0,707±0,335

Примечания. «n» – количество наблюдений.

Notes. «n» – number of tested strains

Таблица 3.

The genetic changes of *C. albicans* in the association with the pharmaceutical group of antifungal drugs

Генетические изменения	Триазолы		Эхинокандины		К	F
	n	X±m	n	X±m		
Только гиперэкспрессия гена <i>ERG11</i>	8	1,576±0,575	6	1,071±0,164	1,472	4,32
Только мутации в гене <i>ERG11</i>	12	0,095±0,026	9	0,930±0,095	0,102 ***	82,95 ***
Сочетание гиперэкспрессии гена <i>ERG11</i> и его мутаций	16	0,302±0,122	12	0,971±0,112	0,311 ***	36,87 ***

Примечания. «n» – суммарное число наблюдений; «K» - отношение МИК «триазолов» к «эхинокандинам», «F» - величина влияния фармацевтической группы препарата (%); \* - p<0,05, \*\* - p<0,01, \*\*\* - p<0,001.

Notes. «n» – total number of observations; “K” is the MIC ratio of “triazoles” group to “echinocandins” one, “F” is the magnitude of the influence of the pharmaceutical group of the drug (%); \* - p<0,05, \*\* - p<0,01, \*\*\* - p<0,001.



Таблица 4.

Comparative Analysis of the Results of the Study of the Relationship between Genetic Changes in *C. albicans* and MIC of Pharmaceutical Groups of Antimycotic Drugs

Группы сравнения		Триазолы	Эхинокандины
Только гиперэкспрессия гена <i>ERG11</i> Только мутации в гене <i>ERG11</i>	<i>K</i>	16,589 *	1,152
	<i>F</i>	36,12 ***	4,72
Только гиперэкспрессия гена <i>ERG11</i> Сочетание гиперэкспрессии гена <i>ERG11</i> и его мутаций	<i>K</i>	5,219 *	1,103
	<i>F</i>	28,12 ***	1,59
Только мутации в гене <i>ERG11</i> Сочетание гиперэкспрессии гена <i>ERG11</i> и его мутаций	<i>K</i>	0,315	0,958
	<i>F</i>	7,36	0,38

Примечания. «*K*» - отношение результатов сравниваемых групп, «*F*» - величина влияния вида генетических изменений (%).

Notes. "K" is the ratio of the results of the compared groups, "F" is the magnitude of the influence of the type of genetic changes (%).

Рисунок 1.

Влияния генетических изменений на варьирование МИК Триазолов в популяции *C.albicans* (%)

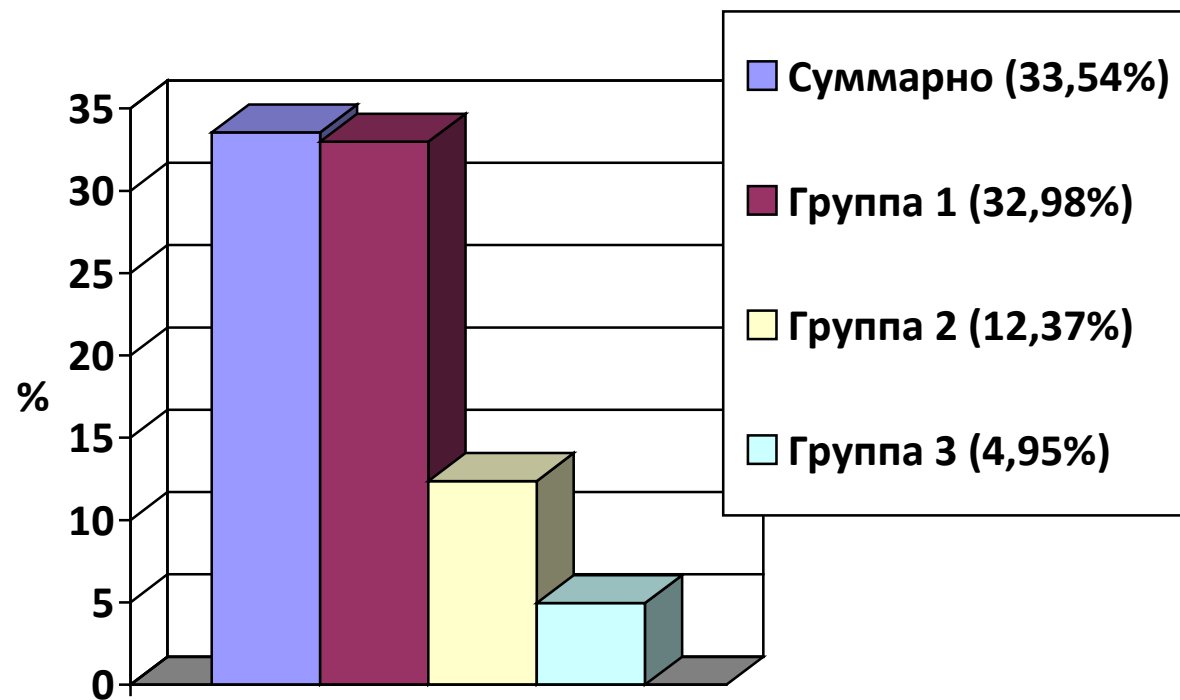


Рисунок 2

Двухфакторная модель совместного влияния генетических изменений на варьирование МИК Триазолов в популяции *C. albicans* (%)

