

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

ГРИНЗОВСЬКА АНАСТАСІЯ АНАТОЛІЇВНА

УДК:578.835.1:616.34-008.87-008.6

ДИСЕРТАЦІЯ
НАБУТТЯ ЛІКАРСЬКОЇ СТІЙКОСТІ ПАТОГЕННИХ ГРИБІВ ПІД
ВПЛИВОМ ФУНГІЦИДНИХ ПЕСТИЦИДІВ

Галузь знань І «Охорона здоров'я та соціальне забезпечення»
Спеціальність І2 «Медицина»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Гринзовська А.А.
(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Наукові керівники:

Бобир Віталій Васильович, доктор медичних наук, професор

Ana Alastruey Izquierdo, доктор філософії з мікробіології, магістр з біоінформатики та обчислювальної біології

Київ-2025

Firmado por ****7212* ANASTASIIA
HRYNZOVSKA el día 16/04/2025 con un
certificado emitido por AC
CAMERFIRMA FOR NATURAL PERSONS -
2016

АНОТАЦІЯ

Гринзовська А.А. Набуття лікарської стійкості патогенних грибів під впливом фунгіцидних пестицидів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань І «Охорона здоров'я та соціальне забезпечення» за спеціальністю І2 – Медицина. – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України. Київ.

Дисертація присвячена вирішенню актуальної наукової задачі – з'ясуванню можливості набуття лікарської стійкості патогенних грибів внаслідок використання фунгіцидних пестицидів в агропромисловості.

Аналіз наукової літератури свідчить, що широке застосування хімічних пестицидів і добрив у сільському господарстві має негативні екологічні наслідки, зокрема, впливає на здоров'я людей, та сприяє зростанню захворюваності. Особливу загрозу становить використання фунгіцидів, хімічно подібних до протигрибкових препаратів для лікування людей, у боротьбі з фітопатогенними грибами. Серед таких мікроорганізмів слід виділити *Aspergillus fumigatus*, який не є фітопатогеном, але є частиною ґрунтової мікрофлори, співіснує з іншими грибами, які піддаються обробці пестицидами. Використання сільськогосподарських фунгіцидів призводить до того, що мікроскопічні гриби, включаючи *A. fumigatus*, потрапляючи під селективний тиск, можуть стати джерелом поширення резистентних штамів. Постійне використання таких фунгіцидів зменшує кількість чутливих штамів, що дозволяє резистентним формам поширюватися і ставати домінуючими. Це викликає занепокоєння, оскільки поширення стійких штамів грибів є серйозною загрозою для здоров'я людей.

Мета – встановлення зв'язку між використанням сільськогосподарських фунгіцидів та розвитком резистентності до медичних антимікотиків у клінічних штамів грибів, на основі мікробіологічного обґрунтування особливостей формування перехресної резистентності до препаратів похідних імідазолів та триазолів.

Дослідження проводили на базі Інституту гігієни та екології та в науково-дослідній бактеріологічній лабораторії кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Навчально-наукового інституту профілактичної медицини та громадського здоров'я Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (Київ, Україна). Дослідження проводилося не лише на території України, а і у рамках співпраці з провідною лабораторією Іспанії («Мікологічна референс-лабораторія, Національний центр мікробіології, Інститут Здоров'я Карлоса III, Махадаонда, Мадрид, Іспанія» (Mycology Reference laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain), з якою було забезпечено обмін методиками, сучасними підходами до аналізу та інтерпретації отриманих результатів, що суттєво підвищило якість та достовірність проведеного експерименту.

Під час визначення біологічної активності фунгіцидів немедичного призначення були використані клінічні штами *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, виділені від хворих на кандидоз, які отримували лікування в медичних установах м. Києва та м. Вінниці (Україна), з використанням референс штамів *Candida albicans* DSM 1386 (<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-1386>) музею культур університету Лейпцигу, *Candida krusei* RN 7106, *Candida glabrata* Y199, які зберігаються в музеї культур мікроорганізмів кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця (м. Київ, Україна). В роботі також використані клінічні штами *A. fumigatus* від лікарні Universitario 12 de Octubre (Мадрид, Іспанія) та штами *A. fumigatus* із навколишнього середовища (Мадрид, Іспанія) за однаковий період (з лютого 2022 року по лютий 2024 року), відбувався відбір зразків та ідентифікація ізолятів з подальшою екстракцією ДНК *A. fumigatus*, генотипування та характеристика молекулярних механізмів стійкості до азолів.

Усі клінічні штами *A. fumigatus* та деякі від навколишнього середовища були генотиповані відповідно до методу типування TRESPERG. Було проаналізовано послідовності гена *cup51A* стійких до азолів ізолятів *A. fumigatus*. Молекулярні механізми резистентності до азолів вивчені шляхом ампліфікації та

секвенування повної послідовності гена *sur51A*, включаючи його промотор для штамів, які були стійкі принаймні до одного азолу. Ген *sur51A*, включаючи його промотор, ампліфікували та секвенували.

Скринінг чутливості до протигрибкових препаратів проводився відповідно до еталонного методу EUCAST 10.2 Європейського комітету з тестування чутливості до протигрибкових засобів (EUCAST) з такими концентраціями: 4 мг/л ітраконазолу, 2 мг/л вориконазолу та 0,5 мг/л позаконазолу. Планшети інкубували при 35 °C протягом 48 годин, і штами вважалися нечутливими, коли спостерігався ріст.

Нечутливі штами були підтверджені за допомогою еталонного методу мікророзведення EUCAST 9.4. Тестування протигрибкової чутливості проводили з наступними протигрибковими препаратами в заданих діапазонах концентрацій: ітраконазол (0,015–8 мг/л), вориконазол (0,015–8 мг/л), позаконазол (0,015–8 мг/л) та ізавуконазол (0,015 до 8 мг/л). *Aspergillus flavus* ATCC 204304 та *A. fumigatus* ATCC 204305 використовувалися як штами контролю якості в усіх проведених тестах. Планшети інкубували при 35 °C і через 48 годин оцінювали мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) для ітраконазолу, вориконазолу, позаконазолу та ізавуконазолу. Для визначення резистентності використовували клінічні контрольні точки EUCAST.

В результаті дослідження протягом з лютого 2022 до лютого 2024 року було проаналізовано 401 клінічний ізолят та 1400 ізолятів навколишнього середовища. *A. fumigatus* було виділено у 378 та 446 відповідно. Для клінічних штамів метод EUCAST 10.2 підтвердив, що нечутливими штамами є 18 зразків, метод мікророзведення EUCAST 9.4 з'ясували, що 3,40% (n=13) ізолятів *A. fumigatus* були стійкими до азолів. Із загальної кількості резистентних клінічних ізолятів *A. fumigatus* 100% (n=13) зразків виявилися стійкими до ітраконазолу, 30,76% (n=4) - до вориконазолу, 100% - до позаконазолу (n=13), 30,76% (n=4) зразків, стійких до ізавуконазолу, мали мутацію, пов'язану з азолом, TR34/L98H, що відповідає тим, які показали резистентність до всіх чотирьох азолів, а дев'ять не виявили мутацій у *sur51A* і були стійкі лише до ітраконазолу і позаконазолу.

Вивчивши 446 зразків навколишнього середовища методом мікророзведення EUCAST 9.4, з'ясували, що 10,98% (n=49) зразків виявилися резистентними. Серед стійких зразків отриманих з навколишнього середовища 100% (n=49) були стійкі до ітраконазолу, 91,84% (n=45) - до вориконазолу та 97,95% (n=48) – до позаконазолу, а резистентністю до ізавуконазолу характеризувались усі в зразки (100%, n=49).

При дослідженні гену *суп51А* в резистентних зразках було виявлено 12 зразків WT, тоді як 37 зразків, які є пан-резистентними, мали мутацію у гені *суп51А* TR34/L98H.

Відповідно, наявність резистентних штамів не перевищує 11%, проте, дані штами характеризувалися максимальними показниками резистентності згідно встановленої шкали оцінювання, що є характерним для пан-резистентності та потребує подальшого вивчення через нетипову картину проявів резистентності.

Використовуючи метод типування TRESPERG чутливих штамів, було виявлено повторення певних типів та враховано їхню кількість, також було відмічено наявність однакових типів TRESPERG між чутливими та резистентними штамами. Крім того, зафіксовані мутації *суп51А* TR34/L98H, які більш характерні для штамів з навколишнього середовища, а не клінічних зразків.

Проводили і порівняння результатів двох незалежних дослідів в аспекті наявності однакових мутацій в *суп51А* TR34/L98H та в наявності однакових генотипів відповідно до TRESPERG для чутливих та резистентних штамів. Оцінюючи отримані результати в комплексі, визначили певні закономірності. При виявленні початково резистентних штамів *суп51А* генотипу WT із зовнішнього середовища, через певний час чутливі клінічні штами з відповідними типами контролюються TRESPERG. При виявленні первинно резистентних штамів із клінічних ізолятів генотипу *суп51А* WT, через певний час чутливі штами із зовнішнього середовища, які мають відповідний тип, контролюють TRESPERG. Відповідно, ознак перехресної резистентності немає.

Однак, після виявлення в навколишньому середовищі зразків, які містять мутацію в *суп51А* TR34/L98H, пізніше спостерігаються пацієнти зі стійкими

штамами *A. fumigatus*, які містять подібну мутацію в *sup51A* TR34/L98H і подібні типи TRESPERG. Відповідно, ці результати спостережень відображають наявність ознак перехресної резистентності.

Також здійснювали ідентифікацію виділених грибів роду *Candida* на підставі морфологічних, культуральних ознак та забарвлення колоній на середовищі CHROMagar *Candida* в науково-дослідній бактеріологічній лабораторії кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Навчально-наукового інституту профілактичної медицини та громадського здоров'я та на базі Інституту гігієни та екології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (Київ, Україна). В дослідженні були використані 10 клінічних штамів *C. albicans* та 10 клінічних штамів кандид non-*albicans* (по 5 клінічних штамів видів *C. krusei* та *C. glabrata*).

Визначення протигрибкової активності фунгіцидів немедичного призначення проводили методом серійних розведень за загальноприйнятою методикою. Фунгіциди (дифенконазол, тебуконазол, флуатріяфол, імазаліл, прохлораз) розчиняли в диметилсульфоксид (ДМСО) до концентрації 80 мг/мл, а пропіконазол — до 102 мг/мл. Виконували двократні розведення в бульйоні Сабуро до кінцевих концентрацій 9,7 мкг/мл та 12,5 мкг/мл для пропіконазолу. Інокулят кандид готували з добових культур, розводили до мутності 0,5 Од МакФарланда і 10^6 клітин/мл. Досліди проводили у трьох серіях для кожного штаму *Candida spp.* через утворення суспензій, мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) не визначали; для оцінки чутливості вираховували середні значення мінімальної фунгіцидної концентрації (МФЦК) для *C. albicans*, *C. krusei* та *C. glabrata*.

З метою визначення можливості формування резистентності та вивчення динаміки утворення резистентних до фунгіцидів кандид, нами було проведено пасажування клінічних штамів видів *C. albicans* (2 штами), *C. glabrata*, *C. krusei*. Пасажування проводили у поживних середовищах із зростаючою концентрацією фунгіциду, після інкубації в термостаті впродовж 24 та 48 год, вміст кожної пробірки висівали на щільне поживне середовище для врахування МФЦК,

інкубували в термостаті та враховували результати через 24 та 48 годин. Кількість пасажів коливалась від 10 до 16 в залежності від виду *Candida spp.*

З метою визначення можливості формування перехресної стійкості до протигрибкових препаратів медичного призначення, у кандид, що були адаптовані до високих концентрацій сільськогосподарських фунгіцидів, було проведено визначення чутливості вихідних та пасажованих штамів кандид до найбільш поширених у медичній практиці антимікотиків похідних імідазолу, триазолу та полієнів диско-дифузійним методом. Чутливість визначали згідно стандартної методики CLSI з використанням стандартних дисків з міконазолом (50 мг), клотримазолом (10мг), флуконазолом (25 мг), воріконазолом (1 мг), ністатином (100 Од). На поверхню агару Сабуро вносили 0,5 мл добової культури *Candida spp.* в концентрації 10^6 КУО/мл, рівномірно розподіляли та підсушували в термостаті. На поверхню засіяного «газоном» середовища поміщали диски з антимікотиками, надалі інкубували в термостаті при температурі 35°C. Результати враховували через 24 та 48 год за діаметром зони затримки росту. В залежності від розмірів зони відсутності росту визначали штам як чутливий, стійкий або помірно-чутливий (дозо-залежний).

