

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ *CANDIDA* sp. В ТЕЧЕНИЕ СУТОК МОДИФИЦИРОВАННЫМ МАКРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ



М.В. Николенко, Н.В. Барышникова, О.И. Малишевская, О.В. Еноктаева,
Е.М. Васева

ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия

Резюме. Целью исследования являлось изучение динамики биопленкообразования *Candida* sp. в течение суток модифицированным макрометрическим методом. Предложенный макрометрический метод решает задачи по ускорению и упрощению количественной оценки процесса биопленкообразования, увеличивает чувствительность, так как позволяет исключить ошибки, связанные с использованием полистиролового материала. Простота выполнения приведенной методики делает ее доступной для любой лаборатории. Для исследования использованы эталонные штаммы из американской коллекции типовых культур (ATCC) и клинические изоляты *Candida* sp., выделенные из женского репродуктивного тракта при кандидозном дисбиозе. Биопленкообразование *Candida* sp. изучали по модифицированной авторами методике O'Toole G.A. и соавт. Биологическую активность пленкообразования *Candida* sp. смотрели в течение двух суток с 4-часовым интервалом, в зимнее время года, IV фаза луны. Использовали 48-часовую культуру грибов, что соответствовало максимальной адгезии их на поверхности стекла. Хронодизайн исследований подразумевал получение по оцениваемой функции 6-ти измерений в сутки с 3–5-кратным повторением условий эксперимента. Для графического представления амплитудно-фазовых характеристик изученных биоритмов использован косинор-анализ, служащий базовым методом для выявления циклических процессов в биологических системах и их моделирования. В ходе исследования доказано, что способность клеток микромицетов к адгезии достоверно выше в стационарной фазе роста, чем логарифмической ($p < 0,05$). Используемый хронобиологический прием позволил выявить наличие пленкообразующей активности грибов в течение суток ($p < 0,05$) и обнаружить общие закономерности проявления свойств у представителей всех изучаемых видов. Экспериментально установлено, что последовательность и согласованность биологических свойств клинических изолятов *Candida* sp. во времени принципиально не зависят от вида гриба. В ходе исследования установлены ритмометрические маркеры патогенности штамма — это вклад ритма и амплитудно-фазовая характеристика. Доказано, что активность биопленкообразования увеличивается в направлении «эталонные штаммы → клинические изоляты». Критерий Манна–Уитни у *C. albicans* составил 29, *C. tropicalis* — 26, *C. krusei* — 30 ($p < 0,05$). Использование хронобиологического метода, на наш взгляд, открывает новые перспективы при изучении

Адрес для переписки:

Николенко Марина Викторовна
625023, Россия, г. Тюмень, ул. Одесская, 54,
Тюменский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 905 823-37-90 (моб.).
E-mail: nikolenko-marina@mail.ru

Contacts:

Marina V. Nikolenko
625023, Russian Federation, Tyumen, Odesskaya str., 54,
Tyumen State Medical University.
Phone: +7 905 823-37-90 (mobile).
E-mail: nikolenko-marina@mail.ru

Для цитирования:

Николенко М.В., Барышникова Н.В., Малишевская О.И., Еноктаева О.В.,
Васева Е.М. Изучение динамики биопленкообразования *Candida* sp.
в течение суток модифицированным макрометрическим
методом // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1129–1135.
doi: 10.15789/2220-7619-АНС-1929

Citation:

Nikolenko M.V., Baryshnikova N.V., Malishevskaya O.I., Enoktaeva O.V.,
Vaseva E.M. A 24-hour *Candida* sp. biofilm formation dynamically assessed
with modified macrometric method // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1129–1135.
doi: 10.15789/2220-7619-АНС-1929

Исследование финансировалось за счет гранта Тюменского государственного медицинского университета
в области биомедицинских и биофармацевтических технологий от 12 августа 2021 г. № 8210053.

The study was funded by a grant from the Tyumen State Medical University
in the field of biomedical and biopharmaceutical technologies (August 12, 2021, No. 8210053).

