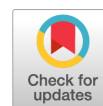


ЭКСПРЕССИЯ *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* И *ERG11* У УСТОЙЧИВЫХ К АЗОЛАМ ШТАММОВ *CANDIDA ALBICANS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ В ГОРОДЕ МОСКВЕ



А.Д. Воропаев¹, Д.А. Екатеринчев¹, Ю.Н. Урбан², В.В. Зверев¹, Ю.В. Несвижский¹,
Е.А. Воропаева², Е.И. Лиханская², М.С. Афанасьев¹, С.С. Афанасьев²

¹ ФГАОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

Резюме. Грибы рода *Candida* — повсеместно распространенные оппортунисты человека, способные вызывать инфекции различной локализации, а также угрожающие жизни состояния у иммунокомпрометированных пациентов, число которых в последние годы неуклонно растет. Это ВИЧ-инфицированные, пациенты с различными онкологическими заболеваниями и пациенты, перенесшие трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. Кроме того, распространяется устойчивость к противогрибковым препаратам. Природно-чувствительные к азолам *Candida albicans* обладают разнообразными механизмами приобретенной устойчивости, включая эффлюксные переносчики и амплификацию гена белка-мишени. Данное исследование проводилось с целью оценить распространенность данных механизмов в выборке изолятов, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в Московском регионе Российской Федерации, охарактеризовать взаимосвязь данных механизмов и закономерности развития устойчивости. 18 устойчивых к флуконазолу и вориконазолу штаммов *C. albicans* были выделены от ВИЧ-инфицированных пациентов с рецидивирующим орофарингеальным кандидозом, находящихся на лечении в ГБУЗ ИКБ № 2 ДЗМ. Уровни экспрессии генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*, участвующих в формировании приобретенной устойчивости к азолам были измерены с помощью количественной полимеразной цепной реакции, метода $-2\Delta\Delta CT$ с генами *ACT* и *PMA* в качестве контрольных генов и референсных значений чувствительных изолятов. Уровни экспрессии выше средних значений чувствительных изолятов более чем на 3 стандартных отклонения считались достоверно повышенными. У большей части изолятов обнаружены повышенные уровни экспрессии генов *CDR1* и *CDR2*: 89 и 78% соответственно. Уровень экспрессии гена *MDR1* был повышен только в 28% случаев. Уровни экспрессии *ERG11* были достоверно повышенными у 78% изолятов. У 4 штаммов были значительно повышены уровни экспрессии всех исследуемых генов устойчивости. В данной выборке изолятов *C. albicans* приобретенная устойчивость в основном связана с эффлюксными переносчиками, кодируемыми генами *CDR1* и *CDR2*. Также, у большинства

Адрес для переписки:

Воропаев Александр Дмитриевич
125009, Россия, Москва, ул. Моховая, 11, стр. 10,
ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова Минздрава России.
Тел.: 8 916 598-14-12.
E-mail: advoropaev@gmail.com

Contacts:

Alexander D. Voropaev
125009, Russian Federation, Moscow, Mokhovaya str., 11/10,
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.
Phone: +7 916 598-14-12.
E-mail: advoropaev@gmail.com

Для цитирования:

Воропаев А.Д., Екатеринчев Д.А., Урбан Ю.Н., Зверев В.В.,
Несвижский Ю.В., Воропаева Е.А., Лиханская Е.И., Афанасьев М.С.,
Афанасьев С.С. Экспрессия *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* и *ERG11* у устойчивых
к азолам штаммов *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-
инфицированных пациентов в городе Москве // Инфекция и иммунитет.
2022. Т. 12, № 5. С. 929–937. doi: 10.15789/2220-7619-CCM-1931

Citation:

Voropaev A.D., Yekaterinchev D.A., Urban Yu.N., Zverev V.V., Nesvizhsky Yu.V.,
Voropaeva E.A., Likhanskaya E.I., Afanasiev M.S., Afanasiev S.S. *CDR1*,
CDR2, *MDR1* and *ERG11* expression in azole resistant *Candida albicans*
isolated from HIV-infected patients in city of Moscow // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5,
pp. 929–937. doi: 10.15789/2220-7619-CCM-1931

изолятов выявлен повышенный уровень экспрессии гена белка-мишени азолов — *ERG11*. Уровень экспрессии гена эффлюксного переносчика *MDR1* был повышен в наименьшем числе образцов. Нельзя также исключать вероятную роль других механизмов приобретенной устойчивости, таких как мутации в гене *ERG11*. Можно предположить, что выявленные механизмы устойчивости являются следствием длительного, широкого, а порой и бесконтрольного применения азолов, в том числе для лечения и профилактики кандидозов в группе ВИЧ-инфицированных пациентов.

Ключевые слова: *Candida albicans*, ВИЧ, флуконазол, *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*.