Отримані дані свідчать, що чутливість кандид, виділених з організму людини, до фунгіцидів сільськогосподарського призначення класів триазолу та імідазолу мала видові та штамові особливості. Таким чином, у резистентних до немедичних фунгіцидів штамів кандид були встановлені реакції на дію протигрибкових препаратів, які застосовують для лікування кандидозів людини, які включали як формування перехресної резистентності, так і підвищення чутливості в порівнянні з відповідними даними щодо чутливості вихідного штаму.

Для попередження інтенсивного розповсюдження мультирезистентних ізолятів надзвичайно важливим є розуміння деталей формування механізмів резистентності цих мікроорганізмів. Крім того, знання молекулярних основ набуття фенотипової резистентності може сприяти розробці нових ефективних протигрибкових препаратів, що в кінцевому підсумку сприятиме покращенню

прогнозу лікування хворих на грибкові інфекції, особливо на фоні імунодефіциту.

Ключові слова: пестициди, фунгіциди, лікарська стійкість, мультирезистентність, культури мікроорганізмів, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, генотип, мутація в гені *cyp51A*, мутація TR34/L98H, грибкові інфекції, громадське здоров'я, One Health.

ABSTRACT

Hrynzovska A.A. Acquisition of drug resistance of pathogenic fungi under the influence of fungicidal pesticides. – Qualification scientific work in the form of a manuscript.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge I "Health care and social security" in the specialty I2 "Medicine". Bogomolets National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Kyiv.

The dissertation is dedicated to solving a pressing scientific problem - to clarify the possibility of pathogenic fungi acquiring resistance as a result of the use of fungicidal pesticides in the agricultural industry.

Analysis of scientific literature shows that the widespread use of chemical pesticides and fertilizers in agriculture has negative environmental consequences, in particular, affects human health, and contributes to the growth of morbidity. A particular threat is the use of fungicides, chemically similar to antifungal drugs for the treatment of humans, in the fight against phytopathogenic fungi. Among such microorganisms, *A. fumigatus* should be highlighted, which is not a phytopathogen, but is a part of the soil microflora, coexisting with other fungi that are amenable to pesticide treatment. The use of agricultural fungicides leads to the fact that microscopic fungi, including *A. fumigatus*, falling under selective pressure, can become a source of the spread of resistant strains. The constant use of such fungicides reduces the number of sensitive strains, which allows resistant forms to spread and become dominant. This is a concern because the spread of resistant strains of fungi is a serious threat to human health.

The aim is to establish a connection between the use of agricultural fungicides and the development of resistance to medical antifungals in clinical strains of fungi, based on microbiological substantiation of the features of the formation of cross-resistance to drugs derived from imidazoles and triazoles.

The research was conducted at the Institute of Hygiene and Ecology and in the research bacteriological laboratory of the Department of Microbiology and Parasitology with Fundamentals of Immunology of the Educational and Scientific Institute of Preventive Medicine and Public Health of the Bogomolets National Medical University (Kyiv, Ukraine). The research was conducted not only in Ukraine, but also in cooperation with a leading laboratory in Spain “Mycological Reference Laboratory, National Center for Microbiology, Carlos III Health Institute, Majadahonda, Madrid, Spain” (Mycology Reference laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain), with which the exchange of methods, modern approaches to the analysis and interpretation of the results obtained was ensured, which significantly increased the quality and reliability of the experiment.

When determining the biological activity of non-medical fungicides, clinical strains of *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* were used, isolated from patients with candidiasis who received treatment in medical institutions in Kyiv and Vinnytsia (Ukraine), using reference strains *C. albicans* DSM 1386 (<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-1386>) from the culture museum of the University of Leipzig, *C. krusei* RN 7106, *C. glabrata* YI99, which are stored in the culture museum of microorganisms of the Department of Microbiology and Parasitology with Fundamentals of Immunology of the Bogomolets National Medical University (Kyiv, Ukraine). The work also used clinical strains of *A. fumigatus* from the Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain) and environmental strains of *A. fumigatus* (Madrid, Spain) for the same period (from February 2022 to February 2024), sampling and identification of isolates were carried out with subsequent extraction of *A. fumigatus* DNA, genotyping and characterization of molecular mechanisms of resistance to azoles.

All clinical and some environmental *A. fumigatus* strains were genotyped according to the TRESPERG typing method. The *cyp51A* gene sequences of azole-resistant *A. fumigatus* isolates were analyzed. The molecular mechanisms of azole resistance were studied by amplifying and sequencing the complete *cyp51A* gene sequence, including its promoter, for strains that were resistant to at least one azole. The *cyp51A* gene, including its promoter, was amplified and sequenced.

Antifungal susceptibility screening was performed according to the European Committee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST) reference method 10.2 with the following concentrations: 4 mg/L itraconazole, 2 mg/L voriconazole and 0.5 mg/L posaconazole. The plates were incubated at 35°C for 48 hours and strains were considered non-susceptible when growth was observed.

Nonsusceptible strains were confirmed using the EUCAST 9.4 microdilution reference method. Antifungal susceptibility testing was performed with the following antifungal drugs at specified concentration ranges: itraconazole (0.015–8 mg/L), voriconazole (0.015–8 mg/L), posaconazole (0.015–8 mg/L), and isavuconazole (0.015 to 8 mg/L). *Aspergillus flavus* ATCC 204304 and *A. fumigatus* ATCC 204305 were used as quality control strains in all tests performed. The plates were incubated at 35°C and after 48 hours the minimum inhibitory concentrations (MICs) for itraconazole, voriconazole, posaconazole and isavuconazole were assessed. EUCAST clinical breakpoints were used to determine resistance.

As a result of the study, 401 clinical isolates and 1400 environmental isolates were analyzed from February 2022 to February 2024. *A. fumigatus* was isolated from 378 and 446, respectively. For clinical strains, the EUCAST 10.2 method confirmed that 18 samples were non-susceptible strains, and the EUCAST 9.4 microdilution method revealed that 3.40% (n=13) of *A. fumigatus* isolates were resistant to azoles. Of the total number of resistant clinical isolates of *A. fumigatus*, 100% (n=13) of the samples were resistant to itraconazole, 30.76% (n=4) to voriconazole, 100% to posaconazole (n=13), 30.76% (n=4) of the samples resistant to isavuconazole had the azole-associated mutation TR34/L98H, corresponding to those that showed resistance to all four azoles, and nine did not show mutations in *cyp51A* and were resistant only to itraconazole and posaconazole.

After studying 446 environmental samples using the EUCAST 9.4 microdilution method, it was found that 10.98% (n=49) of the samples were resistant. Among the resistant samples obtained from the environment, 100% (n=49) were resistant to itraconazole, 91.84% (n=45) to voriconazole and 97.95% (n=48) to posaconazole, and all samples (100%, n=49) were resistant to isavuconazole.

When examining the *cyp51A* gene in resistant samples, 12 WT samples were found, while 37 samples that are pan-resistant had a mutation in the *cyp51A* gene. TR34/L98H.

Accordingly, the presence of resistant strains does not exceed 11%, however, these strains were characterized by maximum resistance indicators according to the established assessment scale, which is characteristic of pan-resistance and requires further study due to the atypical pattern of resistance manifestations.

Using the TRESPERG typing method of susceptible strains, the repetition of certain types was detected and their number was taken into account, the presence of the same TRESPERG types between susceptible and resistant strains was also noted. In addition, the *cyp51A* TR34/L98H mutations were recorded, which are more characteristic of environmental strains than clinical samples.

The results of two independent experiments were also compared in terms of the presence of identical mutations in *cyp51A* TR34/L98H and the presence of identical genotypes according to TRESPERG for sensitive and resistant strains. Evaluating the results obtained in the complex, certain patterns can be traced. When initially resistant strains of *cyp51A* genotype WT are detected from the external environment, after a certain time, sensitive clinical strains with the corresponding types are controlled by TRESPERG. When initially resistant strains are detected from clinical isolates of the genotype *cyp51A* WT, after a certain time, sensitive strains from the external environment that have the corresponding type are controlled by TRESPERG. Accordingly, there are no signs of cross-resistance.

However, after environmental samples containing the *cyp51A* TR34/L98H mutation were identified, patients with resistant *A. fumigatus* strains containing a similar *cyp51A* TR34/L98H mutation and similar TRESPERG types were subsequently observed. Accordingly, these observations reflect evidence of cross-resistance.

Also carried out the identification of the isolated fungi of the genus *Candida* based on morphological, cultural features and colony staining on CHROMagar *Candida* medium in the research bacteriological laboratory of the Department of Microbiology and Parasitology with Fundamentals of Immunology of the Educational and Scientific Institute of Preventive Medicine and Public Health and on the basis of the Institute of Hygiene and Ecology of the Bogomolets National Medical University (Kyiv, Ukraine). The study used 10 clinical strains of *C. albicans* and 10 clinical strains of *Candida* non-*albicans* (5 clinical strains of *C. krusei* and *C. glabrata* each).

The antifungal activity of non-medical fungicides was determined by method of serial dilutions according to the generally accepted methodology. Fungicides (difenoconazole, tebuconazole, flutriafol, imazalil, prochloraz) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to a concentration of 80 mg/ml, and propiconazole to 102 mg/ml. Two-fold dilutions were performed in Sabouraud broth to final concentrations of 9.7 µg/ml and 12.5 µg/ml for propiconazole. *Candida* inoculum was prepared from overnight cultures, diluted to a turbidity of 0.5 McFarland Units and 10⁶ cells/ml. Experiments were performed in triplicate for each *Candida spp* strain. Due to the formation of suspensions, the minimum inhibitory concentration (MIC) was not determined; To assess sensitivity, the average values of the minimum fungicidal concentration (MFC) were calculated for *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. glabrata*.

In order to determine the possibility of resistance formation and study the dynamics of the formation of *Candida* resistant to fungicides, we conducted passage of clinical strains of the species *C. albicans* (2 strains), *C. glabrata*, *C. krusei*. Passage was carried out in nutrient media with increasing concentrations of fungicide, after incubation in a thermostat for 24 and 48 hours, the contents of each tube were sown on a dense nutrient medium to take into account MPC, incubated in a thermostat and the results were taken into account after 24 and 48 hours. The number of passages ranged from 10 to 16 depending on the species of *Candida spp*.

In order to determine the possibility of cross-resistance to medical antifungal drugs in *Candida*, which were adapted to high concentrations of agricultural fungicides, the sensitivity of the original and passaged *Candida* strains to the most common in medical practice antifungals derivatives of imidazole, triazole and polyenes

was determined by the disk diffusion method. Sensitivity was determined according to the standard CLSI method using standard disks with miconazole (50 mg), clotrimazole (10 mg), fluconazole (25 mg), voriconazole (1 mg), nystatin (100 U). 0.5 ml of a daily culture of *Candida spp.* at a concentration of 10^6 CFU/ml was added to the surface of Sabouraud agar, evenly distributed and dried in a thermostat. Disks with antifungal drugs were placed on the surface of the medium sown with "lawn", and then incubated in a thermostat at a temperature of 35°C. The results were taken into account after 24 and 48 hours by the diameter of the zone of growth inhibition. Depending on the size of the zone of no growth, the strain was determined as sensitive, resistant or moderately sensitive (dose-dependent).

The obtained data indicate that the sensitivity of *Candida* isolated from the human body to agricultural fungicides of the triazole and imidazole classes had species and strain characteristics. Thus, in *Candida* strains resistant to non-medical fungicides, reactions to the action of antifungal drugs used to treat human candidiasis were established, which included both the formation of cross-resistance and an increase in sensitivity compared with the corresponding data on the sensitivity of the original strain.