физиологии *Candida* sp., так как дает возможность прогнозировать динамику состояния микроорганизма и учитывать особенности срочной и долговременной адаптации к разным факторам внешней среды. Выявление суточных ритмов биопленкообразующей активности у различных штаммов *Candida* sp. открывает возможность управлять жизнеспособностью бактериально-грибковых ассоциаций и прогнозировать их устойчивость к различным антимикробным средствам.

Ключевые слова: биопленка, макрометрический метод, грибы рода *Candida*, кандидозный дисбиоз, ритмометрические параметры.

A 24-HOUR *CANDIDA* sp. BIOFILM FORMATION DYNAMICALLY ASSESSED WITH MODIFIED MACROMETRIC METHOD

Nikolenko M.V., Baryshnikova N.V., Malishevskaya O.I., Enoktaeva O.V., Vaseva E.M.

Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to study the dynamics of 24-hour *Candida* spp. biofilm formation by using a modified macrometric method. The proposed macrometric method solves the problem of accelerating and simplifying the quantitative assessment of the biofilm formation process, increases sensitivity due to allowing to avoid mistakes related to applied polystyrene material. The ease of implementing such a technique makes it accessible to any laboratory. Reference strains from the American Type Culture Collection (ATCC) and clinical isolates of *Candida* spp. isolated from the female reproductive tract with candida dysbiosis were used for the study. Biofilm formation of *Candida* spp. studied according to the O'Toole G.A. et al. method modified by us. The biological activity of *Candida* sp. biofilm formation was monitored for 48 hours with 4-hour intervals, in winter season, the IV phase of the moon. A 48-hour fungal culture corresponding to relevant maximum adhesion on glass surface was used. The study chrono-design implied obtaining 6 diurnal measurements for the function evaluated with a 3–5-repeats of the experimental conditions. Amplitude-phase characteristics of the studied biorhythms were graphically represented using cosinor analysis serving as the basic method to identify and model cyclic processes in biological systems. The study proved that the ability of micromycete cells to adhere is significantly higher in the stationary vs. logarithmic growth phase ($p < 0.05$). The chronobiological technique used here allowed to reveal the presence of diurnal fungal film-forming activity ($p < 0.05$) and reveal the general patterns of manifested properties in representatives of all candida species examined. It has been experimentally established that the sequence and consistency of the biological properties of clinical *Candida* sp. isolates over time were not fundamentally dependent on the type of fungus. During the study, rhythmometric markers of the strain-related pathogenicity was established reflecting contribution of rhythm and the amplitude-phase characteristic. It has been proven that the activity of biofilm formation increases along the “reference strains — clinical isolates” axis. For *C. albicans* the Mann–Whitney test data was 29, for *C. tropicalis* — 26, and for *C. krusei* — 30 ($p < 0.05$). We believe that chronobiological method opens up new perspectives in the studying physiology of *Candida* spp. because it allows to dynamically predict state of microorganism and take into account features of urgent and long-term adaptation to various environmental factors. Identifying diurnal rhythms in biofilm-forming activity of various *Candida* sp. strains opens up an opportunity to control viability of bacterial-fungal associations and predict related resistance to diverse antimicrobial agents.

Key words: biofilm, macrometric method, fungi of *Candida* genus, candida dysbiosis, rhythmometric parameters.

Введение

Формирование биопленочных сообществ является одной из основных стратегий выживания бактерий и грибов в той экологической нише, которую они занимают. В биопленках бактериально-грибковые микросимбиозы приобретают защиту от различных физических (УФ излучение, высушивание), химических (изменение pH, антибиотики, биоциды, поверхностно-активные вещества), биологических антимикробных факторов (фагоциты, антитела, бактериофаги, факторы естественной резистентности макроорганизма), что позволяет рассматривать биопленку как одну из форм персистенции микроорганизмов [2]. Имеются сведения, что с образованием биопленок связа-

ны до 80% инфекционных заболеваний и множественная антибиотикорезистентность микроорганизмов [17, 18]. В ряде обзорных работ отражено значение биопленок для различных областей науки и практики, демонстрирующее возросший интерес к этой проблеме и информация о большом количестве методов изучения, культивирования и индикации биопленок *in vitro* и *in vivo* [1, 7, 22, 23, 24].