CDR1, CDR2, MDR1 AND ERG11 EXPRESSION IN AZOLE RESISTANT CANDIDA ALBICANS ISOLATED FROM HIV-INFECTED PATIENTS IN CITY OF MOSCOW

Voropaev A.D.^a, Yekaterinchev D.A.^a, Urban Yu.N.^b, Zverev V.V.^a, Nesvizhsky Yu.V.^a, Voropaeva E.A.^b, Likhanskaya E.I.^b, Afanasiev M.S.^a, Afanasiev S.S.^b

^a I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^b G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. *Candida* fungi are common opportunistic microorganisms capable of causing infections of various localization, as well as life-threatening conditions in immunocompromised patients, such as HIV-infected individuals, oncology patients, subjects undergoing HSCT, which number has been steadily increasing in recent years. In addition, resistance to anti-fungal drugs has been spreading as well. Naturally sensitive to azoles, *C. albicans* possess a variety of mechanisms of acquired resistance, including efflux transporters and target protein-encoding gene amplification. This study was conducted to assess a prevalence of such mechanisms in the isolates sample obtained from HIV-infected patients in the Moscow region of the Russian Federation, characterize a relationship between these mechanisms and patterns of developing drug resistance. 18 strains of *C. albicans* resistant to fluconazole and voriconazole were isolated from HIV-infected patients with recurrent oropharyngeal candidiasis in the Moscow region. The expression levels of the *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* genes involved in the formation of acquired azole resistance were measured using quantitative PCR, the $-2\Delta\Delta CT$ method with *ACT* and *PMA* genes as control genes and reference values of sensitive isolates. Expression levels exceeding the average values of sensitive isolates by more than 3 standard deviations were considered significantly elevated. In most of the isolates, elevated levels of *CDR1* and *CDR2* gene expression were found: 89% and 78%, respectively. The expression level of the *MDR1* gene was increased only in 28% of cases. *ERG11* expression levels were significantly elevated in 78% of the isolates. Expression levels of all resistance genes studied were significantly increased in 4 strains. In this sample of *C. albicans* isolates, acquired resistance is mainly associated with efflux vectors encoded by the *CDR1* and *CDR2* genes. Also, in most isolates, an increased expression level for the azole target protein gene — *ERG11* was detected. The expression level of the efflux transporter gene *MDR1* was increased in the smallest number of samples. It is also impossible to exclude a potential role of other mechanisms in developing acquired resistance, such as mutations in the *ERG11* gene. It can be assumed that the identified mechanisms of resistance result from long-term, widespread, and sometimes uncontrolled use of azoles, including those in treatment and prevention of candidiasis in HIV-infected patients.

Key words: *Candida albicans*, HIV, fluconazole, *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*.

Введение

Candida spp. — убиквитарные условно-патогенные микроорганизмы, способные вызывать инфекции различной локализации, а также угрожающие жизни состояния у иммунокомпрометированных пациентов [26]. У 90% ВИЧ-инфицированных наблюдается как минимум один эпизод орофарингеального кандидоза. Всего в данной группе пациентов ежегодно регистрируется около 2 млн случаев орального кандидоза и 1,3 млн случаев кандидоза пищевода [9]. Рецидивирующий орофарингеальный кандидоз, вызываемый *C. albicans*, значительно ухудшает качество жизни иммунокомпрометированных пациентов [25].

В последнее время повышается доля устойчивых к противогрибковым препаратам штам-

мов *Candida* spp. [14]. В исследовании SENTRY на 20 788 инвазивных изолятах *Candida* spp. отмечено нарастание устойчивости к флуконазолу [30]. По данным отечественного исследования КРИТ (кандидоз в отделениях реанимации и интенсивной терапии) устойчивость к флуконазолу достигает 21% [2]. При этом природно-чувствительные к азолам *C. albicans* приобретают устойчивость за счет разнообразных механизмов приобретенной резистентности, таких как повышенная экспрессия генов эффлюксных переносчиков и амплификация гена белка-мишени [11, 31].

Среди механизмов устойчивости к азолам отмечена значимость двух основных типов эффлюксных переносчиков: ABC (ATP-binding cassette) и MFS (Major-Facilitator superfamily) [32]. ABC-транспортеры функционируют за счет

гидролиза АТФ, MFS — за счет протонного хемиосмотического градиента. Среди АВС-транспортеров в устойчивости к противогрибковым препаратам принимают участие *CDR1* и *CDR2*, среди MFS — *MDR1*. Повышенная экспрессия эффлюксных переносчиков *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* позволяет удалять из клетки различные токсичные вещества, в том числе противогрибковые препараты [7]. Если *CDR1* и *CDR2* обеспечивают резистентность ко всем азолам, то *MDR1* — преимущественно к флуконазолу [17]. Кроме того, *CDR1* и *CDR2* могут способствовать устойчивости к топическим препаратам тербинафину и аморолфину, но не к эхинокандинам, амфотерицину В или флюцитозину [21]. Приобретенная устойчивость возникает одновременно в отношении всех имидазолов и какой-либо части препаратов из ряда триазолов. Так, утрата *CDR1* приводит к повышенной чувствительности *C. albicans* к азолам, в то время как потеря *MDR1* не оказывает существенного влияния на базовый уровень устойчивости к этим препаратам [27].

Гиперэкспрессия гена *ERG11*, кодирующего ланостерол-14 α -диметилазу, повышает необходимую минимальную подавляющую концентрацию препарата [22]. Азолы снижают активность фермента ланостерол-14 α -диметилазы, который относится к семейству цитохромов P450 (*CYP51A*) и катализирует один из этапов биосинтеза эргостерола — ключевого компонента клеточной стенки гриба. У устойчивых к азолам клинических изолятов *Candida* spp. выявляется повышенная концентрация фермента 14- α -диметилазы, что может быть обусловлено повышенной экспрессией гена *ERG11* [36]. *ERG11* регулируется преимущественно транскрипционным фактором *UPC2*, *CDR1* и *CDR2* — *TAC1*, *MDR1* — *MRR1*. *UPC2*, *TAC1* и *MRR1* относятся к одному семейству транскрипционных факторов (zinc cluster transcription factors [*ZCFs*]), внутри которого также обнаружен фактор *MRR2*, влияющий преимущественно на экспрессию *CDR1* [13].

