

УДК 616.992.282

DOI: 10.14427/jipai.2022.3.40

Анализ цитотоксических свойств коллекционных штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза

Д.Л. Терешко, И.В. Новицкая

Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Волгоград

Analysis of the cytotoxic properties of collection strains of coccidioidomycosis causative agents

D.L. Tereshko, I.V. Novitskaya

Federal Government Health Institution «Volograd Plague Control Research Institute» of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Volgograd, Russia

Аннотация

Актуальность. *C. immitis* и *C. posadasii* являются первичными патогенами и представляют обоснованный интерес в отношении их биологических свойств и, в частности, цитотоксических характеристик.

Цель. Изучить цитотоксичность штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза с помощью МТТ-теста на моделях клеточных линий *in vitro*.

Материалы и методы. Штаммы *Coccidioides* spp. культивировали в питательной среде, предназначенной для перевиваемых линий. Культуры Wehi 3 и HEp-2 подвергали воздействию стерильных фильтратов ростовой среды возбудителей кокцидиоидомикоза в различных разведениях с последующим измерением митохондриальной активности клеток в МТТ-тесте на 4 сут. Оценку цитотоксических свойств грибов рода *Coccidioides* проводили путём расчёта цитотоксической концентрации (CC50) продуктов метаболизма микромицетов.

Результаты. Подобрана наиболее адекватная клеточная модель, а также отработаны условия постановки МТТ-теста для изучения *in vitro* цитопатогенных эффектов микромицетов рода *Coccidioides*. Установлено, что штаммы *Coccidioides* spp. обладают различной интенсивностью продукции метаболитов, которая, в свою очередь, напрямую не коррелирует с их цитотоксичностью. С помощью расчёта цитотоксической концентрации (CC50) получены данные о цитотоксических свойствах 7 коллекционных штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза в мицелиальной фазе роста.

Заключение. На основании результатов оценки митохондриальной активности клеток перевиваемых линий Wehi 3 и HEp-2 подтверждены выраженные цитотоксические свойства коллекционных штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза, в течение длительного времени пересеиваемые *in vitro*.

Ключевые слова

Цитотоксичность, микромицеты, *Coccidioides* spp., кокцидиоидомикоз, клеточные линии, МТТ-тест.

Summary

Introduction. *C. immitis* and *C. posadasii* are primary pathogens and are of reasonable interest in terms of their biological properties and, in particular, cytotoxic characteristics.

Aim. To study the cytotoxicity of strains of coccidioidomycosis causative agents using the MTT test on *in vitro* models of cell lines.

Materials and methods. Strains *Coccidioides* spp. were cultivated in a nutrient medium intended for cell lines. Cultures Wehi 3 and HEp-2 were exposed to sterile filtrates of the growth medium of causative agents of coccidioidomycosis in various dilutions, followed by measuring the mitochondrial activity of cells in the MTT-assay on day 4. The cytotoxic properties of fungi of the genus *Coccidioides* were assessed by calculating the cytotoxic concentration (CC50) of the metabolic products of micromycetes.

Results. The most adequate cell model was selected, as well as the conditions for setting the MTT test for the *in vitro* study of the cytopathogenic effects of micromycetes of the genus *Coccidioides* were worked out. It was found that the strains *Coccidioides* spp. have different intensities of metabolite production, which, in turn, does not directly correlate with their cytotoxicity. By calculating the cytotoxic concentration (CC50), data were obtained on the cytotoxic properties of 7 collection strains of coccidioidomycosis pathogens in the mycelial growth phase.

Conclusion. Based on the results of assessing the mitochondrial activity of cells of the lines Wehi 3 and HEp-2, the pronounced cytotoxic properties of the collection strains of coccidioidomycosis causative agents, which were subcultured *in vitro* for a long time, were confirmed.

Keywords

Cytotoxicity, micromycetes, *Coccidioides* spp., Coccidioidomycosis, cell lines, MTT-assay.

Введение

Ежегодно микотические инфекции регистрируют более чем у миллиарда людей, а для 1,5 миллионов они становятся смертельными [1]. Возбудители кокцидиоидомикоза, являющиеся первичными патогенами, способны приводить к развитию инфекции даже у лиц с сохранённым иммунным статусом.