Широко используются в последние десятилетия динамические методики исследования биопленкообразования с использованием лабораторных ферментеров, аппарата Робинсона в его различных модификациях, проточный метод [12, 19]. Основным преимуществом динамических методов формирования биопленок является максимальное приближение к условиям

живых систем [14]. Инновационные технические решения — использование флуоресцентной, конфокальной сканирующей лазерной и электронной микроскопии. Данные методы позволили выявить гетерогенную структуру бактериально-грибковых биопленок. Изучены гены, кодирующие белки адгезии *Candida* sp. и описаны фазы формирования биопленки: прилипания, образование межклеточного матрикса и формирования зрелой биопленки, состоящей из единичных клеток и мицелия [21, 22, 27]. В своих работах М. Al-Fattani и соавт. изучили химический состав матрицы биопленок *Candida albicans* (*C. albicans*) и *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) [19]. Основными структурными компонентами были белки, углеводы, гексозамин и фосфор.

В последнее время изучение биопленок в бактериально-грибковых популяциях проводят методом флуоресцентной гибридизации *in situ*, который позволяет определить расположение мРНК в клетках, образующих биопленки. С помощью этого метода выявлены клетки-персистеры, ответственные за выживание популяции при воздействии факторов различной природы [11].

Изучение биопленок *in vitro* имеет целый ряд ограничений. D. Andes и соавт. изучали образование и структуру биопленок в центральной вене крыс с помощью флуоресцентной и электронной микроскопии [20]. Экспериментально доказано, что в пространстве, смежном с поверхностью катетера, клетки *Candida* sp. плотно прилегали к внеклеточному матриксу. Слой, смежный с катетером, был менее плотен. Наиболее удаленная поверхность биопленки содержала единичные клетки *Candida* sp., которые были вложены в волокнистый внеклеточный материал. Подобные особенности структуры биопленки *Candida* sp. характерны и для моделей *in vitro*. Однако электронная микроскопия показала наличие клеток экспериментального животного в составе матрицы биопленки [28].

В этой связи, предлагаемые методы выявления биопленкообразования сложны, требуют специализированного оборудования, вивария, что создает в реальной клинической практике сложности в выявлении биопленок и создается ложное представление о низкой частоте данного биологического образования.

Вторая группа методов основана на создании статических условий культивирования микроорганизмов, которые удобны, высоко производительны и наглядны. Однако научный интерес отечественных исследователей к нему в последнее время значительно снизился, а практическое значение так и не получило должной оценки. Авторами предложен вариант модификации популярной методологии биопленко-

образования на пластиковой посуде в течение суток. Биоритмы обеспечивают необходимую последовательность физиологических, метаболических и биохимических процессов и оптимальное соотношение ее параметров в каждый момент времени [13]. С этой точки зрения хронобиологический подход выступает одновременно и как методологический принцип, и как методический прием [4, 15].

Цель исследования — изучить динамику биопленкообразования *Candida* sp. в течение суток модифицированным макрометрическим методом.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 17 изолятов *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. krusei*, выделенные из женского репродуктивного тракта при кандидозном дисбиозе. Контроль — депонированные эталонные штаммы *Candida* sp., полученные из американской коллекции типовых культур (ATCC) *C. albicans* 24433, *C. tropicalis* 750, *C. krusei* 6258. Данные виды грибов выбраны в качестве модели, так как в подавляющем большинстве случаев (85–90%) возбудителем кандидоза является *C. albicans*, наиболее патогенный и значимый в клинической практике вид. Среди остальных видов *Candida* sp. клиническое значение имеют преимущественно *C. tropicalis* — 3–5%, *C. krusei* — 1–3%. В последнее время увеличивается количество заболеваний, вызванных именно грибами *C. non-albicans* [9].

Выделение и идентификацию грибов проводили по комплексу признаков: внешний вид колоний, хламидоспорообразование, тест на образование ростовых трубок, чувствительность к антифунгальным препаратам диско-диффузионным методом, ассимиляционная способность [6].