Несмотря на изученность механизмов приобретенной устойчивости *C. albicans* к азолам, исследования, касающиеся распространенности данных механизмов, совсем немногочисленны. В одном из первых исследований, характеризующем распространенность различных механизмов устойчивости среди небольшой выборки ($n = 20$) лиц со СПИД и рецидивирующим орофарингеальным кандидозом из США, преобладающим механизмом оказалась повышенная экспрессия эффлюксных переносчиков *CDR1* и *CDR2* (55% штаммов), а также *MDR1* (55%). Гиперэкспрессия гена *ERG11*, ответственного за синтез фермента-мишени азолов, наблюдалась у 35% штаммов [28]. В швейцарском

исследовании на 16 изолятах *C. albicans* от пациентов со СПИД выявлено преобладание гиперэкспрессии *CDR1* и *MDR1* [5]. В исследовании, проведенном в Сингапуре в 2012–2015 гг., у всех изолятов *C. albicans* обнаружена повышенная экспрессия *CDR2*, у двух штаммов — повышенная экспрессия *MDR1* [38]. У пациентов из Китая отмечалось повышение экспрессии *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* и *TAC1* (регулятор транскрипции *CDR1*, *CDR2*) [37]. В российском исследовании 47 штаммов *Candida* spp., выделенных от пациенток с кольпитом и сальпингоофоритом, было установлено повышение экспрессии гена *MDR1* [3]. Повышенная экспрессия *CDR1* и *CDR2* наблюдалась у пациентов, длительно получавших противогрибковую терапию [35].

Данные о механизмах устойчивости *Candida* spp. имеют большое значение для актуальных рекомендаций по терапии грибковых инфекций, а также для поиска новых противогрибковых препаратов, к примеру ингибиторов эффлюксных переносчиков [23]. Механизмы устойчивости к противогрибковым препаратам, как и факторы их активации по отдельности, хорошо известны, однако процессы совместной активации все еще не до конца изучены [29]. Анализ распределения показателей экспрессии основных генов, связанных с устойчивостью, может помочь в развитии понимания механизмов, управляющих развитием резистентности *C. albicans* в ответ на воздействие ксенобиотиков.

Приведенные факты, несмотря на актуальность проблемы лекарственной резистентности, указывают на ограниченность информации о популяционной распространенности молекулярно-генетических механизмов устойчивости *Candida* spp. к антимикотическим препаратам на территории Российской Федерации. Это ограничивает наши прогностические возможности в плане преодоления резистентности и повышения эффективности специфической терапии.

В связи со сказанным целью настоящей работы было оценить распространенность повышенной экспрессии генов *CDR1*, *CDR2*, *ERG11* и *MDR1* в устойчивой к азолам выборке изолятов *C. albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в Московском регионе Российской Федерации, и охарактеризовать возможные закономерности и взаимосвязи данных механизмов.

Материалы и методы

В исследование включены 22 штамма *C. albicans* из коллекции ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора: 18 устойчивых к флуконазолу и вориконазолу штам-

мов, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов с рецидивирующим орофарингеальным кандидозом, находящихся на лечении в ГБУЗ ИКБ № 2 ДЗМ, и 7 чувствительных штаммов в качестве контрольных образцов. 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) на основании требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» от июня 1964 г.

Штаммы культивировались на плотной питательной среде Сабуро и хромогенном агаре для грибов рода *Candida* (HiChrome, Himedia, Индия). Видовая идентификация проводилась рутинными методами, в том числе с помощью микроскопии нативных и окрашенных по Граму препаратов, тестов на образование ростовых трубок в присутствии сыворотки и способности к образованию гиф на кукурузном агаре по Дальмау, оценке морфологии, а также с помощью биохимических тестов (remel RapID Yeast Plus). Идентификация подтверждалась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с видоспецифическими праймерами («АмплиСенс *C. albicans/C. glabrata/C. krusei*—МУЛЬТИПРАЙМ-FL», ООО «Интерлабсервис», Россия). Устойчивость к флуконазолу и вориконазолу определялась диско-диффузионным методом в соответствии со стандартами CLSI M44 и M60, методом микроразведений с помощью планшетов Sensititre YeastOne10 (Trek Diagnostic System, Великобритания).

Уровни экспрессии генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* были измерены с помощью количественной ПЦР и метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ для анализа, где $\Delta C_T = C_{T,X} - C_{T,R}$ — разница между пороговыми циклами исследуемого и контрольного генов, и $-\Delta\Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb})$ — разница между значением, полученным для образца *q*, и базовым значением, полученным для чувствительных изолятов [18]. Выделение РНК проводилось с помощью реагента для выделения суммарной РНК ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией производителя из суточной чистой культуры исследуемого штамма. Обратная транскрипция проводилась с помощью набора «Реверта-Л» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя: 30 мин при 37°C.

В работе использовались следующие праймеры:

- *ERG11-F* aactactttgtttataatttaagatggactattga;
- *ERG11-R* aatgatttctgctggttcagtaggt;
- *MDR1-F* ttacctgaaacttttggcaaaaaca;

- *MDR1-R* acttgtgattctgtcgttacccg;
- *CDR2-F* ggtattggctggctcaatgtga;
- *CDR2-R* gcttgaatcaataagtgatggattac;
- *CDR1-F* tttagccagaactttcactcatgatt;
- *CDR1-R* tatttattttctcatgttcatatggattga;
- *PMA1-F* ttgaagatgaccaccaatcc;
- *PMA1-R* gaaacctctggaagcaaatgg;
- *ACT1-F* ttggatgaagcccaatcc;
- *ACT1-R* catatcgtcccagttggaaca.