Известно, что в эндемичных регионах США среди инвазивных микозов заболеваемость кокцидиоидомикозом достигает 25% и уступает по распространённости лишь кандидозу [2].

Грибы *Coccidioides* spp. на протяжении долгого времени считали единым видом – *C. immitis*, однако в результате проведённых в конце прошлого столетия молекулярно-генетических исследований этот вид был разделён на калифорнийский и некалифорнийский варианты – соответственно, *C. immitis*, обитающий в высокоэндемичных регионах пустынь Калифорнии, и *C. posadasii*, включающий популяции из других американских штатов, Южной Калифорнии, а также стран Южной Америки. В результате анализа ДНК-полиморфизмов было показано, что эти виды не вступали в рекомбинации друг с другом на протяжении десятков миллионов лет, однако считают, что фенотипически виды *C. posadasii* и *C. immitis* неотличимы друг от друга и в равной мере способны вызывать фатальные инфекции. Микромицеты рода *Coccidioides* – возбудители кокцидиоидомикоза – обладают температурным диморфизмом и во внешней среде формируют мицелиальные структуры, распадающиеся на отдельные клетки – артроконидии (артроспоры), в то время как в макроорганизме они образуют многоклеточные округлые образования – сферулы.

Заражение человека происходит путём вдыхания артроспор, размеры которых (2-5 мкм) позволяют им беспрепятственно проникать в нижние отделы дыхательных путей, где они прикрепляются к эпителию и претерпевают конверсию в тканевую фазу. Протеолитическая активность клеток возбудителей кокцидиоидомикоза способствует глубокому повреждению тканей и облегчает инвазию микромицета, при этом основной иммунореактивный комплекс сферул – гликопротеин SOWgp (spherule outer wall glycoprotein), связываясь как с фибриллярными, так и нефибриллярными белками внеклеточного матрикса (такими как ламинин, фибронектин и коллаген), формирует на её поверхности слой, затрудняющий фагоцитирование грибной клетки макрофагами и в конечном итоге

существенно снижающий уровень иммунной защиты макроорганизма [3, 4]. С другой стороны, эстрадиолсвязывающие белки, обнаруженные в цитоплазме грибной клетки (прогестерон, тестостерон и 17-β-эстрадиол (E2)) и стимулирующие созревание сферул, способствуют высвобождению из них эндоспор, что на фоне нарушенного клеточно-опосредованного иммунного ответа вызывает практически беспрепятственную диссеминацию возбудителя.

При этом реализация возбудителем его факторов патогенности неизбежно сопровождается поражением и гибелью клеток инфицированных тканей [5, 6], в связи с чем определение уровня цитотоксичности микроорганизма, с нашей точки зрения, представляет собой актуальную и научно обоснованную задачу.

Способы изучения цитотоксичности могут быть распределены по группам, базирующимся на учёте синтеза ДНК (BrdU Cell Proliferation Assay, EdU Proliferation Assays), методах определения люминесценции (ATP Cell Viability Luciferase Assay), использовании флуоресцентных красителей (CFSE Labeling, Live/Dead Cell Double Staining), а также колориметрической оценке метаболической активности клеток (MTT, XTT, WST-1, CCK-8 Cell Proliferation Assays) [7]. Для учёта изменений жизнеспособности клеток млекопитающих под воздействием цитотоксических соединений Mosmann в своих трудах отразил возможность применения бромида тетразолия – 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) [8]. Данный прототип был оптимизирован и использован в многочисленных экспериментах как с прокариотическими, так и с эукариотическими клетками [9]. Впоследствии соли тетразолия, восстанавливающиеся под действием митохондриальных оксидоредуктаз живых клеток до формаза, заняли уверенное место в методах количественного колориметрического анализа, демонстрируя такие преимущества, как высокую точность и воспроизводимость результатов тестов в сочетании с безопасностью и простотой использования реагентов для них.