To prevent the rapid spread of multidrug-resistant isolates, it is extremely important to understand the details of the formation of resistance mechanisms in these microorganisms. In addition, knowledge of the molecular basis of the acquisition of phenotypic resistance may contribute to the development of new effective antifungal drugs, which will ultimately improve the prognosis of patients with fungal infections, especially in immunocompromised patients.

Keywords: pesticides, fungicides, drug resistance, multidrug resistance, cultures of microorganisms, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, genotype, Cyp51A mutations; TR34/L98H mutation, fungal infections, public health, One Health.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

(* – особистий внесок здобувача)

1. Hrynzovska A.A., Bobir V.V., Shirobokov V.P., Vovk I.M., Poniatovsky V.A., Nazarchuk O.A. (2025) ANTIFUNGAL THERAPY AND PESTICIDES: IS THERE A CONNECTION? Clinical and Preventive Medicine, №2(2025). Available from: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.2.2025.17>
2. Hrynzovska A., & Bobyr, V. (2024). NEW STRATEGIES IN COMBATING FUNGAL PATHOGENS. Medical Science of Ukraine (MSU), 20(2), 115-125. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.2.2024.14>
3. Hrynzovska A, Bobyr V. Formation of resistance of *Candida* fungi to fungicidal drugs. USMYJ [Internet]. 2024Jun.27 [cited 2024Jul.4];146(2):60-7. Available from: <https://mmj.nmuofficial.com/index.php/journal/article/view/398>
4. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2024) STUDY OF THE SENSITIVITY OF *CANDIDA* ADAPTED TO FUNGICIDES TO MEDICAL ANTIFUNGAL DRUGS «Bulletin of problems biology and medicine», 2024 Issue 2, 173, 348-357 pages, index UDC 615.282.015.8:579.61. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2024-2-173-348-357>
5. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2023) Формування механізмів перехресної резистентності *A. fumigatus* за рахунок хімічної подібності азольних антимікотиків та фунгіцидів. Україна. Здоров'я нації, № 3, 27-33. <https://doi.org/10.32782/2077-6594/2023.3/04>
6. Гринзовська А.А., Бобир В.В., Вовк І.М., Назарчук О.А. (2023) Структурно-морфологічні зміни грибів роду *Candida* в процесі штучного формування у них резистентності до азолів. Перспективи та інновації науки, №14(32), 941-955. [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14\(32\)-941-955](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14(32)-941-955)
7. Гринзовська, А., & Бобир, В. (2023). Сучасні погляди на проблему антимікотикорезистентності штамів грибів родів *Fusarium* та

Aspergillus в розрізі концепції One Health. Український науково-медичний молодіжний журнал, 141(3), 103-111.
[https://doi.org/10.32345/USMYJ.3\(141\).2023.103-111](https://doi.org/10.32345/USMYJ.3(141).2023.103-111)

8. Еволюція Antifungal Stewardship: Витоки, розвиток та сучасні виклики/ Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 19 березня 2025 р.

9. Two and a half year monitoring of fungi in ambient air: Is airborne *A. fumigatus* a health hazard?/ Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and Virulence in Human Fungal Pathogens, La Colle sur Loup, France (збірка матеріалів науково-практичної закордонної конференції з міжнародною участю), 18-24 травня 2024 р. 168 ст.

10. Профілактичні заходи та методи боротьби із збудником *A. fumigatus* у різних сферах діяльності людини/ Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 13 березня 2024 р. 92-94 ст.

11. Сучасні підходи до вивчення типів модифікацій у генотипі та їхній вплив на поширення резистентних штамів *A. fumigatus* в пацієнтів та у навколишньому середовищі (2023). науково-практична конференція з міжнародною участю до 100-річчя кафедри гігієни, безпеки праці та професійного здоров'я НМУ імені О.О. Богомольця та всесвітнього дня безпеки пацієнтів 2023 року «Актуальні проблеми безпеки і гігієни лікарень, персоналу. Український науково-медичний молодіжний журнал, 140(3), 97. <https://doi.org/10.32345/USMYJ.SUPPLEMENT.3.2023.1-114>

12. Технологія DectiSomes: новий напрямок у лікуванні грибкових інфекцій / III Науково-практична міжнародна дистанційна конференція «МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ В СУЧАСНІЙ МЕДИЦИНІ» 24 березня 2023 року

13. Механізми резистентності до азолів та глобальне поширення стійких штамів *Aspergillus fumigatus*/ Екологічні та гігієнічні проблеми

сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 15 березня 2023 р. 84-85 ст.

14. Використання фунгіцидів у рослинництві як можливий шлях розвитку резистентності збудників мікозів людини / Міжнародна науково-практична конференція "Біологічні, медичні та науково-педагогічні аспекти здоров'я людини" 17-18.11.2022 р. м. Полтава

15. Використання імідазолів в особистій гігієні як один із можливих чинників виникнення резистентності мікозів людини до лікарських препаратів групи імідазолів / Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 16 березня 2022 р.

16. Стандартна операційна процедура з визначення ризиків в секторі санітарно-мікробіологічного та санітарно-вірусологічного дослідження / Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 17 березня 2021 р.

17. Передумови виникнення надзвичайних ситуацій медико-біологічного характеру в Україні / Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю) 11 березня 2020 р.

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

Coubani AO, editor. Pulmonary Aspergillosis: A Comprehensive Guide to the Disease Spectrum and Advances in Diagnosis and Management. 1st ed. Cham: Springer; 2024. XVIII, 356 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-76524-7>

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	14
ЗМІСТ	17
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	20
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ПРОБЛЕМУ ФОРМУВАННЯ ТА ПОШИРЕННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ У ЗБУДНИКІВ ГРИБКОВИХ ІНФЕКЦІЙ (огляд літератури)	30
1.1 Проблема поширення антимікотикорезистентних штамів збудників грибкових інфекцій в Україні і світі	30
1.2 Сучасні погляди на механізми формування резистентності до антимікотиків у мікроскопічних грибів	34
1.3 Нові стратегії у боротьбі зі збудниками грибкових інфекцій	40
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	53
2.1. Характеристика матеріалів і методів, пов'язаних із дослідженням клінічних ізолятів <i>Candida spp.</i>	53
2.1.1. Характеристика дослідних клінічних ізолятів <i>Candida spp.</i>	53
2.1.2 Методики мікробіологічного дослідження	54
2.1.3 Характеристика фунгіцидів, використаних у дослідженні	56
2.1.4. Фізико-хімічна характеристика фармацевтичних препаратів, використаних у дослідженні	62
2.1.5. Методика світлової мікроскопії та електронної просвічуючої мікроскопії	69
2.2. Характеристика матеріалів і методів, пов'язаних із дослідженням клінічних штамів та ізолятів з навколишнього середовища <i>A. fumigatus</i>	70
2.2.1. Відбір зразків та ідентифікація ізолятів <i>A. fumigatus</i>	70
2.2.2. Визначення чутливості клінічних ізолятів <i>A. fumigatus</i> до протигрибкових препаратів	73

2.2.3. Генотипування та характеристика молекулярних механізмів стійкості клінічних ізолятів <i>A. fumigatus</i> до азолів	74
2.3 Методи статистичної обробки матеріалів дослідження	76
РОЗДІЛ 3. ПОРІВНЯЛЬНА ХАРЕКТЕРИСТИКА РЕЗИСТЕНТНОСТІ ЗБУДНИКІВ ГРИБКОВИХ ІНФЕКЦІЙ, ВИДІЛЕНИХ ВІД ХВОРИХ ТА З НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА	78
3.1. Чутливість клінічних ізолятів <i>A. fumigatus</i> до протигрибкових препаратів та характеристика їх молекулярних механізмів резистентності	78
3.2. Чутливість ізолятів з навикишнього середовища <i>A. fumigatus</i> до протигрибкових препаратів та характеристика їх молекулярних механізмів резистентності	82
3.3. Порівняльний генетичний аналіз чутливих і резистентних штамів <i>A. fumigatus</i> , виділених від хворих та з навикишнього середовища	84
РОЗДІЛ 4. ХАРАКТЕРИСТИКА ЧУТЛИВОСТІ ТА ДИНАМІКИ ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ГРИБІВ РОДУ <i>CANDIDA</i> ДО ПРОТИГРИБКОВИХ ПРЕПАРАТІВ НЕМЕДИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ	94
4.1 Чутливість клінічних штамів <i>Candida spp.</i> до фунгіцидів немединого призначення	94
4.2. Формування резистентності у клінічних штамів кандид до фунгіцидів немединого призначення в умовах експерименту	98
4.3. Структурно-морфологічні зміни грибів роду <i>Candida</i> в процесі штучного формування у них резистентності до азолів	102
РОЗДІЛ 5. ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО ПРОТИГРИБКОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ У ГРИБІВ РОДУ <i>CANDIDA</i> ПІСЛЯ ЇХ АДАПТАЦІЇ ДО ФУНГІЦИДНИХ ПРЕПАРАТІВ	109
5.1. Хімічна спорідненість антимікотиків і фунгіцидів	109

5.2. Чутливість клінічних штамів кандид та адаптованих до фунгіцидів штамів до антимікотиків медичного призначення	112
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	122
ВИСНОВКИ	133
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	136
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	137
Додаток №1	153

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

A. fumigatus – *Aspergillus fumigatus*

A. flavus – *Aspergillus flavus*

C. albicans – *Candida albicans*

C. glabrata – *Candida glabrata*

C. krusei – *Candida krusei*

CPA – Хронічний легеневий аспергільоз

IPA – Інвазивний легеневий аспергільоз

ISV — Ізавуконазол

ITR — Ітраконазол

ITS – Internal Transcribed Spacer

POS — Позаконазол

VOR — Воріконазол

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – Дезоксирибонуклеїнова кислота

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

МФЦК – мінімальна фунгіцидна концентрація

Р – резистентні до антибіотиків гриби

Ч – чутливі до антибіотиків гриби

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Резистентність до протигрибкових препаратів стає глобальним викликом для усього людства. Про актуальність обраної тематики свідчить той факт, що у 2022 році ВООЗ було вперше в історії оприлюднено список грибкових патогенів, які мають найбільший вплив на здоров'я людини. До цього списку входять 19 видів грибів, серед яких найбільш небезпечними збудниками визнані *Cryptococcus neoformans*, *Candida auris*, *A. fumigatus* та *C. albicans*. У Європі, дослідження за участі 20 країн показало, що *C. albicans* становить 56% від усіх випадків кандидемії, тоді як рівень смертності від цих інфекцій сягає 43% протягом 90 днів після зараження [1].

У 2025 році європейські агентства: ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control; EFSA – European Food Safety Authority; ECHA – European Chemicals Agency; EEA – European Environment Agency; EMA – European Medicines Agency; JRC – Joint Research Centre, об'єднали зусилля для боротьби з резистентністю грибів роду *Aspergillus* до азольних фунгіцидів. Ця ініціатива реалізується в межах підходу "Єдине здоров'я" (One Health), що визнає взаємозв'язок між здоров'ям людей, тварин та навколишнього середовища. Захист здоров'я населення та стримування резистентності *A. fumigatus* вимагає поєднання регуляторних заходів, досліджень та співпраці між державними установами, науковими спільнотами та аграрним сектором. ЄС активно працює над цим викликом, щоб запобігти кризі антимікотичної терапії та знизити поширення резистентних штамів [2].

Зростання резистентності до протигрибкових засобів, в тому числі і до азольних препаратів, спостерігається не лише серед клінічних ізолятів, а й у штамів, виділених із навколишнього середовища. Основною з причиною формування резистентності у грибів є їх здатність до виживання під дією антимікотиків і використання аграрних фунгіцидів із хімічною структурою, подібною до медичних препаратів. У сільському господарстві широке використання азольних фунгіцидів може сприяти формуванню стійких штамів грибів. Один із механізмів формування стійкості штамів, які мають подібні

властивості, полягає у виникненні мутацій, які забезпечують адаптацію до змін навколишнього середовища або впливу антимікотиків. Зокрема, мутації в гені *cup51A* у *A. fumigatus*, такі як TR34/L98H та TR46/Y121F/T289A, що раніше були характерні для ізолятів із навколишнього середовища, дедалі частіше виявляються серед клінічних штамів [3].