В работе представлена модификация способа оценки биопленкообразования, предложенного O'Toole G.A. и соавт. [27]. На первом этапе исследования были получены 24-часовые культуры, выращенные на питательной среде Сабуро с теллуридом (НПО «Питательные среды», Россия) при температуре 37°C, что соответствовало началу стационарной фазы развития грибов. Биопленки получали в стеклянных стандартных по ГОСТу пробирках (14 мл), промытых хромовой смесью. Исходную концентрацию микроорганизмов 0,5 McFarland готовили с помощью прибора для определения мутности микробной суспензии — Densi-Lameter (Lachema, Чехия). Рабочую концентрацию $1,5 \times 10^3$ КОЕ/мл получали титрованием культуры в физиологическом растворе, затем добавляли в пробирки с бульоном Сабуро (НПО «Питательные среды», Россия) и инкубировали

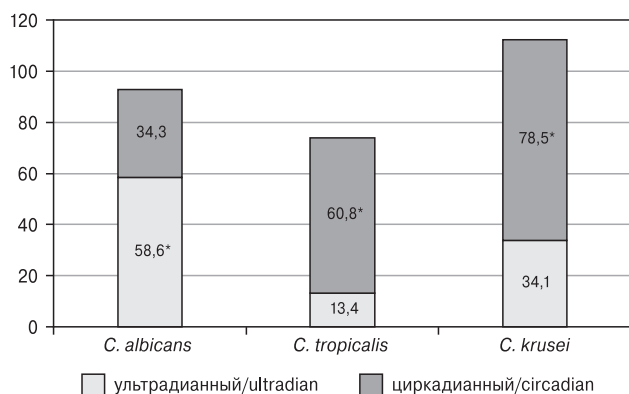


Рисунок 1. Вклад ритмов биопленкообразования музейных штаммов *Candida* sp.

Figure 1. Contribution of biofilm formation rhythms of archival *Candida* sp. strains

Примечание. * $p < 0,05$

Note. * $p < 0,05$

в термостате при температуре 37°C. Для удаления планктонной фазы популяции производили забор содержимого из пробирок пипеткой, не задевая стенок сосуда и дважды аккуратно промывали дистиллированной водой. Для количественной оценки способности дрожжевых грибов к пленкообразованию добавляли 2 мл генцианового фиолетового в пробирку. Спустя 45 мин сливали краситель, стенки пробирки многократно промывали дистиллированной водой. Для десорбции красителя в органический растворитель в каждую пробирку на 15 мин добавляли 2 мл 96% этилового спирта.

Кинетику образования биопленки изучали по изменению коэффициента пропускания света и оптической плотности на спектрофотометре КФК-3-01 при длине волны 540 нм, измерения проводили через 24, 36, 48, 72 и 96 ч. В качестве контроля применяли 96% этиловый спирт. Экстрагированный этанолом из биопленки генциановый фиолетовый помещали в одноразовые пластиковые кюветы «макро» размером 10 × 10 × 45 мм, объемом 4 мл (длина оптического пути 10 мм). Температура измеряемых жидкостей соответствовала комнатной температуре. Для получения статистических достоверных данных эксперимент повторяли 5 раз.

Статистическую обработку материалов и графическое изображение результатов осуществляли с использованием программ: Primer of Biostatistics Version 4.03 by Stanton A. Glantz 1998, Microsoft Office Excel 2010. Определяли M — среднее арифметическое, δ — среднее квадратичное отклонение, m — средняя ошибка среднего арифметического, данные представляли по форме $M \pm m$ или $M \pm \delta$. В случае соответствия сравниваемых выборок нормальному закону распределения (по χ^2) использовали t -критерий Стьюдента.

На втором этапе изучали биологическую активность пленкообразования *Candida* sp. в течение двух суток с 4-часовым интервалом, в зимнее время года, IV фаза Луны. Использовали 48-часовую культуру грибов, что соответствовало максимальной адгезии их на поверхности стекла. Хронодизайн исследований подразумевал получение по оцениваемой функции 6-ти измерений в сутки с 3–5-ти кратным повторением условий эксперимента. Проведено 11 экспериментов, получено 486 измерений.