С другой стороны, широкое распространение при изучении *in vitro* цитотоксичности различных веществ, фармацевтических препаратов, имплантов, медицинских изделий и т.д. получило культивирование перевиваемых опухолевых линий [10]. Культуры клеток представляют собой простую биомодель, благодаря которой удалось решить этические вопросы, касающиеся ограничения использования ла-

бораторных животных в качестве объектов экспериментальных исследований. При оценке цитопатогенных эффектов различных субстанций регламентировано (ГОСТ ISO 10993-5-2011) использование разносторонне охарактеризованных линий клеток, в том числе из международных биологических коллекций (Cell Lines Service GmbH (CLS), European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), American Type Culture Collection (ATCC), Российская коллекция клеточных культур позвоночных (РККК П). Работа с культурами клеток позволяет визуализировать и оценить морфофункциональное состояние, степень пролиферации, а также уровень ответных реакций живых клеток на воздействие различных агентов, что даёт возможность с высокой эффективностью выявлять минимальные концентрации веществ, оказывающих цитотоксический эффект [11]. При этом тестирование *in vitro* может оказаться даже более чувствительным и точным, чем *in vivo*, когда фенотипические проявления структурных и функциональных поражений клеток в отдельных тканях могут быть скорректированы адаптационными возможностями макроорганизма в целом [12].

Таким образом, оценка цитотоксического действия *Coccidioides* spp. на клеточных моделях имеет, несомненно, перспективное значение в расширении представлений о биологических свойствах отдельных штаммов этих возбудителей.

Цель. Изучение цитотоксичности коллекционных штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза на культурах перевиваемых клеточных линий *in vitro* с помощью МТТ-теста.

Материалы и методы

В ходе работы проанализирована цитотоксичность 7 штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза, представленных в Коллекции микроскопических грибов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора: *C. immitis* C5, *C. immitis* 333, *C. posadasii* B13, *C. posadasii* 22, *C. posadasii* 36S, *C. posadasii* 442 и *C. posadasii* M11.

Оценку токсического действия проводили на моделях культур клеток Wehi 3 и HEp-2, полученных из Российской коллекции клеточных культур Института Цитологии РАН (г. Санкт-Петербург).

Для выполнения МТТ-теста в стерильные 96-луночные пластины вносили клетки перевиваемых линий в бессывороточной среде IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma,

США) из расчёта 10^4 кл./лун. в объёме 50 мкл. Микромицеты рода *Coccidioides* с учётом их жизненного цикла инкубировали не менее 3-4 недель в такой же среде, после чего осуществляли деконтаминацию последней путём фильтрования с помощью стерилизующей шприцевой насадки Millipore Millex с диаметром пор 0,45 мкм.

В связи с работой с возбудителями кокцидиоидомикоза, относящимися к группе патогенных биологических агентов (ПБА) II группы патогенности, все действия проводили согласно требованиям санитарно-эпидемиологических правил СП 3.3686-21.

Спустя 24 часа фильтраты ростовой среды микромицетов титровали от цельного до 1/8 в стерильных условиях, после чего их вносили в лунки трёх 96-луночных пластин, содержащих культуры клеток в среде Искова, аликвотами по 50 мкл. В итоге разведения образцов составляли от 1/2 до 1/16 соответственно. Контролями служили лунки с культурами клеток, в которые была добавлена интактная среда Искова.

Концентрацию белка в фильтратах сред культивирования коллекционных штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза определяли колориметрически методом Бредфорда по стандартной методике в трёх сериях. Результат регистрировали на планшетном ридере Fluostar omega (BMG Labtech, Германия).

Цитотоксичность штаммов *Coccidioides* spp. оценивали путём постановки МТТ-теста (Roche, Швейцария), для чего в каждую из 3-х тестируемых пластин соответственно на 3, 4 и 5 сут вносили 10 мкл реагента МТТ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), затем выдерживали их в условиях CO_2 -инкубатора в течение 4 ч, необходимых для конверсии жёлтой соли тетразолия в пурпурные кристаллы формазана, добавляли 100 мкл буфера солибилизации и спустя 24 ч проводили спектрофотометрию образцов на мультимодальном ридере Fluostar omega (BMG Labtech, Германия) при 550 нм и референсной волне 650 нм.

Проведение опытов осуществляли в 3-х повторностях.