Амплификация 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°C 3 мин; далее 40 циклов: 95°C — 10 с, 55°C — 20 с.

Гены домашнего хозяйства *ACT* и *PMA* использовались в качестве контрольных генов. Базовые значения $2^{-\Delta\Delta C_t}$ для генов *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* 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 (3σ).

Для статистического анализа использовалось программное обеспечение Microsoft Excel. Для оценки значимости различий между группами использовался точный критерий Фишера. Критический уровень ошибки при проверке статистических гипотез принимался равным или менее 0,05.

Результаты

В ходе проведенного исследования было установлено, что у каждого из устойчивых штаммов в нашей выборке повышен уровень экспрессии по крайней мере одного из изучаемых генов ($p = 0,0001$) (рис. 1).

Уровни экспрессии *ERG11* были значительно повышенными у 77% ($n = 14$) изолятов. У одного штамма (№ 128) был повышен уровень экспрессии только *ERG11*. Уровень экспрессии гена *MDR1* был повышен только в 27% случаев ($n = 5$). У подавляющего большинства изолятов обнаружены повышенные уровни экспрессии генов *CDR1* и *CDR2*: 88% ($n = 16$) и 83% ($n = 15$) соответственно (рис. 2). При этом уровень экспрессии *CDR2*, но не *CDR1*, был повышен только у одного штамма. У данного штамма (№ 122), помимо этого, отмечалась гиперэкспрессия *ERG11*, и нормальный уровень экспрессии *MDR1*. В то же время гиперэкспрессия *CDR1* без *CDR2* отмечалась у трех штаммов, у одного из них без гиперэкспрессии других генов, у двух — *ERG11*, но не *MDR1*. У 1 штамма (№ 51.2) была выявлена повышенная не менее чем в 10 раз по сравнению

с другими штаммами экспрессия всех исследуемых генов, за исключением *ERG11*. Штаммы с изолированным повышением экспрессии *MDR1* или *MDR1* и *ERG11* отсутствовали.

У 13 штаммов (59%) одновременно был повышен уровень *CDR1* и *CDR2*. Выявлена равноценная взаимосвязь экспрессии *CDR1* и *CDR2* ($p < 0,01$). У 2 штаммов (9%) повышен уровень только *CDR1*, *CDR2*. У 1 штамма (№ 8.2) повышен уровень экспрессии только гена *CDR1*, при этом в выборке отсутствуют штаммы с изолированной гиперэкспрессией *CDR2*.

У 5 штаммов (22%) была выявлена коэкспрессия *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*, у 4 штаммов (18%) — коэкспрессия всех исследуемых генов. Таким образом, при повышении экспрессии *MDR1* наблюдалось одновременное повышение экспрессии *CDR1/2* (100%, $n = 5$) и *ERG11* (92,9%, $n = 4$) ($p < 0,05$). При этом обратного влияния повышения экспрессии *CDR1/2*, *ERG11* на экспрессию *MDR1* не выявлено.

У 10 штаммов (45,5%) была обнаружена коэкспрессия *CDR1*, *CDR2* и *ERG11*. Выявлена равноценная взаимосвязь экспрессии *ERG11*