Не виключено, що використання сільськогосподарських фунгіцидів із хімічною структурою, подібною до протигрибкових препаратів, які використовуються у медичній практиці, може призводити до формування перехресної резистентності. Через тривале застосування азольних фунгіцидів, стійкі штами грибів, такі як *A. fumigatus*, *C. albicans* та *C. glabrata*, поступово витісняють чутливі штами, стаючи домінантними. Результати останніх досліджень вказують на те, що понад дві третини пацієнтів з інвазивним аспергільозом не отримували азольну терапію раніше, проте у виділених від них збудників встановлено присутність ключових мутацій, що може свідчити про роль у поширенні резистентності мікроорганізмів, виділених із навколишнього середовища [4]. Це створює серйозні труднощі у питанні терапії грибкових інфекцій, оскільки ефективність медичних препаратів знижується.

Проблема передачі резистентності від мікроорганізмів навколишнього середовища до клінічних штамів включає кілька важливих аспектів. По-перше, це горизонтальне перенесення генів резистентності, що дозволяє «екологічним» штамам передавати стійкість до протигрибкових препаратів патогенним мікроорганізмам. По-друге, інфікування пацієнтів такими стійкими штамами ускладнює лікування, адже стандартна терапія виявляється неефективною.

У зв'язку з важливістю проблеми, яку створює передача резистентності від екологічних мікроорганізмів до клінічних штамів та її серйозним впливом на сучасну медицину, постає нагальна потреба у розробці ефективних підходів до моніторингу, профілактики та лікування резистентних інфекцій. Саме ця важлива науково-практична задача визначила вибір мети нашого дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Темі дисертації затверджено на Вченій раді медичного факультету № 4 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (Київ, Україна) від «17» листопада 2022 року.

Дисертаційна робота виконана в рамках госпдоговірних тем:

№0122U200344, зареєстрованої в ТОВ «Сингента» (договір №710 від 26.05.2022 р.), наукові дослідження за якою здійснювалися на базі Інституту гігієни та екології. Тема: «Токсиколого-гігієнічна експертиза досьє препарату Спірале 475 ЕС, КЕ (діючі речовини: дифеноконазол, 100 г/л, та фенпропідин, 375 г/л)».

№0122U200343, зареєстрованої в ТОВ «Сингента» (договір №711 від 26.05.2022 р.), наукові дослідження за якою здійснювалися на базі Інституту гігієни та екології. Тема: «Гігієнічна оцінка умов праці при застосуванні препарату Спірале 475 ЕС, КЕ (д.р. дифеноконазол, 100 г/л + фенпропідин, 375 г/л) на цукрових буряках, обґрунтування терміну безпечного виходу на оброблені площі, розробка інструкції з безпечного застосування препарату.».

№0122U002347, зареєстрованої в ТОВ «Сингента» (договір №675 від 29.03.2022 р.), наукові дослідження за якою здійснювалися на базі Інституту гігієни та екології. Тема: «Гігієнічна оцінка умов праці при застосуванні (0,3 – 0,5 л/га x 2) препарату Скор 250 ЕС, КЕ (д.р. дифеноконазол, 250 г/л) на волоських горіхах, обґрунтування терміну безпечного виходу на оброблені площі, розробка інструкції з безпечного застосування препарату.».

Мета дослідження – встановити зв'язок між використанням сільськогосподарських фунгіцидів та розвитком резистентності до медичних антимікотиків у клінічних штамів, зокрема, формування перехресної резистентності до препаратів похідних імідазолів та триазолів.

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Провести порівняльний аналіз поширення резистентності до *A. fumigatus* у клінічних штамів та ізолятів навколишнього середовища на території м. Мадрид (Іспанія).

2. Вивчити механізми формування резистентності *A. fumigatus* у клінічних штамів та ізолятів із навколишнього середовища шляхом аналізу

мутацій, які зумовлюють стійкість до азольних препаратів (ген *sur51A*) та з'ясувати їх походження.

3. На прикладі клінічних штамів роду *Candida* провести оцінку чутливості грибів до фунгіцидів, які використовуються в аграрному секторі.

4. Вивчити можливість адаптації збудників грибкових інфекцій до фунгіцидних пестицидів та з'ясувати залежність цього процесу від видових і штамових особливостей даних мікроорганізмів.

5. З'ясувати чутливість адаптованих до фунгіцидів штамів грибів роду кандида до антимікотиків, які використовуються у медичній практиці та визначити можливість формування перехресної резистентності таких мікроорганізмів до медичних препаратів похідних імідазолів та триазолів.

Об'єкт дослідження: поширеність резистентних штамів *A. fumigatus* у навколишньому середовищі та їх зв'язок із розвитком резистентності клінічних штамів *A. fumigatus*; можливість формування перехресної резистентності до протигрибкових препаратів медичного призначення у кандид, що були адаптовані до високих концентрацій сільськогосподарських фунгіцидів; механізми формування резистентності до азолів та їхня хімічна спорідненість між медичними протигрибковими препаратами і сільськогосподарськими фунгіцидами.

Предмет дослідження: мікроскопічні гриби роду *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*) та *A. fumigatus*, ізольовані з клінічного матеріалу та навколишнього середовища.

Методи дослідження:

мікробіологічні – визначення протигрибкової активності фунгіцидів, пасажування клінічних штамів, визначення чутливості вихідних та пасажованих штамів *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*; визначення чутливості до протигрибкових засобів (ітраконазолу, вориконазолу та позаконазолу) *A. fumigatus* використовуючи скринінговий метод EUCAST 10.2 з подальшим підтвердженням нечутливих штамів до протигрибкових засобів (ітраконазолу, вориконазолу, позаконазолу та ізавуконазолу) за допомогою еталонного методу мікророзведення EUCAST 9.4.

мікроскопічні (світлова мікроскопія та електронна мікроскопія) – ідентифікація та з'ясування структурно-морфологічних змін *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* після формування штучної резистентності до фунгіцидів та антимікотичних препаратів;

молекулярно-генетичні – генотипування відповідно до методу TRESPERG, для диференціації геному штамів *A. fumigatus* за допомогою чотирьох маркерів, які представляють ділянки з повторюваними кодуючими послідовностями; вивчення шляхом ампліфікації та секвенування повної послідовності гену *cyp51A*, включаючи його промотор, для штамів *A. fumigatus*, які були стійкі принаймні до одного азолу, із подальшим аналізом походження цих мутацій.

статистичні.

Дисертаційна робота виконана на базі Mycology Reference laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, (Madrid, Spain), на базі Інституту гігієни та екології та в науково-дослідній бактеріологічній лабораторії кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Навчально-наукового інституту профілактичної медицини та громадського здоров'я Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (Київ, Україна).

Наукова новизна отриманих результатів.

Вперше досліджено можливість формування резистентності у штамів *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* до фунгіцидів (дифеноконазолу, тебуконазолу, флуатріяфолу, імазалілу, прохлоразу) та з'ясовано закономірності розвитку даного процесу стосовно окремих класів фунгіцидів.

Встановлено вплив пестицидів (фунгіцидів), які використовуються у рослинництві, на розвиток резистентності збудників мікозів людини до медичних протигрибкових препаратів похідних імідазолів і триазолів. Крім того, одержано нові дані про профіль і спектр антимікробної активності міконазолу, клотримазолу, флуконазолу, вориконазолу та ністатину.

Вперше проведено типування *A. fumigatus* методом TRESPERG і аналіз послідовностей гена *cyp51A* у клінічних штамів з лікарні Universitario 12 de Octubre (Мадрид, Іспанія) та ізолятів із навколишнього середовища (Мадрид,

Іспанія). Виявлено однакові типи TRESPERG серед чутливих і резистентних штамів, а також мутацію *sur51A TR34/L98H* у резистентних клінічних штамів, яка є типовою для ізолятів із навколишнього середовища.

Практичне значення одержаних результатів.

Встановлено кореляцію між використанням пестицидів (фунгіцидів) у сільському господарстві та розвитком резистентності до медичних протигрибкових препаратів (імідазолів і триазолів), що має значення для медицини й агрономії. Отримані експериментальні дані вказують на необхідність обмеження використання пестицидів для запобігання розвитку резистентних форм патогенів, які в подальшому можуть ускладнювати лікування мікозів у людей.

Одержано нові дані про профіль і спектр антимікробної активності протигрибкових засобів (міконазолу, клотримазолу, флуконазолу, вориконазолу, ністатину), які можуть бути використані для оптимізації протигрибкової терапії. Це дозволить медичним працівникам ефективніше підбирати препарати для лікування грибкових інфекцій на основі їх спектру дії.

Запропоновано новий підхід до аналізу резистентних штамів *A. fumigatus*, який включає генотипування методом TRESPERG та ідентифікацію мутацій у гені *sur51A*. Дане досягнення має важливе значення для моніторингу та профілактики поширення резистентних штамів як у лікарнях, так і в навколишньому середовищі.

Отримані дані щодо закономірностей формування резистентності клінічних штамів видів *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*) до фунгіцидів (дифеноконазолу, тебуконазолу, флуатріяфолу, імазалілу та прохлоразу) дозволяють оцінити потенційні ризики при лікуванні грибкових інфекцій, а також сприятимуть розробці нових стратегій лікування таких інфекцій.

Одержані результати наукових досліджень впроваджено в роботу кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України; відділення антимікробної резистентності та інфекційного контролю державної установи "Київський міський центр контролю та профілактики хвороб Міністерства охорони здоров'я України"; кафедри

мікробіології та паразитології з основами імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України; Інституту гігієни та екології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України; кафедри мікробіології, вірусології та імунології Полтавського державного медичного університету МОЗ України; кафедри гігієни, медичної екології та громадського здоров'я Одеського національного медичного університету МОЗ України (додаток №1).

Особистий внесок здобувача.

Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Напрямок дослідження, тема, мета і завдання були обрані та сформульовані автором самостійно. Здобувач виконала інформаційно-патентний пошук, розроблено адекватні методики дослідження, проведено експериментальні роботи, а також здійснено аналіз і узагальнення отриманих результатів.

Дисертантка самостійно дослідила чутливість мікроорганізмів до фунгіцидів; здійснювала пасажування клінічних штамів, визначення чутливості вихідних та пасажованих штамів *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, визначення чутливості/стійкості *A. fumigatus*; проводила мікроскопічні дослідження (світлова мікроскопія та електронна мікроскопія) з метою з'ясування структурно-морфологічних змін *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* після адаптації до фунгіцидів та антимікотичних препаратів, молекулярно-генетичні дослідження згідно методу типування TRESPERG та послідовності *cyp51A* стійких до азолів клінічних ізолятів *A. fumigatus*.

Частина генетичних і серологічних досліджень, включно з ПЛР-аналізом штамів *A. fumigatus* із навколишнього середовища, проводились за участю співробітників лабораторії Mycology Reference laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain. Дослідження, пов'язані з моделюванням резистентності та вивченням динаміки утворення резистентних клінічних штамів *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, виконувались у науково-дослідній бактеріологічній лабораторії кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Навчально-наукового інституту профілактичної медицини та громадського здоров'я та на базі

Інституту гігієни та екології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця за підтримки академіка НАН та НАМН України, професора Широбокова В.П., а також за консультативної допомоги у співпраці з Назарчуком О.А. - д.мед.н., професором кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

Усі опубліковані наукові праці, підготовлені у співавторстві, містять чітко зазначений особистий внесок автора, який детально розкрито в тексті дисертації.

Автор самостійно написала і оформила дисертаційну роботу, разом із науковим керівником сформулювала висновки і практичні рекомендації. Участь інших дослідників у друкованих працях обмежувалася наданням консультативної допомоги та спільним аналізом отриманих результатів.

Апробація результатів дисертації.

Основні наукові положення, висновки та рекомендації доповідали та обговорювали на міжнародних науково-практичних конференціях: науково-практична конференція з міжнародною участю до 100-річчя кафедри гігієни, безпеки праці та професійного здоров'я НМУ імені О.О. Богомольця та всесвітнього дня безпеки пацієнтів 2023 року «Актуальні проблеми безпеки і гігієни лікарень, персоналу» (Київ, 2023); III Науково-практична міжнародна дистанційна конференція «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині» (Харків, 2023); науково-практична конференція з міжнародною участю «Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини» (Київ, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024; 2025); Міжнародна науково-практична конференція «Біологічні, медичні та науково-педагогічні аспекти здоров'я людини» (Полтава, 2023).