Показатели цитотоксичности рассчитывали на основании полученных спектрофотометрических данных по формуле:

$$Ц = 100 - \frac{О_{\text{Образца 550 нм}} - О_{\text{Образца 650 нм}}}{О_{\text{Контроля 550 нм}} - О_{\text{Контроля 650 нм}}} \times 100\%$$

где:

Ц – цитотоксичность;

ОП – оптическая плотность.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли в программном обеспечении Microsoft Office 2019. Цитотоксическую концентрацию CC50 определяли с помощью четырехпараметрического уравнения на соответствующем интернет-ресурсе Four parameter logistic (4PL) Calculator (<https://www.aatbio.com/tools/four-parameter-logistic-4pl-curve-regression-online-calculator>).

Результаты исследований

Фильтраты бессывороточной среды Искова, содержащие продукты метаболизма 7 коллекционных штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза, потенциально обладающие цитотоксичными по отношению к тканям макроорганизма характеристиками, были проанализированы на предмет содержания в них белка (табл. 1).

Как следует из данных табл. 1, концентрация белка в среде культивирования штаммов вида *C. posadasii* варьировала в диапазоне от 5,3 до 10,9 мкг/мл, в то время как оба штамма вида *C. immitis* по уровню продукции белковых метаболитов

практически не отличались друг от друга (8,2 мкг/мл и 8,6 мкг/мл соответственно).

Цитотоксические свойства фильтратов штаммов *Coccidioides* spp. были определены в МТТ-тесте на моделях клеточных культур Wehi 3 и HEp-2 и представлены путём вычисления (расчёта) средней арифметической и стандартного отклонения (табл. 2). Было отмечено, что именно на 4 сут прослеживалась наибольшая разница в показателях гибели опытных клеток перевиваемых линий по сравнению с контролем.

Согласно представленным в табл. 2 данным, цитопатогенный эффект штаммов *Coccidioides* spp., определяемый как показатель гибели клеток перевиваемых линий, был отмечен во всех наблюдениях и находился в чёткой обратно пропорциональной зависимости от степени разведения фильтратов, содержащих токсические продукты метаболизма возбудителей кокцидиоидомикоза (корреляция составляет $0,96 \pm 0,048$). Следует отметить, что линия HEp-2 демонстрировала потерю жизнеспособности клеток на уровне от $(56,54 \pm 1,73)\%$ до $(90,54 \pm 3,90)\%$ ($Me=59,56$) в первом из исследуемых разведений фильтратов

Таблица 1. Концентрация общего белка (С белка мкг/мл) в фильтратах ростовой среды штаммов *Coccidioides* spp. на 30 сут культивирования

Штамм	<i>C. posadasii</i>			<i>C. immitis</i>			
	M11	442	22	B13	36S	333	C5
С белка, мкг/мл	5,3	5,8	10,9	5,4	6,9	8,2	8,6

Таблица 2. Показатели цитотоксичности штаммов *Coccidioides* spp. на перевиваемых клеточных линиях HEp-2 и Wehi 3 по результатам МТТ-теста на 4 сут культивирования

Изучаемые микромицеты	Модели клеточных линий	Показатели цитотоксичности в зависимости от степени разведения, % ($M \pm \sigma$)				Корреляция
		1/2	1/4	1/8	1/16	
<i>C. posadasii</i> M11	HEp-2	68,98±0,42	33,27±5,10	21,42±2,18	19,38±6,40	0,99
	Wehi 3	78,10±4,87	43,60±5,83	28,98±4,07	21,90±4,15	0,99
<i>C. posadasii</i> 442	HEp-2	57,77±2,60	34,41±3,58	28,66±2,93	23,08±5,60	0,98
	Wehi 3	60,84±6,11	42,05±5,64	38,35±3,37	35,82±3,76	0,98
<i>C. posadasii</i> 22	HEp-2	89,25±3,10	50,43±10,17	34,25±3,99	30,10±3,20	0,86
	Wehi 3	91,57±0,25	89,03±2,41	73,83±6,25	59,33±7,41	0,86
<i>C. posadasii</i> B13	HEp-2	59,56±5,51	50,02±2,55	36,01±3,47	26,64±3,74	0,95
	Wehi 3	78,04±2,12	49,75±4,59	31,58±5,18	24,95±6,09	0,99
<i>C. posadasii</i> 36S	HEp-2	56,54±1,73	38,17±7,70	37,82±4,54	28,72±5,51	0,97
	Wehi 3	79,50±4,66	53,75±4,42	39,57±4,70	29,07±8,62	0,99
<i>C. immitis</i> 333	HEp-2	58,16±6,49	38,00±2,66	33,71±3,89	28,18±7,67	0,99
	Wehi 3	77,32±4,59	52,11±3,91	47,02±3,39	39,71±6,99	0,99
<i>C. immitis</i> C5	HEp-2	90,54±3,90	47,25±7,97	35,34±6,13	26,95±6,33	0,99
	Wehi 3	91,06±0,84	81,27±5,55	66,57±4,89	50,53±7,57	0,92