Данные были обработаны по методу наименьших квадратов (косинор-анализ) при заданной значимости достоверности, $p < 0,05$ [26]. Для каждого штамма впоследствии определены основные параметры ритмов с периодами $T = 12$ и $T = 24$ часа: мезор (M) — среднее значение гармонической кривой наилучшей аппроксимации функции (косинусоиды), амплитуда ритма (A) — расстояние от экстремума до мезора и акрофаза (ϕ) — момент времени ожидаемого экстремума функции.

Непараметрическим методом статистической обработки — критерием Манна–Уитни (T) — сравнивали различия между несвязанными выборками (опыт — контроль, музейные и госпитальные культуры). Анализируемые различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Все изоляты *Candida* sp. обладали характерной скоростью роста. Адгезивные свойства грибов рода *Candida* зависели от фазы их развития. Стеклоянная поверхность пробирки в питательной среде покрывалась первичной пленкой через 12 ч культивирования. При визуальном осмотре биопленки, уже через 24 ч культивирования, покрывали всю поверхность стекла, контаминированного с питательной средой.

Экспериментально выявлено, что наиболее оптимальным временем для исследования биопленкообразования является временная точка 48 часов. В этот период коэффициент пропускания света являлся самым высоким, так как клеточные стенки грибов внутри биопленки максимально сорбировали генциановый фиолетовый. Следовательно, способность клеток микромицетов к адгезии достоверно выше в стационарной фазе роста, чем логарифмической. Период культивирования 72–96 ч характеризовался снижением биопленкообразования грибов, так как их клетки теряли подвижность и начинали интенсивно выделять внеклеточные полимеры, образуя полимерный матрикс [13]. Подобные результаты были получены С.А. Лисовской (2008) при наблюдении 1–4-суточных культур с использованием методики выращивания биопленок на нитроцеллюлозной поверхности [10].

Используемый нами хронобиологический прием позволил выявить наличие пленкообразующей активности грибов в течение суток ($p < 0,05$) и обнаружить общие закономерности проявления свойств у представителей всех изучаемых видов.

Суточная динамика биопленкообразования *C. albicans* характеризовалась ультрадианным (около 12-часовым) вкладом ритма в утреннее (04:00) и вечернее (16:00) время. У *C. non-albicans* выявлены достоверные циркадианные (около-суточные) ритмы активности адгезии к поверхности стекла. Максимальные значения показателя регистрировались у *C. tropicalis* в вечернее время — 17:00–17:23, а у *C. krusei* в ночные часы — 20:00–23:20. Вклад ритмов формирования биопленок музейными культурами представлен на рис. 1.

Наличие циркадианных ритмов в спектральном составе микроорганизмов одновременно с ультрадианными гармониками указывало на усиление адаптивных возможностей микроорганизмов. Среднесуточные показатели биопленкообразования не превышали $1,4 \pm 0,05$, что позволило судить о низкой активности всех изучаемых культур. Аналогичные результаты получены при изучении суточной динамики адгезивных свойств музейных штаммов *Candida* sp., адсорбированных на формализованных эритроцитах человека 0 (I) группы Rh(+) [16].

У клинических изолятов грибов, выделенных из женского репродуктивного тракта при кандидозном дисбиозе, динамика биопленкообразования характеризовалась достоверными ультрадианными гармониками (рис. 2). Максимальные значения фиксировались в ранние утренние часы — 03:09–04:18 и в вечернее время с 18:45 до 20:20.

Ультрадианные ритмы характеризуют, напротив, вариабельность периодов, что имеет важное биологическое значение, определяющее устойчивость к внешним воздействиям и способность к адаптивному ответу на периодические раздражители [8]. Мезор пленкообразующей активности у всех изучаемых клинических изолятов составил $2,6 \pm 0,01$ ($p < 0,05$). Амплитуда колебаний показателя выросла в 4,6 раз по сравнению с музейными штаммами. Представленные результаты модифицированным макрометрическим методом согласуются с данными, полученными авторами при изучении адгезии микроорганизмов экспресс-методом и развернутым методом В.И. Брилиса и соавт., 1986 г. [16]. Предложенной методикой доказано, что последовательность и согласованность формирования пленок клиническими изолятами *Candida* sp. во времени принципиально не зависят от вида гриба и, возможно, данный механизм адаптации закономерен и яв-