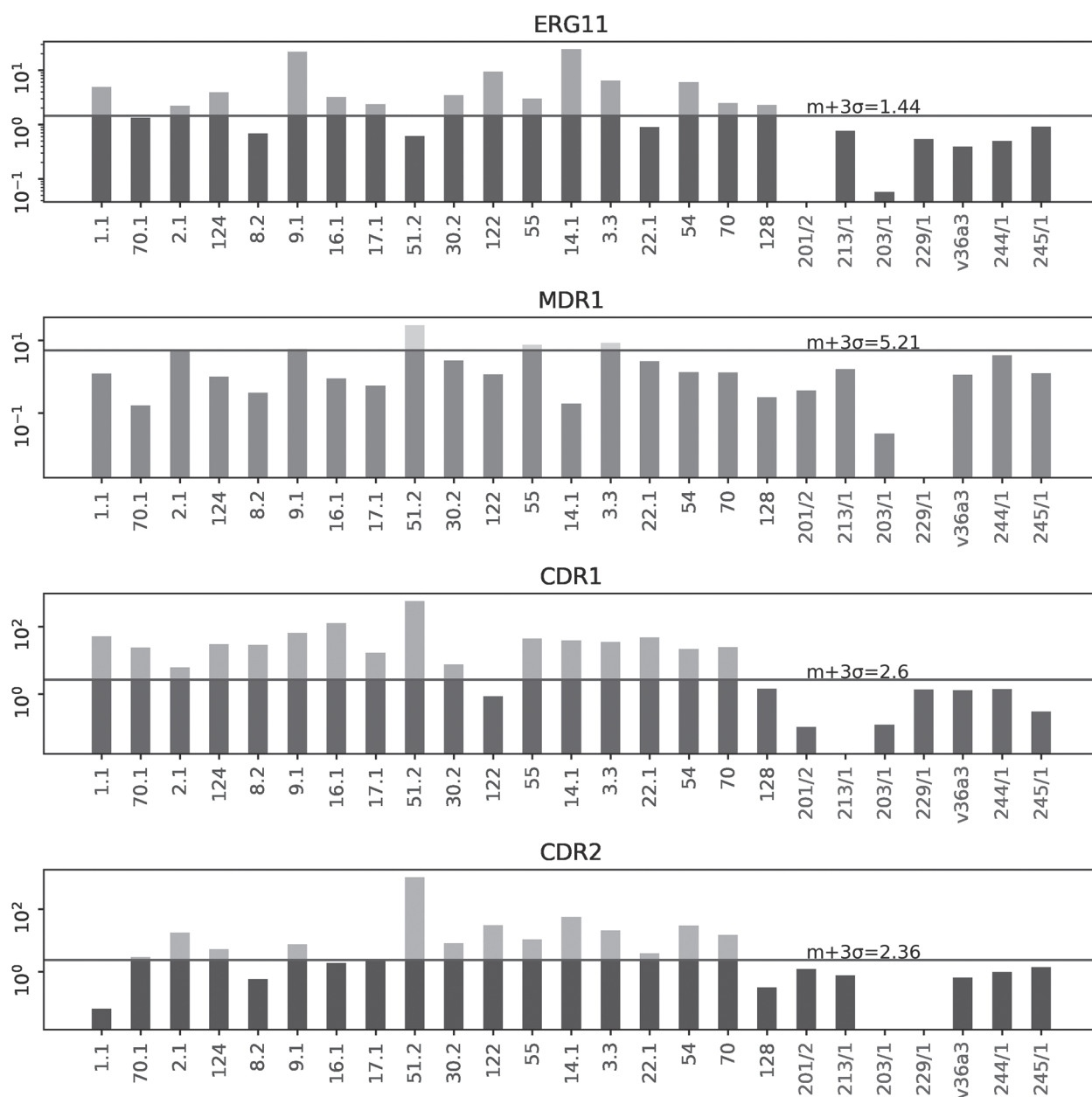


Рисунок 1. Уровни экспрессии *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* ($-2\Delta\Delta CT$)

Figure 1. *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* expression levels ($-2\Delta\Delta CT$)

Примечание. Линией обозначен уровень $m+3\sigma$, 1.1–128 — устойчивые изоляты, 201/2–245/1 — чувствительные изоляты.
Note. Line depicts $m+3\sigma$ level, 1.1–128 — resistant isolates, susceptible controls — 201/2–245/1.

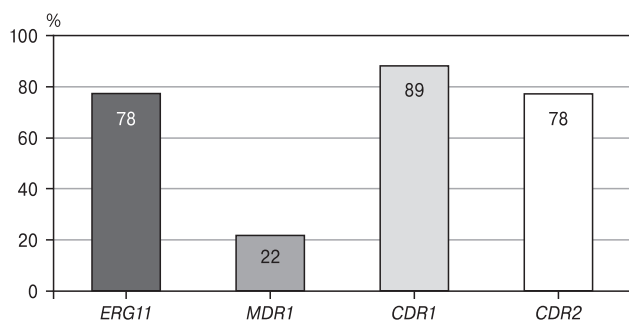


Рисунок 2. Доли штаммов с повышенным уровнем экспрессии *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*

Figure 2. Percentage of strains with elevated expression level of *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*

и *CDR1*, *ERG11* и *CDR2* ($p < 0,05$). Кроме того, выявлена взаимосвязь между повышением экспрессии *ERG11* и одновременным повышением экспрессии *CDR1*, *CDR2* ($p < 0,05$). Также выявлена взаимосвязь между повышением экспрессии *CDR2* и одновременным повышением экспрессии *ERG11* и *CDR1* ($p < 0,05$).

Обсуждение

Таким образом, было установлено, что в данной выборке изолятов *C. albicans* приобретенная устойчивость связана с несколькими вариантами коэкспрессии генов *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* и *MDR1*.

Различные механизмы устойчивости к азолам, включая повышение экспрессии генов эффлюксных переносчиков, подробно описаны для одного из первых выявленных устойчивых к азолам штаммов *C. albicans* — штамма Дарлингтон, выделенного от пациента с рецидивирующим кандидозом кожи и слизистых оболочек (Darlington strain). Селективное ингибирование *MDR1* и *CDR1* у данного штамма не приводило к снижению устойчивости к флуконазолу или вориконазолу. Однако при ингибировании *CDR1* восстанавливалась чувствительность к итраконазолу и позаконазолу. Это позволяет предположить влияние *MDR1* на устойчивость к короткоцепочечным азолам — флуконазолу и вориконазолу, но не к итраконазолу и позаконазолу. Повышенная экспрессия *ERG11* также обеспечивает устойчивость лишь к короткоцепочечным азолам [12]. В другом подобном исследовании описывается серия из 17 штаммов *C. albicans*, выделенных за два года от ВИЧ-инфицированного пациента, получавшего терапию азолами против рецидивирующего орофарингеального кандидоза. За период исследования уровень устойчивости возрос более чем в 200 раз, были выявлены мутации в гене *ERG11*, регуляторах транскрипции

Tac1, Urc2, что приводило к повышенной экспрессии *CDR1*, *CDR2*, *ERG11*. Уровень экспрессии *MDR1* также был повышен [33].

По данным нашего исследования у 59% штаммов были одновременно повышены уровни *CDR1* и *CDR2*. Подобные результаты достаточно характерны для устойчивых к азолам клинических изолятов *C. albicans* [1]. Это может быть обусловлено тем, что гены, кодирующие эффлюксные переносчики *CDR1* и *CDR2*, расположены в одном локусе на хромосоме 3, и часто обнаруживается их одновременная гиперэкспрессия [19]. Следует отметить, что *CDR1*, *CDR2* также регулируются общими механизмами, такими как промотор TAC1, расположенный в одном локусе на левом плече хромосомы 5 вместе с геном *ERG11*, промоторами CaNDT80, CaFCR1 и CaFCR3 [8].