и от (19,38±6,40)% до (30,10±3,20)% (Me=26,95) в последнем, в то время как для клеток линии Wehi 3 эти показатели составляли от (60,84±6,11)% до (91,57±0,25)% (Me=78,1) и от (21,90%±4,15)% до (59,33±7,41)% (Me=35,82) соответственно. При этом межштаммовые различия в цитотоксических свойствах микромицетов также значительно более отчётливо прослеживались на модели линии Wehi 3 по сравнению с клетками HEp-2 (рис. 1).

Как следует из представленных данных, клетки линии Wehi 3 в большей степени оказались подвержены цитотоксическому воздействию на них метаболитов возбудителей кокцидиоидомикоза, из которых наиболее выраженный цитоток-

сический эффект при всех разведениях фильтратов продемонстрировали штаммы *C. immitis* C5 и *C. posadasii* 22 ($p < 0,05$).

Показатели цитотоксической концентрации (CC50) токсических веществ для фильтратов сред культивирования каждого из 7 изученных музейных штаммов возбудителя кокцидиоидомикоза на моделях клеточных линий Wehi 3 и HEp-2 были определены путём решения уравнения регрессии (рис. 2).

Как следует из представленных данных, микромицеты *C. posadasii* 22, *C. posadasii* 36S, *C. immitis* 333, *C. immitis* C5 проявляли цитотоксические свойства наиболее отчётливо на линии клеток Wehi 3.