Даному питанню були присвячені семінари: презентація на Seminario del Programa de Mentores від ISCIII, з тематикою «Alta prevalencia de *A. fumigatus* resistente a azoles en muestras de aire ambiental» 16 березня 2023 року (Mycology Reference laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain); презентація на Seminario del Programa de Mentores від ISCIII, з темою «Another threat of antifungal resistance: Crossover between the environment and clinical *A. fumigatus*» 22 лютого 2024 року (Mycology Reference

laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain); постерна доповідь на тему «Antifungal Resistance in *A. fumigatus*: Environmental Conditions & Clinical Implications» Molecular Mechanisms of Host-pathogen Interactions and Virulence in Human Fungal Pathogens 18-24 травня 2024, La Colle sur Loup, France; постерна доповідь онлайн На тему «Antifungal Resistance in *A. fumigatus*: Environmental Conditions & Clinical Implications» під час Microbiology Week Virtual Event Series 2024, 03-05 вересня 2024 року; постерна доповідь онлайн на тему «Prevalence of Azole Resistance Among *A. fumigatus* Isolates in Clinical and Environmental Samples» під час Clinical Diagnostics & Research Virtual Event Series 2024, 13 листопада 2024 року; постерна доповідь на тему «Emerging Pathogens in Colonizing Moulds: the Threat of Azole-Resistant *A. fumigatus*» під час Winter Immunology Symposium in Health, Alicante, Spain, 19-20 грудня 2024; постерна доповідь онлайн на тему «Antifungal Therapy and Pesticides: Is There a Connection?» під час Antimicrobial Chemotherapy Conference (ACC) 4 лютого 2025 року; постерна доповідь на тему «Prevalencia de la resistencia a azoles entre los aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus*» під час XVI Congreso Nacional de Micología 20-22 березня 2025 року, Сарагоса, Іспанія; постерна доповідь на тему «Prevalencia de la resistencia a azoles entre los aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus*» під час SOMOS ISCIII 2025 2 та 9 квітня 2025 року, Мадрид, Іспанія.

Публікації за темою дисертації.

Основні результати дисертаційної роботи відображені у 17 опублікованих наукових працях, зокрема, 6 – у фахових наукових виданнях, які рекомендовані МОН України, 1 в журналах міжнародних наукометричних баз (Web of Science та Scopus); 10 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій

Структура та обсяг роботи.

Дисертація викладена на 158 сторінках друкованого тексту, з них 136 становить основний текст; складається зі вступу, шести розділів, аналізу й узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел. Робота ілюстрована 33 рисунками, 18 табл.ми. Список використаних джерел складається з 154 найменувань латиницею.

РОЗДІЛ І

СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ПРОБЛЕМУ ПОШИРЕННЯ ТА ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ШТАМІВ ЗБУДНИКІВ ГРИБКОВИХ ІНФЕКЦІЙ

(огляд літератури)

У наш час проблема поширення резистентних штамів грибкових інфекцій переросла з медичної у важливу соціально-економічну. В усьому світі з року в рік спостерігається зростання кількості стійких штамів збудників грибкових інфекцій до основних антимікотичних препаратів, які використовуються в медичній практиці. І хоча за останні кілька років було досягнуто значного прогресу в галузі вивчення протигрибкових засобів, на сьогодні залишаються не повністю дослідженими механізми формування резистентності грибів та фактори, які впливають на даний процес.

1.1 Проблеми поширення антимікотикорезистентних штамів збудників грибкових інфекцій в Україні і світі.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я респіраторні інфекції, спричинені грибами, бактеріями та вірусами посідають четверте місце серед причин смертності у світі[5].

Проте, не зважаючи на те, що грибкові респіраторні інфекції щорічно спричиняють стільки ж смертей, скільки грип чи туберкульоз, вони залишаються поза увагою [6].

Проблема мікозів залишається надзвичайно актуальною впродовж тривалого часу. У світі щорічно реєструється приблизно 750 000 випадків кандидозу, 500 000 випадків пневмоцистної пневмонії, 220 000 випадків криптококозу та 900 000 випадків мукормікозу [7].

Відомо більше 300 видів грибів, які викликають інфекції у людей, але поміж них *Aspergillus* спричиняють 70% смертей, пов'язаних із грибами [8], хоча з понад 200 видів *Aspergillus*, які були ідентифіковані, лише деякі вважаються патогенними для людини [9].

Якщо повернутися у минуле, то ще у 1939 році мікробіолог Артур Тротвайна Хенрици повідомляв: «У людини інфекції, викликані грибами роду *Aspergillus*, настільки рідкісні, що мають невелике клінічне значення». Однак, у наш час питання діагностики та лікування людей із захворюваннями, спричиненими *Aspergillus* постає дуже гостро. Даний збудник може викликати захворювання від легких до життєво небезпечних, таких як: хронічний легеневий аспергільоз (СПА), інвазивний легеневий аспергільоз (ІРА), дисемінований аспергільоз, аспергільоз центральної нервової системи та ендокарду. Інвазивний аспергільоз – одне із ускладнень хронічної обструктивної хвороби легень (ХОЗЛ). Із 58 млн госпіталізованих у 2020 році осіб з ХОЗЛ, у 1,3-3,9 % ця хвороба ускладнювалась інвазивним аспергільозом. У цифровому еквіваленті щорічна захворюваність тримається на тривожно високому рівні: від 750 000 до 2,2 млн випадків на рік [10].

За останнє десятиліття відбулося суттєве переосмислення аспергільозу. Зростає усвідомлення ключової ролі імунного статусу пацієнта та супутніх інфекцій у перебігу хвороби. Клінічні прояви інфекції, спричиненої *Aspergillus*, варіюють від незначної сенсibiliзації до тяжких, потенційно летальних станів, а рівні поширеності та смертності суттєво різняться серед груп ризику [8]. Через неспецифічну симптоматику, обмежену чутливість традиційних мікробіологічних методів та відсутність глобально доступних некультивацийних діагностичних підходів, аспергільоз часто виявляється із запізненням [11, 12, 13]. Сучасне лікування легеневих форм захворювання ґрунтується переважно на використанні азолів, зокрема вориконазолу та ітраконазолу [14].

З кінця 2000-х років у Європі все частіше повідомляють про стійкість *A. fumigatus* до тріазолів. Резистентність до азолів, особливо до ітраконазолу, вориконазолу та позаконазолу досягає рівня від 3% до 30% у різних регіонах світу, включаючи Європу та Азію [15]. Зростання кількості стійких *Aspergillus* також може бути пов'язане зі змінами в популяції пацієнтів, зокрема, у збільшенні кількості осіб зі зниженим імунітетом, таких як хворі на ВІЛ/СНІД, отримувачі трансплантатів, хворі на рак або приймаючі імунодепресанти. Ці групи пацієнтів мають підвищений ризик розвитку грибкових інфекцій,

включаючи інфекції *Aspergillus* і можуть бути більш вразливі до стійких штамів грибів. Ця нова проблема громадського здоров'я виникає двома різними шляхами: набуття резистентності *in vivo* як наслідок тривалого лікування медичними азолами або *de novo* - попадання стійкого штаму безпосередньо з навколишнього середовища, пов'язане з широким використанням азолових фунгіцидів у сільському господарстві. Азольні фунгіциди вбивають більшість *A. fumigatus* у навколишньому середовищі, але стійкі *A. fumigatus* можуть виживати та розмножуватися. Цей другий шлях придбання резистентності був спочатку описаний у Нідерландах, а потім про нього було повідомлено в кількох країнах Європи, Азії та Африки [16, 17], що може пояснити нещодавню появу стійких *A. fumigatus* у пацієнтів, які раніше не отримували азолів. В одному дослідженні дві третини пацієнтів із резистентним до азолів *A. fumigatus* раніше не отримували терапію азолами [18].

Останні роки засвідчили глобальне зростання поширеності азолорезистентних штамів грибів. Зокрема, в Нідерландах рівень резистентності *A. fumigatus* збільшився з 0,79% у 1996–2001 роках до 7,04% у 2012–2016 роках [19].

Серед найбільш поширених грибкових патогенів людини вирізняються представники роду *Candida*, зокрема *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Candida parapsilosis*, а також нові збудники, як-от *Candida haemulonii* та *Candida auris*. Ці мікроорганізми спричиняють широкий спектр інфекцій, які у пацієнтів з імуносупресією нерідко є тяжким інвазивним кандидозом [20].

Кандидозні нозокоміальні інфекції стають дедалі більш розповсюдженими, становлячи понад 85% усіх інвазивних грибкових уражень як у Європі, так і в США [21]. Вони асоціюються з високими рівнями летальності як у країнах з високим рівнем доходу, так і в тих, що розвиваються. Зафіксовані показники 30-денної смертності від усіх причин коливаються від 29% до 72% [22]. Так, у 2016 році Діо та співавт. зафіксували загальну смертність при кандидемії на рівні 72,2% у Бразилії, тоді як Bongomin та колеги повідомили про понад 40% летальних випадків у Великій Британії [8].

C. albicans залишається найпоширенішим збудником кандидозних інфекцій слизових оболонок, шкіри і нігтів та інвазивного кандидозу включаючи кандидемію. Глобальною проблемою є те, що антимікотикорезистентність продовжує зростати, особливо до флуконазолу. Середній рівень резистентності до азолів у світі варіюється, досягаючи 5-10% для флуконазолу, особливо у пацієнтів з повторними інфекціями [24]. Рівень смертності серед пацієнтів з інвазивним кандидозом може сягати до 40-60%, особливо у випадках з відкладеним початком терапії або при інфекціях, викликаних мультирезистентними штамми. У США рівень смертності у пацієнтів з кандидемією становить близько 25%, але він може коливатися залежно від супутніх захворювань та якості медичної допомоги [25]

C. glabrata є важливим патогеном, який викликає захворювання у людини, найчастіше маніфестуючи інвазивними кандидозами, зокрема, кандидемією, інфекціями сечовивідних шляхів, абсцесами внутрішніх органів та менінгітом. Зустрічається переважно у пацієнтів з імунодефіцитом або тих, хто проходить інтенсивну антибіотикотерапію. Частота інфекцій *C. glabrata* варіюється, становлячи 10-30% усіх випадків інвазивного кандидозу [26]. *C. glabrata* має вищий рівень резистентності до флуконазолу порівняно з іншими *Candida spp.*, який досягає близько 10-15% у різних регіонах світу. Ця резистентність зумовлена специфічними мутаціями, що змінюють клітинні мішені для антимікотиків [15, 27].

C. krusei — грибовий збудник, що викликає інвазивний кандидоз, зокрема кандидемію, інфекції сечовивідних шляхів, ендокардит, менінгіт, інфекції шкіри та слизових оболонок [28]. Має природну резистентність до флуконазолу, що робить цей патоген особливо проблематичним у пацієнтів з імуносупресією. Резистентність *C. krusei* до інших азолів також варіює залежно від географічного розташування та експозиції до антимікотиків [29] Хоча *C. krusei* залишається менш поширеним порівняно з іншими видами *Candida* і становить близько 1-5% усіх випадків кандидозу, його природна резистентність ускладнює лікування та підвищує ризик летальних наслідків, який може досягати 30-50%, особливо у тяжкохворих пацієнтів [24].

1.2 Сучасні погляди на механізми формування резистентності до антимікотиків у мікроскопічних грибів.

Деякі представники роду *Candida* здатні до складних морфологічних трансформацій, що тісно пов'язано з їх вірулентністю [30, 31]. Відомо три основні морфотипи *Candida spp.*: дріжджовий, гіфальний та псевдогіфальний. Останні два часто називають станами ниткоподібного росту [32, 33]. Дріжджі представлені яйцеподібними окремими клітинами, які розмножуються шляхом осьового або біполярного брунькування [34, 35]. Гіфи мають витягнуту форму з постійною шириною та паралельними стінками, внутрішні перегородки яких мають пори, що забезпечують міжклітинний зв'язок. Вони мають тенденцію до поляризованого росту [36]. Псевдогіфи, подібно до гіф, демонструють подовження та поляризований ріст, однак відрізняються еліпсоїдною формою клітин і звуженими перегородками. Їх гілкування та швидше ділення також відрізняє їх фенотипово від гіф [37].