В то же время в исследованной выборке имеются штаммы с изолированной экспрессией *CDR1* либо *CDR2*. Эти данные также находят подтверждение в результатах других исследований: делеция *CDR2* оказывает заметно меньшее воздействие на устойчивость к азолам по сравнению с отсутствием *CDR1* [16].

У подавляющего большинства изолятов был выявлен повышенный уровень экспрессии гена белка мишени азолов — *ERG11*. Также обнаруживалась коэкспрессия *ERG11* как минимум с одним из исследуемых генов. Однако в литературе имеются противоречивые сведения относительно распространенности экспрессии этого гена и его влияния на устойчивость к различным группам противогрибковых препаратов [40]. Многие исследователи отмечают, что в случае повышенной экспрессии *ERG11* минимальная подавляющая концентрация для препарата пропорционально повышается, в то время как мутационные механизмы обеспечивают полную устойчивость к антимикотику [24].

Уровень экспрессии гена эффлюксного переносчика *MDR1* был повышен в наименьшем числе образцов, хотя в работах ряда исследователей данный механизм был более распространенным [37]. Изолированная гиперэкспрессия *MDR1* не оказывает воздействия, сравнимого с другими эффлюксными переносчиками. Тем не менее он способен обеспечивать устойчивость к флуконазолу — наиболее часто рекомендуемому противогрибковому препарату [6]. Ген *MDR1* находится на хромосоме 6 и регулируется фактором транскрипции Mrr1 (Multidrug resistance regulator 1), мутации в котором могут приводить к конститутивному повышению его экспрессии [20].

В нашей выборке повышенный уровень экспрессии *MDR1* сопровождался одновременным повышением уровней экспрессии *CDR1*, *CDR2* и *ERG11* ($p < 0,05$). Это наблюдение может быть

обусловлено функционированием транскрипционного фактора Efg1, который к тому же регулирует образование гиф и другие факторы вирулентности *C. albicans* и рассматривается в качестве терапевтической мишени для новых препаратов [4]. Возможно также положительное влияние транскрипционного фактора Upe2, регулирующего преимущественно *ERG11*, на экспрессию *MDR1* и *CDR1* [10].

Практически в половине случаев (45,5%) наблюдалась коэкспрессия *CDR1*, *CDR2* и *ERG11*. Выявлена двусторонняя зависимость повышения экспрессии данных генов ($p < 0,05$). Кроме того, установлена зависимость одновременного повышения уровня экспрессии *CDR1*, *CDR2* при повышении *ERG11* ($p < 0,05$) и *ERG11*, *CDR1* при повышении экспрессии *CDR2* ($p < 0,05$). В литературе встречаются случаи возникновения анеуплоидии левого плеча пятой хромосомы *C. albicans*, где находится *ERG11*, а также регулятор транскрипции TAC1, влияющий на экспрессию *CDR1* и *CDR2*, что ведет к одновременной гиперэкспрессии гена 14- α -диметилазы и эффлюксных насосов *CDR1* и *CDR2* [15]. В то же

время на левом плече хромосомы 5 находятся гены *PGA4*, *CHT2*, *CNBI* и *MIDI*, ассоциированные с устойчивостью к эхинокандинам. Таким образом, появление подобной перестройки может быть механизмом множественной устойчивости к противогрибковым препаратам [34]. Также может играть роль транскрипционный фактор Ace2, который активирует гены *CDR1*, *CDR2*, *ERG11* и снижает экспрессию *MDR1* [39].

По результатам нашего исследования можно предположить, что выявленные механизмы устойчивости являются следствием длительного, широкого, а порой и бесконтрольного применения флуконазола, в том числе для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов. Возможно приобретение устойчивости, выходящей за рамки спектра короткоцепочечных азолов. Подобные явления могут приводить к неэффективной терапии случаев инвазивного кандидоза дорогостоящими резервными препаратами. Кроме того, нельзя исключать опасность широкого распространения штаммов *Candida* spp. с приобретенной устойчивостью к противогрибковым препаратам.