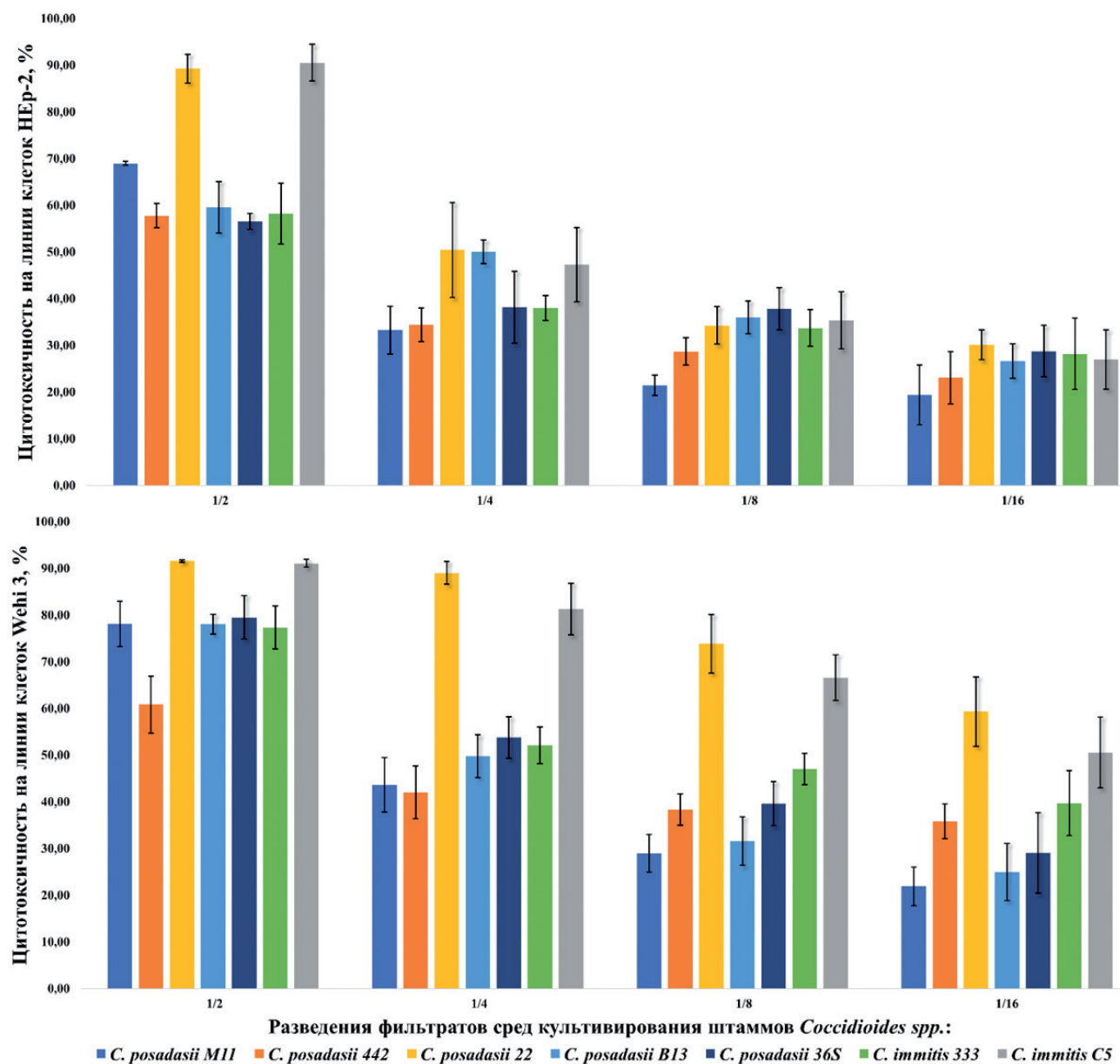


Рис. 1. Показатели цитотоксичности штаммов *Coccidioides* spp. по результатам МТТ-теста на моделях клеточных линий Wehi 3 (слева) и HEp-2 (справа)

Показатели CC_{50} фильтратов среды культивирования изученных штаммов, соответствующие количеству белковых продуктов, которые вызывают гибель 50% клеток в лунках, представлены ниже (табл. 3).

Согласно представленным в табл. 3 данным, если в среднем цитотоксическая концентрация фильтратов сред культивирования микромицетов *Coccidioides* spp. для линии Wehi 3 составила $1,32 \pm 0,6$ мкг/мл токсических веществ при медиане 1,47, то для линии HEp-2 она оказалась практически двукратно выше ($2,39 \pm 0,63$) мкг/мл, $Me=2,44$).

Обсуждение результатов

Использование альтернативных *in vitro* клеточных моделей открывает новые перспективы изучения биологических свойств микромицетов, позволяя как оценить их патогенные свойства *in vitro*, так и решить ряд этических вопросов. Применение МТТ-теста подразумевает изучение

образцов цитотоксических продуктов на моделях перевиваемых клеточных культур.

Нами отработаны условия постановки МТТ-теста для изучения *in vitro* цитопатогенных эффектов микромицетов рода *Coccidioides* на моделях перевиваемых линий тканей позвоночных Wehi 3 и HEp-2.

Как известно, микроскопические грибы отличаются неприхотливостью к питательным субстратам, и жидкой питательной средой выбора для них традиционно принято считать бульон Сабуро, в состав которого входят лишь пептон, глюкоза и – не всегда – ферментативный гидролизат соевой муки или дрожжевой аутолизат. Нами было решено использовать для культивирования возбудителей кокцидиоидомикоза среду Искова, рекомендуемую для поддержания жизнеспособности перевиваемых культур клеток, чтобы добавление в лунки с Wehi 3 или HEp-2 фильтратов не изменяло условий ведения клеточных линий, и результаты МТТ-теста могли быть