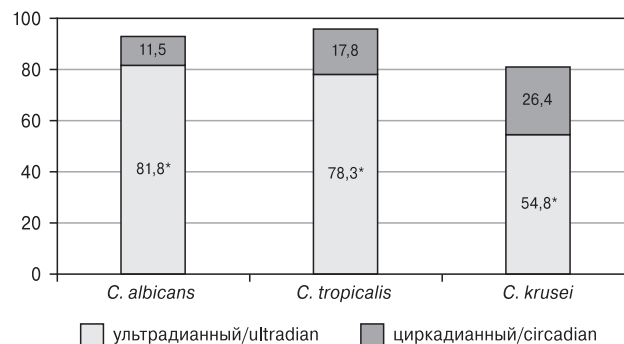


Рисунок 2. Вклад ритмов биопленкообразования клинических изолятов *Candida* sp.

Figure 2. Contribution of biofilm formation rhythms for *Candida* sp. clinical isolates

Примечание. * $p < 0,05$.

Note. * $p < 0.05$.

ляется характерным признаком биологической активности дрожжевых патогенов.

Подход к инфекции с позиции хронобиологии расширяет представления о физиологии грибов. В ходе исследования установлены ритмометрические маркеры патогенности штамма — это вклад ритма и амплитудно-фазовая характеристика изучаемого свойства, которое не является стационарным — и дают возможность отличать патологические нарушения от приспособительных изменений [3, 4, 25].

Анализ хронопоказателей активности пленкообразования клинических изолятов и эталонных штаммов *Candida* sp. показал, что у грибов, выделенных из организма человека, изменялся вклад ритма, мезор и амплитуда колебаний функции повышались в направлении «эталонные штаммы → клинические изоляты». Критерий Манна–Уитни у *C. albicans* составил 29, *C. tropicalis* — 26, *C. krusei* — 30 ($p < 0,05$).

Выявленная закономерность согласуется с данными биопленкообразования, полученными на силиконовых моделях. Доказано методами конфокальной сканирующей лазерной и электронной микроскопии, что биопленки *C. albicans* состояли из слоев бластоспор с плотно лежащей матрицей из полисахаридов. Биопленки *C. non-albicans* имели меньший объем, чем пленки *C. albicans*, и содержали только бластоспоры, собранные в одну группу. Полученные результаты свидетельствовали, что *C. albicans* формирует количественно большую и структурно более сложную биопленку, чем грибы *Candida non-albicans* [28]. У *C. albicans* межклеточный матрикс состоял на 57% из глюкозы, а в биопленке *C. tropicalis* преобладал гексозамин. Пленочные биологические образования у *C. albicans* легче отделялись от пластмассовых поверхностей с помощью обработки ферментом бета-1,3-глюканаза, чем *C. tropicalis* [5].

Заключение

Существование биопленок при хронических инфекциях требует совершенно новых подходов к их диагностике. Предложенный макрометрический метод решает задачи по ускорению и упрощению количественной оценки процесса биопленкообразования, увеличивает чувствительность, так как позволяет исключить ошибки, связанные с использованием полистеролового материала. Простота выполнения приведенной методики делает ее доступной для любой лаборатории.

Использование хронобиологического метода, на наш взгляд, открывает новые перспективы при изучении физиологии *Candida* sp., так как дает возможность прогнозировать ди-

намику состояния микроорганизма и учитывать особенности срочной и долговременной адаптации к разным факторам внешней среды. Выявление суточных ритмов биопленкообразующей активности у различных штаммов *Candida* sp., открывает возможность управлять жизнеспособностью бактериально-грибковых ассоциаций и прогнозировать их устойчивость к различным антимикробным средствам.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность Тюменскому государственному медицинскому университету за поддержку в проведении исследования.