Список литературы/References

1. Беженар М.Б., Плахова К.И. Механизмы развития резистентности к противогрибковым препаратам грибов рода *Candida* при рецидивирующем течении урогенитального кандидоза // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2020. Т. 38, № 1. С. 15–23. [Bezhenar M.B., Plakhova K.I. Mechanisms of developing antifungal drug resistance of candida spp. in recurrent urogenital candidiasis. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2020, vol. 35, no. 1, pp. 15–23. (In Russ.)] doi: 10.17116/molgen20203801115
2. Веселов А.В., Козлов Р.С. Инвазивный кандидоз: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, терапии и профилактики у различных категорий пациентов (в вопросах и ответах) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2016. Т. 18, № 2 (Приложение). С. 1–104. [Veselov A.V., Kozlov R.S. Invasive candidiasis: modern aspects of epidemiology, diagnosis, therapy, and prevention in various categories of patients. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, vol. 18, no. 2 (suppl.), pp. 1–104. (In Russ.)]
3. Пашинина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Попова Л.П. Антимикотикорезистентность грибов рода *Candida*, выделенных из репродуктивного тракта женщин с воспалительными заболеваниями гениталий // Бюллетень Оренбургского Научного Центра УрО РАН. 2016. № 3. 9 с. [Pashinina O.A., Kartashova O.L., Pashkova T.M., Popova L.P. Antimycotic resistance of *Candida* fungi isolated from the reproductive tract of women with inflammatory diseases of the genitals. *Byulleten' Orenburgskogo Nauchnogo Tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2016, no. 3, 9 p. (In Russ.)]
4. Araújo D., Mil-Homens D., Henriques M., Silva S. Anti-EFG1 2'-OMethylRNA oligomer inhibits *Candida albicans* filamentation and attenuates the candidiasis in *Galleria mellonella*. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2021, vol. 27, pp. 517–523. doi: 10.1016/j.omtn.2021.12.018
5. Assres H.A., Selvarajan R., Nyoni H., Mamba B.B., Msagati T.A.M. Antifungal azoles and azole resistance in the environment: current status and future perspectives — a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2021, vol. 20, pp. 1011–1041. doi: 10.1007/s11157-021-09594-w
6. Banerjee A., Pata J., Sharma S., Monk B.C., Falson P., Prasad R. Directed mutational strategies reveal drug binding and transport by the MDR transporters of *Candida albicans*. *J. Fungi (Basel)*, 2021, vol. 7, no. 2: 68. doi: 10.3390/jof7020068
7. Bhattacharya S., Sae-Tia S., Fries B.C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics*, 2020, vol. 9, no. 6: 312. doi: 10.3390/antibiotics9060312
8. Biswas C., Chen C.-A., Halliday C., Kennedy K., Playford E.G., Marriott D.J., Slavin M.A., Sorrell T.C., Sintchenko V. Identification of genetic markers of resistance to echinocandins, azoles and 5-fluorocytosine in *Candida glabrata* by next-generation sequencing: a feasibility study. *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 23, no. 9, pp. 676.e7–676.e10. doi: 10.1016/j.cmi.2017.03.014
9. Bongomin F., Gago S., Oladele R., Denning D. Global and multi-national prevalence of fungal diseases — estimate precision. *J. Fungi (Basel)*, 2017, vol. 3, no. 4: 57. doi: 10.3390/jof3040057
10. Flowers S.A., Barker K.S., Berkow E.L., Toner G., Chadwick S.G., Gygas S.E., Morschhäuser J., Rogers P.D. Gain-of-function mutations in UPC2 are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 2012, vol. 11, no. 10, pp. 1289–1299. doi: 10.1128/EC.00215-12