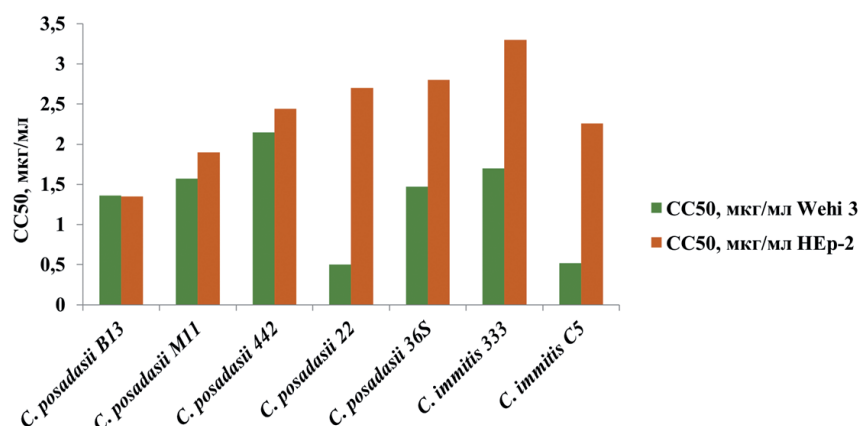


Рис. 2. CC_{50} фильтратов среды культивирования штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза на клеточных линиях Wehi 3 и HEp-2 по результатам МТТ-теста

Таблица 3. Показатели CC_{50} фильтратов сред культивирования штаммов *Coccidioides* spp. на моделях клеточных линий Wehi 3 и HEp-2

Штаммы возбудителей кокцидиоидомикоза	CC_{50} , мкг/мл Wehi 3	CC_{50} , мкг/мл HEp-2
<i>C. posadasii</i> M11	1,57	1,9
<i>C. posadasii</i> 442	2,15	2,44
<i>C. posadasii</i> 22	0,50	2,7
<i>C. posadasii</i> B13	1,36	1,35
<i>C. posadasii</i> 36S	1,47	2,8
<i>C. immitis</i> 333	1,7	3,3
<i>C. immitis</i> C5	0,52	2,26
$M \pm \sigma$	$1,32 \pm 0,6$	$2,39 \pm 0,63$
Me	1,47	2,44

связаны только с цитотоксическим воздействием изучаемых штаммов.

Выбор мышинной макрофагоподобной клеточной линии Wehi 3 был обоснован прежде всего тем, что макрофаги являются одними из эффекторов иммунной системы макроорганизма, а иммунный ответ на воздействие факторов вирулентности возбудителей особо опасных микозов носит клеточно-опосредованный характер. Линия карциномы гортани человека HEp-2, с нашей точки зрения, может представлять интерес по причине того, что клетки респираторного тракта являются входными «воротами» для возбудителей кокцидиоидомикоза, при котором основной путь заражения организма – аэрогенный [14]. И, действительно, обе клеточные линии позволяли выявить цитопатогенный эффект фильтратов сред культивирования всех изучаемых штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза – по результатам МТТ-теста показатели цитотоксичности микромицетов, отражающие процент клеток переживаемых культур, потерявших жизнеспособность под воздействием токсических продуктов гриба, составляли от (57,77±2,6)% до (91,06±0,84)% при разведении 1/2 и от (19,38±6,4)% до (59,33±7,41)% в титре 1/16 (при корреляции между показателями цитотоксичности и степенью разведения фильтратов от 0,86 до 0,99). Однако применительно к цитотоксическому воздействию фильтратов сред культивирования возбудителей кокцидиоидомикоза линия Wehi 3 оказалась значительно более чувствительной, чем линия HEp-2, позволяя не только более чётко выявить цитотоксичность гриба *Coccidioides* spp., но и более отчётливо, особенно при разведении исследуемых образцов, регистрировать различия между штаммами (рис. 1). Так, если медианные значения цитотоксичности метаболитов различных штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза по отношению к клеткам линии Wehi 3 в разведениях образцов от 1/2 до 1/16 составляли 78,1%-35,82%, то для клеток HEp-2 эти показатели находились на уровне 59,56%-26,95%.

Литература

1. Bongomin F, Gago S, Oladele R.O. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi* (Basel). 2017; 3(4): 57. doi:10.3390/jof3040057.
2. Webb B.J., Ferraro J.P., Rea S. et al. Epidemiology and Clinical Features of Invasive Fungal Infection in a US Health Care Network. *Open Forum Infect Dis*. 2018; 5(8): ofy187. doi:10.1093/ofid/ofy187.
3. Hung C.Y., Xue J., Cole G.T. Virulence mechanisms of *coccidioides*. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1111: 225-235. doi:10.1196/annals.1406.020.