Найдетальніше дослідженням видом є *C. albicans*, яка легко може переходити між трьома морфотипами залежно від умов середовища. Вважається, що дріжджова форма сприяє колонізації, формуванню біоплівки та швидкому потраплянню до кровообігу [38], тоді як гіфальний ріст забезпечує інвазію тканин, підвищує біоплівкоутворення та сприяє уникненню фагоцитозу макрофагами [36]. Гіфи *C. albicans* можуть механічно проникати крізь епітелій, прискорюючи розповсюдження в тканинах і навіть вихід із макрофагів [39]. До того ж, гіфи секретують кандидалізін — пептидний токсин, що пошкоджує мембрани епітеліальних клітин господаря та активує внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, відіграючи ключову роль у патогенності [40].

C. krusei не здатні утворювати справжні гіфи, але можуть переходити між дріжджовими та псевдогіфальними станами [41, 42]. Наприклад, *C. glabrata* зазвичай є дріжджами, здатними бути високовірулентними [43].

Біоплівки являють собою організовані мікробні структури, утворені одним або кількома видами мікроорганізмів, занурених у позаклітинний матрикс (ЕСМ). Як і інші мікробні біоплівки, структури, утворені *Candida*, демонструють підвищену резистентність до імунного захисту організму та антимікробних

препаратів, зокрема азолів, що робить їх важливим фактором стійкості патогенів [44]. Біоплівки *Candida* складаються з кількох шарів клітин, занурених у позаклітинний матеріал, чий склад варіюється залежно від виду. Цей матрикс включає полісахариди, зокрема β -1,3-глюкан, β -1,6-глюкан, маннани та білки. Клітини *C. albicans* у складі біоплівки мають потовщені клітинні стінки, які містять удвічі більше вуглеводів і β -1,3-глюкану порівняно з вільноплаваючими клітинами [45]. Завдяки здатності до формування щільного захисного матриксу та стійкого прикріплення до тканин господаря, біоплівки істотно посилюють патогенність *Candida* [34].

Взаємодія між грибовим морфогенезом і впливом протигрибкових агентів раніше вивчалася серед видів *Candida* під час лікування протигрибковими препаратами. Сьогодні відомо, що азоли — одні з найпоширеніших протигрибкових засобів, також мають прямий вплив на морфологію *C. albicans* і запобігають утворенню гіф [46]. Азоли чинять виражений гальмівний вплив на гіфальний ріст *Candida*. При субінгібіторних концентраціях спостерігається обмеження розгалуження гіф, тоді як клінічно значущі дози повністю блокують морфогенетичний перехід дріжджових форм у гіфальні [46]. Було показано, що клітини *C. albicans*, оброблені азолами, виробляли більш високі рівні фарнезолу — молекули, чутливої до кворуму, яка виробляється грибами та здатна блокувати ниткоподібний ріст у *C. Albicans* [47]. Це відбувається тому, що азоли націлені на ферменти, які беруть участь у біосинтезі стеролів, а обробка азолами призводить до накопичення проміжного продукту біосинтезу стеролів — фарнезилпірофосфату, який опосередковано стимулює надмірне виробництво фарнезолу [48]. В анаеробних умовах *C. albicans* не синтезує фарнезол і демонструє підвищену стійкість до протигрибкових засобів, зокрема азолів і амфотерицину В, імовірно через зниження активності стеролового шляху, що вказує на тісний зв'язок між кворум-визначенням і резистентністю [49]. Це підкреслює важливу роль азолів не лише як антимікотиків, а й як інгібіторів морфогенезу — ключового чинника вірулентності *Candida*, що частково пояснює їхню клінічну ефективність. Окрім протигрибкових препаратів, які здатні модулювати клітинний морфогенез у *C. albicans* (Рис. 1.1.), існує також

взаємозв'язок між морфогенезом і стійкістю до протигрибкових препаратів. Було помічено, що існує кореляція між стійкістю до протигрибкових засобів і здатністю до ниткоподібного росту, гіфальна форма може бути менш чутливою до певних класів антигрибкових засобів, таких як азоли [50].

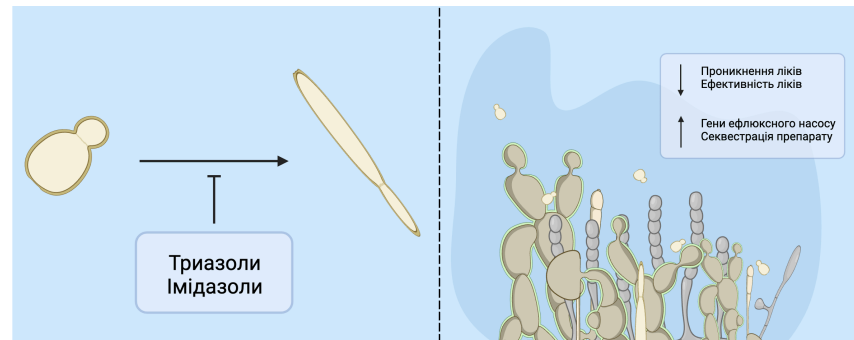


Рис. 1.1. Зв'язок морфогенезу з лікуванням протигрибковими препаратами та стійкістю *Candida* до ліків.

Примітка: побудовано автором за допомогою ресурсу <https://app.biorender.com/>

Гриби роду *Candida* мають ключові вірулентні властивості, що забезпечують їхню високу адаптивність як патогенів людини. До основних механізмів належать клітинний морфогенез, здатність до адгезії, фенотипне перемикавання, формування біоплівки, протигрибкова резистентність і секреція гідролітичних ферментів — усі вони суттєво посилюють патогенність [51, 52].

Для азолів, при культивуванні клінічних ізолятів *C. albicans* із змінними рівнями резистентності до азольних протигрибкових препаратів в умовах, що індукують філаменти, і в присутності азольного препарату стійкі до ліків ізоляти могли утворювати гіфи ефективніше, ніж чутливі ізоляти [53].

Зміни в регуляції генної експресії, які контролюють перехід між формами росту, можуть впливати на проникність клітинної мембрани або на активність транспортних систем, що відповідають за виведення протигрибкових препаратів. Наприклад, експресія генів, що кодують протеїни, які беруть участь у формуванні гіфів, може змінювати чутливість до препаратів класу азолів та каспофунгінів [54].

Механізми стійкості до азолів у виду *A. fumigatus*. Щодня людина вдихає приблизно 500–5000 грибових спор [55]. Конідії вирізняються високою

стійкістю до зовнішніх стресових факторів — температури, рН, осмотичного тиску та інших факторів [56]. У здорових осіб ці «сплячі» конідії зазвичай нейтралізуються завдяки мукоциліарному кліренсу та фагоцитозу, не встигнувши ініціювати інфекцію [57]. Якщо ж імунний захист порушено, конідії проходять стадії ізотропного, а згодом поляризованого росту, перетворюючись на інвазивні гіфи, здатні проникати в тканини та викликати захворювання [58].

Попри тісний зв'язок росту з розвитком інвазивної інфекції, механізми перетворення спочиваючих конідій у гіфи досі остаточно не з'ясовані [59]. Поточні уявлення ґрунтуються на транскриптомних даних, що демонструють здатність конідій змінювати експресію генів у відповідь на середовищні стимули. За даними Lamarque та ін. [60], понад 25% геному *A. fumigatus* транскрибуються вже у стані спокою, причому ці транскрипти регулюються відповідно до потреб — від адаптації до стресу й протигрибкової стійкості до вірулентності та синтезу вторинних метаболітів [61].

Протигрибкові препарати класу триазолів використовуються як препарати першої лінії при аспергільозі легень завдяки високій ефективності та переносимості. Триазолові протигрибкові препарати інгібують стеролдеметилази *A. fumigatus* Cyp51A та Cyp51B [62], сприяючи порушенню біосинтезу ергостеролу та накопиченню токсичних стеролів, що завершується фунгіцидною активністю [63,64].

Однак, в свою чергу, переважаючим механізмом стійкості до триазолу в *A. fumigatus* є генетична мутація, що призводить до змін амінокислотної послідовності та/або рівнів експресії одного з двох цільових ферментів Cyp51A [65].

Стійкість до азолів є новою проблемою для *A. fumigatus* [66]. Сьогодні з'являється все більше доказів того, що пацієнти з резистентним до азолів аспергільозом не піддаються азоловій терапії [67].

Оскільки пацієнти вдихають спори грибів, стійких до азолів, вони можуть інфікуватися резистентним до азолів аспергільозом, навіть без попереднього лікування цими препаратами [68].

Наразі виявлено два основні шляхи розвитку резистентності: через лікування пацієнтів і через вплив азолових фунгіцидів на *A. fumigatus* у навколишньому середовищі (Рис. 1.2.). Ці шляхи відрізняються, зокрема, факторами ризику для пацієнтів і механізмами стійкості грибів. Резистентність, пов'язана з впливом фунгіцидів у довкіллі, зокрема включає мутації TR 34 /L98H та TR 46 /Y121F/T289A [69]. У клінічних та екологічних ізолятах *A. fumigatus* широко виявляють тандемні повтори (TR) у промоторній ділянці гена *sur51A* у поєднанні з точковими мутаціями в його кодуєчій послідовності, зокрема TR₃₄/L98H та TR₄₆/Y121F/T289A. Такі мутації призводять до підвищеної експресії *sur51A*, що збільшує кількість триазолу, необхідного для ефективного пригнічення ферменту [18]. Окрім того, амінокислотні заміни в ключових позиціях, як-от G54 та M220, а також мутації, асоційовані з TR, викликають конформаційні зміни білка, що знижує афінність зв'язування триазолів із цільовим ферментом [70].

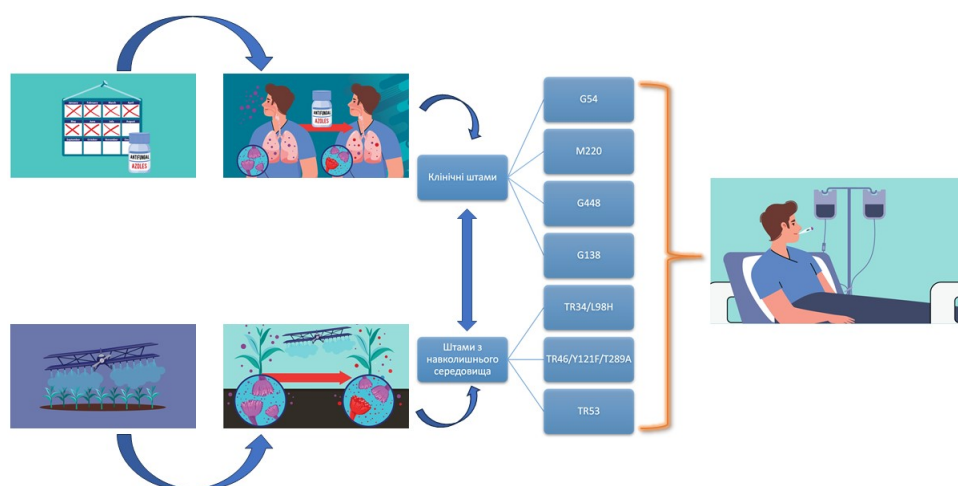


Рис. 1.2. Типи мутацій у *sur51A* в залежності від походження штаму
Примітка: побудовано автором в програмі PowerPoint.

Однак, публікуються дослідження максимально декілька річної давності, де у клінічних зразках *A. fumigatus* виявлено мутацію TR₃₄ /L98H [71, 72].