11. Garcia-Effron G. Molecular markers of antifungal resistance: potential uses in routine practice and future perspectives. *J. Fungi (Basel)*, 2021, vol. 7, no. 3: 197. doi: 10.3390/jof7030197
12. Graham D.O., Wilson R.K., Ruma Y.N., Keniya M.V., Tyndall J.D.A., Monk B.C. Structural insights into the azole resistance of the *Candida albicans* darlington strain using *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol 14 α -demethylase as a surrogate. *J. Fungi (Basel)*, 2021, vol. 7, no. 11: 897. doi: 10.3390/jof7110897
13. Hampe I.A.I., Friedman J., Edgerton M., Morschhäuser J. An acquired mechanism of antifungal drug resistance simultaneously enables *Candida albicans* to escape from intrinsic host defenses. *PLoS Pathog.*, 2017, vol. 13, no. 9: e1006655. doi: 10.1371/journal.ppat.1006655
14. Hoving J.C., Brown G.D., Gómez B.L., Govender N.P., Limper A.H., May R.C., Meya D.B. AIDS-related mycoses: updated progress and future priorities. *Trends Microbiol.*, 2020, vol. 28, no. 6, pp. 425–428. doi: 10.1016/j.tim.2020.01.009
15. Kukurudz R.J., Chapel M., Wonitowy Q., Bukari A.-R.A., Sidney B., Sierhuis R., Gerstein A.C. Acquisition of cross-azole tolerance and aneuploidy in *Candida albicans* strains evolved to posaconazole. *G3 (Bethesda)*, 2022, vol. 12, no. 9: jkac156 doi: 10.1093/g3journal/jkac156
16. Lee Y., Puumala E., Robbins N., Cowen L.E. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem. Rev.*, 2021, vol. 121, no. 6, pp. 3390–3411. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199
17. Liu J.-Y.Y., Shi C., Wang Y., Li W.-J.J., Zhao Y., Xiang M.-J.J. Mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from Shanghai, China. *Res. Microbiol.*, 2015, vol. 166, no. 3, pp. 153–161. doi: 10.1016/j.resmic.2015.02.009
18. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, vol. 25, no. 4, pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
19. Maras B., Maggiore A., Mignogna G., D'Erme M., Angiolella L. Hyperexpression of CDRs and HWP1 genes negatively impacts on *Candida albicans* virulence. *PLoS One*, 2021, vol. 16, no. 6: e0252555. doi: 10.1371/journal.pone.0252555
20. Morio F., Pagniez F., Besse M., Oise Gay-Andrieu F., Miegerville M., Le Pape P. Deciphering azole resistance mechanisms with a focus on transcription factor-encoding genes TAC1, MRR1 and UPC2 in a set of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2013, vol. 42, pp. 410–415. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.07.013
21. Morschhäuser J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 2010, vol. 47, no. 2, pp. 94–106. doi: 10.1016/j.fgb.2009.08.002
22. Moye-Rowley W.S. Linkage between genes involved in azole resistance and ergosterol biosynthesis. *PLoS Pathog.*, 2020, vol. 16, no. 9: e1008819. doi: 10.1371/journal.ppat.1008819
23. Niimi M., Niimi K., Tanabe K., Cannon R.D., Lamping E. Inhibitor resistant mutants give important insights into *Candida albicans* ABC transporter Cdr1 substrate specificity and help elucidate efflux pump inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2022, vol. 66, no. 1: e0174821. doi: 10.1128/AAC.01748-21
24. Oliveira J.M.V., Oliver J.C., Dias A.L.T., Padovan A.C.B., Caixeta E.S., Ariosa M.C.F. Detection of ERG11 Overexpression in *Candida albicans* isolates from environmental sources and clinical isolates treated with inhibitory and subinhibitory concentrations of fluconazole. *Mycoses*, 2021, vol. 64, no. 2, pp. 220–227 doi: 10.1111/myc.13208
25. Orlandini R.K., Bepu D.A.N., Saraiva M.D.C.P., Bollela V.R., Motta A.C.F., Lourenço A.G. Are *Candida albicans* isolates from the oral cavity of HIV-infected patients more virulent than from non-HIV-infected patients? Systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, 2020, vol. 149: 104477. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104477
26. Pankhurst C.L. Candidiasis (oropharyngeal). *BMJ Clin. Evid.*, 2013, vol. 2013: 1304.
27. Paul S., Moye-Rowley W.S. Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. *Front. Physiol.* 2014, vol. 5: 143. doi: 10.3389/fphys.2014.00143
28. Perea S., López-Ribot J.L., Kirkpatrick W.R., McAtee R.K., Santillán R.A., Martínez M., Calabrese D., Sanglard D., Patterson T.F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, vol. 45, no. 10, pp. 2676–2684. doi: 10.1128/AAC.45.10.2676-2684.2001
29. Perlin D.S., Rautemaa-Richardson R., Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect. Dis.*, 2017, vol. 17, no. 12, pp. e383–e392. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30316-X
30. Pfaller M.A., Carvalhaes C.G., DeVries S., Huband M.D., Castanheira M. Elderly versus nonelderly patients with invasive fungal infections: species distribution and antifungal resistance, SENTRY antifungal surveillance program 2017–2019. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2022, vol. 102, no. 4: 115627. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2021.115627
31. Rajadurai S.G., Maharajan M.K., Veetil S.K., Gopinath D. Comparative efficacy and safety of antifungal agents in the prophylaxis of oropharyngeal candidiasis among HIV-infected adults: a systematic review and network meta-analysis. *Life (Basel)*, 2022, vol. 12, no. 4: 515. doi: 10.3390/life12040515
32. Redhu A.K., Shah A.H., Prasad R. MFS transporters of *Candida* species and their role in clinical drug resistance. *FEMS Yeast Res.*, 2016, vol. 16, no. 4: fow043 doi: 10.1093/femsyr/fow043
33. Robbins N., Caplan T., Cowen L.E. Molecular evolution of antifungal drug resistance. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 71, no. 1, pp. 753–775. doi: 10.1146/annurev-micro-030117-020345
34. Sah S.K., Hayes J.J., Rustchenko E. The role of aneuploidy in the emergence of echinocandin resistance in human fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog.*, 2021, vol. 17, no. 5: e1009564. doi: 10.1371/journal.ppat.1009564
35. Sanglard D., Coste A., Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res.*, 2009, vol. 9, no. 7, pp. 1029–1050. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00578.x
36. Sanguinetti M., Posteraro B., Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 2015, vol. 58, suppl. 2, pp. 2–13. doi: 10.1111/myc.12330
37. Shi C., Liu J., Li W., Zhao Y., Meng L., Xiang M. Expression of fluconazole resistance-associated genes in biofilm from 23 clinical isolates of *Candida albicans*. *Braz. J. Microbiol.*, 2019, vol. 50, no. 1, pp. 157–163. doi: 10.1007/s42770-018-0009-2
38. Teo J.Q.-M., Lee S.J.-Y., Tan A.-L., Lim R.S.-M., Cai Y., Lim T.-P., Kwa A.L.-H. Molecular mechanisms of azole resistance in *Candida* bloodstream isolates. *BMC Infect Dis.*, 2019, vol. 19, no. 1: 63. doi: 10.1186/s12879-019-3672-5

39. Wakade R.S., Ristow L.C., Stamnes M.A., Kumar A., Krysan D.J. The Ndr/LATS kinase Cbk1 regulates a specific subset of Ace2 functions and suppresses the hypha-to-yeast transition in *Candida albicans*. *mBio*, 2020, vol. 11, no. 4: e01900-20. doi: 10.1128/mBio.01900-20
40. Zhang J., Li L., Lv Q., Yan L., Wang Y., Jiang Y. The fungal CYP51s: their functions, structures, related drug resistance, and inhibitors. *Front. Microbiol.*, 2019, vol. 10: 691. doi: 10.3389/fmicb.2019.00691

Авторы:

Воропаев А.Д., аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

Екатеринчев Д.А., аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

Урбан Ю.Н., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Зверев В.В., академик РАН, д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

Несвижский Ю.В., д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

Воропаева Е.А., д.б.н., доцент, главный научный сотрудник, руководитель отдела медицинской биотехнологии ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Лиханская Е.И., к.б.н., руководитель лаборатории микробиологии и профилактики кишечных инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Афанасьев М.С., д.м.н., профессор кафедры клинической аллергологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

Афанасьев С.С., д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Voropaev A.D., PhD Student, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Yekaterinchev D.A., PhD Student, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Urban Yu.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Zverev V.V., RAS Full Member, PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Nesvizhsky Yu.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Voropaeva E.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head Researcher, Head of Medical Biotechnology Department, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Likhanskaya E.I., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Microbiology and Prophylaxis of Intestinal Infections, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Afanasiev M.S., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Clinical Allergology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Afanasiev S.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Head Researcher, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.04.2022
Принята к печати 15.05.2022

Received 19.04.2022
Accepted 15.05.2022