В ходе отработки условий выполнения МТТ-теста для изучения цитотоксичности возбудителей кокцидиоидомикоза оказалось, что на 3 сут показатели цитотоксичности между штаммами не всегда имели чёткие различия, в то время как с 5 сут в контрольных лунках начинало происходить спонтанное отмирание интактных клеток. При этом именно на 4 сут учёт результатов цитотоксичных свойств микромицетов мог быть осуществлён с наибольшей эффективностью (табл. 2).

Практически двукратные отличия концентрации белка в фильтратах сред культивирования микромицетов (от 5,3 до 10,9 мкг/мл), с нашей точки зрения, могут свидетельствовать о разном уровне экспрессии штаммами *Coccidioides* spp. их метаболитов. При этом при концентрации белка в фильтратах *C. immitis* 333 и *C. immitis* C5 8,2 мкг/мл и 8,6 мкг/мл СС50 этих штаммов составляла 1,7 и 0,52 мкг/мл соответственно, что однозначно показывает отсутствие зависимости между интенсивностью накопления метаболитов у микроскопических грибов рода *Coccidioides* и проявлением их цитотоксических характеристик.

Заключение

Таким образом, проведённое исследование продемонстрировало присутствие цитотоксических свойств у всех изученных музейных штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза, несмотря на длительное хранение в условиях *in vitro*. Оказалось, что концентрация белковых метаболитов в среде культивирования микроскопических грибов не является отражением их цитотоксических характеристик. При этом МТТ-тест, выполняемый на клеточных моделях, позволяет не только регистрировать цитотоксические свойства микромицетов *Coccidioides* spp., но представляет возможность выявлять их межштаммовые различия, что открывает широкие перспективы для дальнейшего изучения биологии возбудителей такой особо опасной инфекции, как кокцидиоидомикоз.

4. Hogan L.H., Klein B.S., Levitz S.M. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev*. 1996; 9(4): 469-488. doi:10.1128/CMR.9.4.469-488.1996.
5. Li W., Zhou J., Xu Y. Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices. *Biomed Rep*. 2015; 3(5): 617-620. doi:10.3892/br.2015.481.
6. Soltan-Dallal M.M., Validi M., Douraghi M. et al. Evaluation the cytotoxic effect of cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca* isolates on the HEp-2 cell line by MTT assay. *Microb Pathog*. 2017; 113: 416-420. doi:10.1016/j.micpath.2017.11.003.

7. Adan A., Kiraz Y., Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016; 17(14): 1213-1221. doi:10.2174/1389201017666160808160513.
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
9. Grela E., Kozłowska J., Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochem.* 2018; 120(4): 303-311. doi: 10.1016/j.acthis.2018.03.007.
10. Rekha S., Anila E.I. In vitro cytotoxicity studies of surface modified CaS nanoparticles on L929 cell lines using MTT assay. *Materials Letters,* 2019; 236: 637-639. doi: 10.1016/j.matlet.2018.11.009.
11. Синегубова Е.О., Дубровина И.А., Мясников В.А. Комплексный подход к оценке цитотоксичности рибосом-инактивирующих белков на клеточной модели in vitro. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2019; №1: 163-171.
12. Di Nunzio M., Valli V., Tomás-Cobos L. et al. Is cytotoxicity a determinant of the different in vitro and in vivo effects of bioactives?. *BMC complementary and alternative medicine,* 2017, 17(1): 453. doi: 10.1186/s12906-017-1962-2.
13. Capilla J., Clemons K.V., Stevens D.A. Animal models: an important tool in mycology. *Med Mycol.* 2007; 45(8): 657-684. doi:10.1080/13693780701644140.
14. Kirkland T.N., Fierer J. *Coccidioides immitis* and *posadasii*; A review of their biology, genomics, pathogenesis, and host immunity. *Virulence.* 2018; 9(1): 1426-1435. doi: 10.1080/21505594.2018.1509667.

Сведения об авторах

Терешко Дмитрий Леонидович – научный сотрудник лаборатории иммунодиагностических препаратов. Тел. +7(937)082-93-11. E-mail: dltereshko@gmail.com.
Новицкая Ирина Вячеславовна – ведущий научный сотрудник лаборатории иммунодиагностических препаратов. Тел. +7(961)082-72-11. E-mail: irvnov@mail.ru.

Поступила 15.07.2022 г.