У той час як мутації, пов'язані з *sur51A* є найпоширенішим і найкраще охарактеризованим механізмом резистентності до триазолу, все частіше повідомляють про нестійкі до триазолу клінічні ізоляти, без мутацій в *sur51A* з частотою поширеності від 15 до 60% залежно від географічного регіону [73, 74]. Однак, у *sur51A* незалежна лікарська стійкість до триазолу залишається погано

вивченою та недостатньо дослідженою. Однією з потенційних причин резистентності до триазолу є надмірна експресія АТФ-зв'язувальної касети (ABC) і транспортерів кількох лікарських засобів (MFS), яка часто спостерігається серед резистентних до триазолу *A. fumigatus*. Вважається, що надмірна експресія цих транспортерів спричиняє зниження внутрішньоклітинної концентрації препарату, таким чином зменшуючи кількість препарату, доступного для інгібування стеролдеметираз [75].

Мутації в *hmg1*, гені, що кодує фермент HMG-CoA редуктазу — ключовий ензим біосинтезу ергостеролу — нещодавно ідентифіковані як новий фактор стійкості до триазолів у *A. fumigatus* [76]. *Hmg1* каталізує перетворення HMG-CoA на мевалонат і містить консервативний стерин-чутливий домен (SSD), який, ймовірно, регулює активність ферменту [76]. Попри відсутність систематичної оцінки клінічної поширеності мутацій *hmg1*, наразі описано понад 150 ізолятів, які мають такі мутації, більшість із них — триазолорезистентні, але без змін у *sur51A* [77]. Найчастіші заміни амінокислот локалізуються в межах SSD — це залишки S269, S305, G307, I412, а також мутації F262del, S305P, I412S, S269F та E306K, які, за даними трансформаційних досліджень, знижують чутливість до кількох триазолів у чутливому штамі [78]. Хоча точний механізм ще не з'ясовано, вважається, що ці мутації порушують здатність SSD розпізнавати стерини та запускати деградацію *hmg1*, що потенційно сприяє резистентності [73, 79].

Ще одним нещодавно виявленим механізмом резистентності до триазолів є мутації в гені *hapE*, який кодує одну з трьох субодиниць транскрипційного комплексу ССААТ-зв'язувального комплексу (CBC). Цей фактор транскрипції відомий своєю здатністю пригнічувати експресію ряду генів, задіяних у біосинтезі ергостеролу, зокрема *sur51A*. Порушення функції *hapE* призводить до зняття цього пригнічення, що може сприяти підвищенню рівнів експресії *sur51A* та розвитку резистентності до триазолів [80].

Дослідження, проведені в Нідерландах, показують, що з клінічних ізолятів, стійких до азолів, від 83% до 95% містять мутації, пов'язані з зовнішнім шляхом,

тоді як приблизно 15% демонструють азолостійкий фенотип без відомих мутацій резистентності [81].

Отже, на сьогодні основними механізмами формування резистентності грибів до протигрибкових препаратів є наступні: мутації у генах, що кодують мішені протигрибкових препаратів; активне виведення (ефлюкс) препарату з клітини; зміна проникності клітинної мембрани; епігенетичні зміни; біохімічна адаптація; формування біоплівки; гетерогенність клітинної популяції. Разом з тим, багато моментів у даному питанні є поки що не з'ясованими і потребують подальших ґрунтовних досліджень. Безумовно, знання механізмів формування такого явища як резистентність є запорукою їх успішного подолання.

1.3. Нові стратегії у боротьбі зі збудниками грибкових інфекцій

Останні наукові дослідження механізмів формування резистентності грибів до протигрибкових препаратів активно зосереджуються на розумінні складних біохімічних та генетичних змін, які сприяють патогенним грибам уникати дії ліків. Ці дослідження є критично важливими, оскільки грибкові інфекції дедалі важче піддаються лікуванню через зростаючу кількість штамів, стійких до терапії. Нижче наведено основні механізми резистентності, які перебувають у фокусі сучасної науки.

Вплив на клітинну стінку грибів

Клітинна стінка грибів є важливою мішенню для розробки протигрибкових препаратів. Склад клітинної стінки грибка різниться між видами, але основним компонентом є полісахарид β -(1,3)-глюкан, ковалентно зшитий з хітином, утворюючи первинну структуру каркасу [82].

Манопротейни можуть бути перспективними для розробки нових протигрибкових засобів, хоча дослідження в цій області поки що менш успішні порівняно з розробкою ліків, спрямованих на синтез β -1,3-глюкану [83]. Деякі протигрибкові препарати, які присутні на ринку, вже спрямовані на інгібування різних аспектів синтезу клітинної стінки. Наприклад, Nikkomycin Z пригнічує утворення структури хітину, процесу, необхідного для грибів, але не для ссавців. Описані інгібітори β (1,3)-D-глюкансинтаз належать до циклічних ліпопептидів, гліколіпідів і кислих терпеноїдів [84].

Інгібування $\beta(1,3)$ -D-глюкансинтази є встановленим механізмом дії ехінокандинів, однак пошук нових інгібіторів триває. *Ibrexafungerp* (раніше SCY-078 або MK-3118) — перший у своєму класі тритерпеноїдний протигрибковий засіб, що блокує синтез $\beta(1,3)$ -D-глюкану в клітинній стінці грибів. Його мішень відрізняється від мішені ехінокандинів, що зумовлює мінімальну перехресну резистентність між штамми, стійкими до ехінокандинів і *ibrexafungerp* [85].

Одне із досліджень продемонструвало, що 3-заміщені похідні аміно-4-гідроксикумарину можуть знижувати рівень хітину. Протигрибкові агенти, які можуть пригнічувати синтез якоря GPI, це - APX001A (молекула на основі піридину 2-аміну), феноксиацетанлід (гепінацин), OGT2468 (похідні родамін-3-оцтової кислоти) і M720. У низьких концентраціях вони ефективні проти видів *Fusarium*, *Aspergillus*, *Candida* та *Scedosporium*. APX001A ефективний проти стійких до каспофунгіну *C. albicans* і *C. auris* [86].

Модуляція біосинтезу ергостеролу

Фармакологічні засоби, що порушують біосинтез ергостеролу, охоплюють кілька класів: азоли, які інгібують ланостерол-14 α -деметилазу; полієни, що зв'язуються з ергостеролом у мембрані та порушують її цілісність; а також аліламіни, які блокують активність скваленсинтази (*Erg1p*) [87].

Підвищена експресія *ERG11*, гена мішені для азолів, асоціюється зі зниженням чутливості до цих препаратів. Вона може бути спричинена мутаціями підсилення функції у транскрипційному регуляторі *Upc2* або збільшенням кількості копій хромосоми 5, де розташований *ERG11*. Крім того, мутації в *ERG11* часто виявляють у клінічних ізолятах, резистентних до азолів [88]. Апігенін, рутин і пальмітинова кислота знижували експресію *ERG11* [89].

Мітохондрії, як потенційні мішені для нових протигрибкових препаратів, були ідентифіковані відносно нещодавно. Вони є критично важливими для росту та виживання більшості патогенних грибів, що робить їх перспективним напрямом у розробці нових терапевтичних стратегій [90]. Обробка *C. albicans* розмариновою кислотою значно знизила активність мітохондрій *C. albicans*. За допомогою аналізу МТТ було показано, що при застосуванні розмаринової

кислоти (0,1 мг/мл), мітохондріальна активність знизилася більш ніж на 50% [91]. Інший природний продукт – берберин, накопичується в мітохондріях грибів і перешкоджає їх діяльності через погіршення потенціалу мітохондріальної мембрани та мітохондріального комплексу. Ця сполука також може захоплювати надмірну експресію Mdr1p, хоча і знижує протигрибкову стійкість у *C. albicans*. Крім того, застосування берберину було ефективним також *in vivo*, оскільки воно може подовжити час виживання мишей із розповсюдженням через кров мультирезистентного кандидозу Mdr1p із гіперекспресією [87].

Екстракт насіння папаї (*Carica papaya*) проявляє інгібуючі властивості щодо *C. albicans* реалізується через різні механізми, зокрема накопичення активних форм кисню (ROS) та порушення потенціалу мітохондріальної мембрани, що в підсумку призводить до загибелі клітини [92].

Хілосціфенол А — природна низькомолекулярна сполука з китайських печіночників — виявляє виражений протигрибковий ефект з мінімальною інгібіторною концентрацією 8–32 мкг/мл і фунгіцидною активністю як у планктонних клітин, так і в біоплівках *C. albicans*. Ефективність підтверджено *in vivo* на моделі *Caenorhabditis elegans*. Механізм дії пов'язаний із гіперполяризацією мітохондріальної мембрани, підвищенням продукції АТФ, накопиченням активних форм кисню (АФК) та порушенням мітохондріальної функції, про що свідчить агрегований розподіл білка Tom70 [93].

Калопанаксапонін А, тритерпеноїдний сапонін із кори стебла *Kalopanax pictus* здійснює свою протигрибкову дію шляхом збільшення генерації АФК. Надлишкові АФК перешкоджають дихальним ланцюгам і згодом викликають дисфункцію мітохондрій. Фунгіцидна активність калопанаксапоніну А також базується на перешкодженні проникності клітинної мембрани [94].

Похідні мефлохіну в субінгібіторних концентраціях здатні пригнічувати ключові вірулентні властивості грибів, такі як філаментация *C. albicans* і утворення або меланізація капсули в *C. neoformans*. Їхній механізм дії є мультицільовим, охоплюючи порушення мітохондріальних і вакуолярних функцій. Ариламідин T-2307 демонструє високу селективність до грибових мітохондрій, інгібуючи комплекси III і IV дихального ланцюга в *S. cerevisiae* та

C. albicans, що призводить до зниження внутрішньоклітинного рівня АТФ. Водночас його дія на мітохондрії людини мінімальна [95]. Пептид *ToAP2D* проявляє активність проти *Sporothrix globosa*, викликаючи апоптоз, морфологічні порушення та розрив клітин. Він також знижує мітохондріальний мембранний потенціал і підвищує рівень активних форм кисню. Його ефективність підтверджена *in vivo* на моделі мишей [96].

Інгібіція клітинного ефлюксу:

Одним із механізмів протигрибкової резистентності штамів *Candida*, стійких до азольних протигрибкових препаратів, є активація АТФ-зв'язуючих генів касетного транспортера CDR1 і CDR2. Нові агенти, які будуть націлені на грибові ефлюксні насоси, можуть стати основою для комбінованої терапії, що посилює азол [97].

Подібним чином астрагалін також був здатний знижувати регуляцію CDR1. Інший флавоноїд, кемпферол, може знижувати регуляцію генів CDR1 і CDR2 у стійких до флуконазолу *C. albicans* [98]. Антимікробна дія гідрохлориду берберину, традиційного для китайської медицини, пов'язана зі зменшенням внутрішньоклітинного відтоку флуконазолу шляхом зниження регуляції CDR1, тоді як поліненасичені жирні кислоти можуть зменшувати відтік із клітин *C. krusei*. Похідні бензоксазолу можуть перешкоджати як ефлюксу клітин, так і синтезу ергостеролу в *C. albicans* [99].

Вплив на різні метаболічні шляхи та ферменти

Перспективним напрямом у розробці нових протигрибкових засобів є націлювання на критичні метаболічні шляхи грибів, зокрема метаболізм N-ацетилглюкозаміну, трегалози, біосинтез ліпідів та інші життєво важливі процеси [100]. Потенційними мішенями також виступають ферменти, необхідні для росту та вірулентності. Серед досліджених агентів – антимікробний пептид *AMP-17*, який інгібує ключові шляхи метаболізму в *C. albicans*, зокрема окисне фосфорилування, деградацію РНК, метаболізм пропаноату й жирних кислот [101]. Крім того, пептиди, отримані з аполіпопротеїну В (АроВ), також демонструють протигрибкову активність [102]. Аналіз дії тіазолідинонів, проведений за допомогою молекулярного докінгу, молекулярної динаміки та

аналізів інгібування ферментів, показав, що вони можуть інгібувати фермент карбоангідразу [103]. Дослідження Venkata et al. та Ansari et al. довели можливість інгібування гліоксилатного циклу *C. albicans* ваніліном і монотерпеноїдом перилового спирту [104].

Боротьба з різними аспектами вірулентності

Утворюючи біоплівки, грибові патогени здатні уникнути знищення імунними клітинами, такими як нейтрофіли та моноцити. Для підвищення стійкості біоплівки гриби використовують низку механізмів — високу щільність клітин, обмеження росту та поживних речовин, існування персистентних клітин, експресію генів протигрибової стійкості та збільшення вмісту стеролів у клітинній мембрані. Стійкість біоплівок також посилюється позаклітинним матриксом завдяки його складній структурі, яка складається з білків, вуглеводів, ліпідів і позаклітинної ДНК [105].