Список литературы/References

1. Ашофф Ю. Биологические ритмы; пер. с англ. М.: Мир, 1984. Т. 1. 262 с. [Aschoff J. Biological rhythms; trans. from English. Moscow: Mir, 1984. Vol. 1. 262 p. (In Russ.)]
2. Бухарин О.В. Симбиотические взаимоотношения микроорганизмов при инфекции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. № 1. С. 93–97. [Bukharin O.V. Symbiotic relationships of microorganisms during infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 1, pp. 93–97. (In Russ.)]
3. Губин Г.Д., Дуров А.М., Губин Д.Г. Биоритмы, второй закон термодинамики, биологический возраст // Циклы природы и общества. 1994. Т. 4. С. 15–19. [Gubin G.D., Durov A.M., Gubin D.G., Biorhythms, the second law of thermodynamics, biological age. *Tsikly prirody i obshchestva = Cycles of Nature and Society*, 1994, vol. 4, pp. 15–19. (In Russ.)]
4. Губин Д.Г., Губин Г.Д. Хроном сердечно-сосудистой системы на различных этапах онтогенеза человека. Тюмень: ВекторБук, 2000. 176 с. [Gubin D.G., Gubin G.D. Chronom of cardiovascular system at different stages of ontogenesis in men. *Tyumen: Vector Book*, 2000. 176 p. (In Russ.)]
5. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А., Чилина Г.А. *Candida*. Кандидозы. Лабораторная диагностика. Под ред. проф. Н.П. Елинова. СПб.: Коста, 2010. 224 с. [Yelinov N.P., Vasilyeva N.V., Stepanova A.A., Chilina G.A. *Candida*. Candidiasis. Laboratory diagnostics; ed. N.P. Elinov. St. Petersburg: Costa, 2010. 224 p. (In Russ.)]
6. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. 2004. Т. 40, № 11. С. 1445–1456. [Ilina T.S., Romanova Yu.M., Gintsburg A.L. Biofilms as a mode of existence of bacteria in external environment and host body: the phenomenon, genetic control, and regulation systems of development. *Genetika = Russian Journal of Genetics*, 2004, vol. 40, no. 11, pp. 1445–1456. (In Russ.)]
7. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. Хронобиология и хрономедицина. М.: Триада-Х, 2000. 488 с. [Komarov F.I., Rapoport S.I. Chronobiology and chronomedicine. Moscow: Triada-X, 2000. 488 p. (In Russ.)]
8. Леуш С.С., Рошина Г.Ф., Полтавцева О.Ф. Особенности клинического течения и лечения различных форм урогенитального кандидоза // Украинський журнал дерматології, венерології, косметології. 2003. № 2 (9). С. 72–75. [Leush S.S., Roshchina G.F., Poltavtseva O.F. Clinical course and treatment of various forms of urogenital candidiasis. *Ukrainian Journal of Dermatology, Venereology, Cosmetology*, 2003, no. 2 (9), pp. 72–75. (In Russ.)]
9. Лисовская А.М. Изучение биологических свойств *Candida* spp, выделенных из различных локусов у лабораторных больных // Проблемы медицинской микологии. 2006. Т.8, № 2. С. 34. [Lisovskaya A.M. A study of the biological properties of candida spp. Isolated from different loci of outpatients. *Problemy meditsinskoi mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2006, vol. 8, no. 2, p. 34. (In Russ.)]
10. Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В. Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективы // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. Т. 14, № 1. С. 17–22. [Lyamin A.V., Botkin E.A., Zhestkov A.V. Methods of biofilm evaluation: opportunities and perspectives. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, vol. 14, no. 1, pp. 17–22. (In Russ.)]
11. Марданова А.М., Кабанов Д.А., Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р. Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие. Казань: К(П)ФУ, 2016. 42 с. [Mardanova A.M., Kabanov D.A., Rudakova N.L., Sharipova M.R. Biofilms: basic research methods: teaching aid. Kazan: K(P)FU, 2016. 42 p. (In Russ.)]
12. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. 2007. Т. 76, № 2. С. 149–163. [Nikolaev Yu.A., Plakunov V.K. Biofilm — “city of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Mikrobiologiya = Microbiology*, 2007, vol. 76, no. 2, pp. 149–163. (In Russ.)]
13. Окулич В.К., Кабанова А.А., Плотников Ф.В. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск: ВГМУ, 2017. 300 с. [Okulich V.K., Kabanova A.A., Plotnikov F.V. Microbial biofilms in clinical microbiology and antibiotic therapy. Vitebsk: VSMU, 2017. 300 p. (In Russ.)]

14. Романов Ю.А. Пространственно-временная организация биологических систем // Вестник Российской академии медицинских наук. 2002. № 6. С. 13–18. [Romanov Yu.A. Theory of space-time organization of biological systems. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2002, no. 6, pp. 13–18. (In Russ.)]
15. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам// Успехи биологической химии. 2004. Т. 44. С. 263–306. [Sidorenko S.V., Tishkov V.I. Molecular basis of antibiotic resistance. *Uspekhi biologicheskoi khimii = Biochemistry (Moscow)*, 2004, vol. 44, pp. 263–306. (In Russ.)]
16. Тимохина Т.Х., Николенко М.В., Варницына В.В., Перунова Н.Б., Бухарин О.В. Временная организация биологических свойств *Candida albicans* // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2011. № 2 (30). С. 226–228. [Timokhina T.H., Nikolenko M.V., Varnitsyna V.V., Perunova N.B., Bukharin O.V. Temporary organization of biological properties of *Candida albicans*. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Izvestia Orenburg State Agrarian University*, 2011, no. 2 (30), pp. 226–228. (In Russ.)]
17. Чеботарь И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета // Вестник Российской академии медицинских наук. 2012. № 12. С. 22–28. [Chebotar I.V. Mechanisms of antibiofilm immunity. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, no. 12, pp. 22–28. (In Russ.)]
18. Чеботарь И.В., Погорелов А.Г., Яшин В.А., Гурьев Е.Л. Современные технологии исследования бактериальных биопленок // Современные технологии в медицине. 2013. Т. 5, № 1. С. 14–20. [Chebotar I.V., Pogorelov A.G., Yashin V.A., Guryev E.L. Modern technologies of bacterial biofilm study. *Sovremennye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2013, vol. 5, no. 1, pp. 14–20. (In Russ.)]
19. Al-Fattani M., Douglas L. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, vol. 48, no. 9, pp. 3291–3297. doi: 10.1128/AAC.48.9.3291-3297.2004
20. Andes D., 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, vol. 72, no. 10, pp. 6023–6031. doi: 10.1128/IAI.72.10.6023-6031.2004
21. Bachmann S.P., VandeWalle K., Ramage G., Patterson T.F., Wickes B.L., Graybill J.R., López-Ribot J.L. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, vol. 46, no. 11, pp. 3591–3596. doi: 10.1128/AAC.46.11.3591-3596.2002
22. Chandra J., Mukherjee P.K., Leidich S.D., Faddoul F.F., Hoyer L.L., Douglas L.J., Ghannoum M.A. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J. Dent. Res.*, 2001, vol. 80, no. 3, pp. 903–908. doi: 10.1177/00220345010800031101
23. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, vol. 284, pp. 1318–1322. doi: 10.1126/science.284.5418.1318
24. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, vol. 15, pp. 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
25. Halberg F., Cornelissen G. Consensus concerning the chromom and the addition to statistical significance of scientific significance. *Biochim. Clin.*, 1991, vol. 15, pp. 159–162.
26. Nelson W., Tong Y.L., Lee J.K. Methods for cosinorhythmometry. *Chronobiologia*, 1979, vol. 6, no. 4, pp. 305–323.
27. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000, no. 54, pp. 49–79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
28. Ramage G., Vande Walle K., Wickes B.L., López-Ribot J.L. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, vol. 45, no. 9, pp. 2475–2479. doi: 10.1128/AAC.45.9.2475-2479.2001

Авторы:

Николенко М.В., д.б.н., доцент, профессор кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия;

Барышникова Н.В., ассистент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия;

Малишевская О.И., к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтических дисциплин ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия;

Еноктаева О.В., ассистент кафедры биологии ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия;

Васева Е.М., к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтических дисциплин ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия.

Authors:

Nikolenko M.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Professor of the Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Baryshnikova N.V., Assistant Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Malishevskaya O.I., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Disciplines, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Enoktaeva O.V., Assistant Professor, Department of Biology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation;

Vaseva E.M., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Disciplines, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation.

Поступила в редакцию 18.04.2022
Отправлена на доработку 02.06.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 18.04.2022
Revision received 02.06.2022
Accepted 28.07.2022