Багато патогенних грибів здатні змінювати морфологію — адаптивну властивість, тісно пов'язану з їх вірулентністю. Морфологічна пластичність є поширеною стратегією виживання в організмах ссавців. Основні патогени демонструють ріст у формі дріжджів, псевдогіфів або гіф. Контроль морфогенезу забезпечується, зокрема, шляхом *cAMP-PKA* і сигнальними каскадами за участю молекулярного шаперону *Hsp90*, які регулюють морфологічні переходи у багатьох грибових патогенах [106]. Для *C. albicans* характерна здатність динамічно перемикатися між трьома морфотипами під час інфекційного процесу. Гіфальна форма є ключовою для утворення біоплівок і вважається критичним чинником вірулентності [107].

Різні продукти, в тому числі з природних джерел, досі вивчалися через їхню антибіоплівкову активність, однак пошуки ефективних антибіоплівкових агентів тривають до сьогодні. Через стійкість біоплівки існує нагальна потреба в розробці протигрибових препаратів, які могли б впоратися зі здатністю грибових патогенів їх утворювати. За даними останніх досліджень, потенційними інгібіторами біоплівки можуть бути різноманітні речовини. Розмаринова кислота, рослинна поліфенольна сполука, може запобігти утворенню біоплівки через помірне зниження вмісту екзополісахариду (EPS) в

матриці біоплівки [87]. Схожим чином, каннабідіол, який є непсихоактивним фітоканабіноїдом з *Cannabis sativa*, та уснінова кислота — вторинний метаболіт лишайників, знижують товщину біоплівки, послаблюючи структурну цілісність грибкових утворень [108].

Екстракт *Artemisia absinthium* продемонстрував антибіоплівкову активність — зменшення виробництва EPS. Механізм антимікробної активності *A. absinthium* полягає в порушенні цілісності мембрани. Подібним чином, екстракт, отриманий з *Ononis spinosa*, мав антибіоплівковий потенціал проти деяких штамів *Candida*. Антимікробний пептид VLL-28, виділений з фактора транскрипції археїв, також значно зменшував здатність грибів утворювати біоплівки, тоді як його протигрибкова активність була заснована на пошкодженні клітинної стінки [109].

Фотодинамічна терапія демонструє ефективність проти біоплівок *C. auris*, особливо в комбінації з фотосенсибілізуючими агентами. Нанокмплес куркуміну й софороліпиду впливає на біоплівку та гіфи *C. albicans* через пригнічення генів вірулентності та резистентності, зокрема *SAP4*, *HWP1*, *HYR1*, *RAS1* і *ERG11*. Катехол у концентраціях 2–256 мкг/мл дозозалежно інгібує формування біоплівки та гіф, пригнічує активність секретованих гідролаз і знижує рівень екстрацелюлярного матриксу. qPCR-профілювання вказує на зниження експресії *RAS1*, *HWP1* і *ALS3*. Антигіфальна активність також встановлена для камфори (0,125 мг/мл) і евкаліптолу (23 мг/мл), які зменшують кількість гіфальних клітин і блокують морфогенетичний перехід. Повне гальмування утворення гіф спостерігали при застосуванні 0,01% камфори [110].

Біатріоспорин D — фенольна сполука з ендоліхенічного гриба *Biatriospora* sp., пригнічує ключові вірулентні властивості *C. albicans*, включаючи адгезію, гіфогенез та біоплівкоутворення. Антигіфальна дія реалізується через модуляцію шляху *Ras1*–*cAMP*–*Efg1*, що блокує формування гіф. Інший природний агент — емодин (1,3,8-тригідрокси-6-метилантрахінон) із *Rheum palmatum* — також знижує гіфальний ріст *C. albicans*. Софороліпіди (гліколіпідні біосурфактанти з *Strmerella bombicola*) та шиконін (пігмент із *Lithospermum erythrorhizon*) демонструють антигіфальний ефект. За даними Naque та ін., софороліпіди

пригнічують експресію гіфасоційованих генів *HWPI*, *ALS1*, *ALS3*, *ECE1* і *SAP4* [111].

Еукаробустол Е проявляє протигрибкову активність проти *C. albicans*, знижуючи експресію генів, відповідальних за біосинтез ергостеролу. Він блокує морфогенетичний перехід дріжджових клітин у гіфи та зменшує гідрофобність клітинної поверхні біоплівки. Пептиди NCR, багаті на цистеїн, зокрема *NCR335* і *NCR169*, також демонструють здатність пригнічувати формування біоплівки й гіф у штамів *Candida* [112].

За даними Folly et al., вперше було досліджено протигрибкову активність етанольного екстракту листя *Xylosma prockia* та його фракцій проти *C. neoformans* і *C. gattii*. Морфометричний аналіз показав, що етилацетатна фракція знижує співвідношення поверхня/об'єм клітин та рівні ергостеролу в мембрані грибів. У свою чергу, Mayer і Kronstad продемонстрували, що *Bacillus safensis* значно пригнічує вірулентність *C. neoformans*, зокрема зменшує розміри клітин і повністю блокує формування капсули [113].

Протигрибкові вакцини

Профілактична вакцинація розглядається як перспективний довготривалий підхід для зниження ризику кандидозу у пацієнтів із високою вразливістю до грибкових інфекцій. Однак цей напрям стикається з низкою викликів, серед яких – висока варіативність і морфологічна пластичність грибів, вроджена імунологічна толерантність до коменсальних грибів, а також складність формування ефективної імунної пам'яті в пацієнтів з ослабленим адаптивним імунітетом [114].

У дослідженнях було встановлено, що *C. auris* експресує білки-адгезини з гомологією до *Als3* – ключового адгезину/інвазину *C. albicans*. Вакцинація мишей NDV-3A (на основі N-кінця білка *Als3*, ад'ювант – галун) спричиняла продукцію антитіл проти *Als3p*, які розпізнавали *C. auris* in vitro, інгібували біоплівкоутворення та підсилювали фагоцитоз грибка макрофагами. NDV-3A також забезпечувала захист імунодефіцитних мишей від *C. auris*. Інша вакцина на основі рекомбінантної аспартилпротеази *rSap2* із *C. parapsilosis* підвищувала

виживаність при інфекції *C. tropicalis* через активацію як гуморального, так і клітинного імунітету.

Щодо *A. fumigatus*, перспективним є підхід із використанням інактивованих дріжджових клітин *fbp1Δ*, які демонструють високу імуногенність та здатність захищати мишей, включно з CD4⁺ Т-виснаженими, від інфекцій *A. fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* і частково *C. albicans* [115].

Трансформаційна технологія націлювання

DectiSomes – це ліпосоми, наповнені лікарськими засобами, вкриті білками, які націлюють їх на клітинні стінки грибів та їх екзополісахаридні матриці. DectiSomes наближає протигрибкові препарати до клітин грибка, щоб підвищити їх локальну концентрацію та знизити їх концентрацію в клітинах хворого, тим самим знижуючи ефективну дозу препарату в мг/кг, необхідну для боротьби з патогеном, зменшуючи токсичний вплив на організм та дозволяючи тимчасово розширені схеми лікування [116].

В організмі людини дектин-1 (англ. Dectin-1) і дектин-2 (англ. Dectin-2) є рецепторами збудника лектину С-типу, які реагують на грибкові інфекції і сигналізують імунній системі про поточну інфекцію. DectiSomes використовує дані рецептори для пан-протигрибкового націлювання ліпосом, заповнених лікарськими засобами, на бета-глюкан або альфа-маннанові олігосахариди грибів. Ліпосоми, націлені на дектин, специфічно зв'язуються з клітинними стінками та секретованими матрицями екзополісахаридів еволюційно різноманітних грибових патогенів, включаючи *A. fumigatus*, *C. albicans* і *Cryptococcus neoformans* [117].

Доказ того, що DectiSomes є більш ефективними, ніж нецільові препарати, вперше був отриманий у дослідженнях зв'язування та знищення грибових клітин *in vitro*. DEC1-AmB-LL та DEC2-AmB-LL зв'язуються з клітинними стінками та ефективніше з матрицями екзополісахаридів *A. fumigatus*, *C. albicans* та *Cryptococcus neoformans*, вирощених *in vitro*, у 50–200 разів сильніше, ніж нецільові AmB-LL. Ліпосоми, навантажені AmB, покриті дектином-2 (DEC2-AmB-LL), зв'язуються з екзополісахаридом, що виділяється *A. fumigatus*. DEC2-AmB-LL зв'язуються на порядки більш ефективно з *A. fumigatus* на всіх стадіях

розвитку від конідії до гіфи, ніж нецільові ліпосоми AmB-LL. Відповідно, DEC2-AmB-LL інгібують та/або знищують *A. fumigatus* у 10-90 разів ефективніше *in vitro* [118].

В цілому, описані вище новітні стратегії та підходи до протигрибкової терапії представлені на рис. 1.3.



Рис. 1.3. Сучасні стратегії протигрибкової терапії

Примітка: систематизовано автором.

На наш погляд, однією з умов якісного та ефективного подолання резистентності до протигрибкових препаратів у збудників мікозів людини також є використання підходів, які лежать в основі концепції One Health. Останніми роками концепція One Health набула важливого значення у боротьбі з поширенням збудників грибкових інфекцій [119].

Концепція One Health є підходом до здоров'я людей, тварин і екосистем, який визнає взаємозв'язок між ними. Вона покликана поглибити співпрацю між різними галузями науки і секторами охорони здоров'я з метою вирішення проблем, пов'язаних з хворобами, які передаються від тварин і впливають на здоров'я людини (Рис. 1.4.).

One Health – це концепція, яка визначається як всесвітня стратегія розширення міждисциплінарного співробітництва та комунікацій у всіх аспектах охорони здоров'я: людей, тварин і навколишнього середовища [120]



А)



Б)

Рис. 1.4. А) Зображення загальної концепції One Health про міждисциплінарний зв'язок та його вплив Б) Зображення концепції One Health в аспекті мікології

Примітка: побудовано автором.

Щоб досягти швидкого результату зниження захворюваності, важливо комплексно досліджувати цілі мікробні спільноти, включаючи як патогенні, так і непатогенні мікроорганізми, в тому числі, і виділені з навколишнього середовища. Мікробіота, спільна для людей і тварин, повинна розглядатися в рамках підходу One Health, оскільки постійні зміни навколишнього середовища та тісний контакт із тваринами можуть впливати на здоров'я людини [121].

Отже, дослідження резистентності грибів до протигрибкових препаратів може відкрити нові шляхи для розробки ефективних стратегій лікування, які мають на меті подолати дану проблему. Розуміння механізмів стійкості грибів до антимікотичних препаратів дозволяє розробляти нові стратегії лікування грибкових інфекцій.

Існуючі теоретично-концептуальні положення, проаналізовані в даному розділі, наведено у наступних публікаціях:

1. Hrynzovska A., & Bobyr, V. (2024). NEW STRATEGIES IN COMBATING FUNGAL PATHOGENS. Medical Science of Ukraine (MSU), 20(2), 115-125. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.2.2024.14>

2. Coubani AO, editor. Pulmonary Aspergillosis: A Comprehensive Guide to the Disease Spectrum and Advances in Diagnosis and Management. 1st ed. Cham: Springer; 2024. XVIII, 356 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-76524-7>
3. Hrynzovska A, Bobyr V. Formation of resistance of *Candida* fungi to fungicidal drugs. USMYJ [Internet]. 2024Jun.27 [cited 2024Jul.4];146(2):60-7. Available from: <https://mmj.nmuofficial.com/index.php/journal/article/view/398>
4. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2023) Формування механізмів перехресної резистентності *A. fumigatus* за рахунок хімічної подібності азольних антимікотиків та фунгіцидів. Україна. Здоров'я нації, № 3, 27-33. <https://doi.org/10.32782/2077-6594/2023.3/04>
5. Гринзовська, А., & Бобир, В. (2023). Сучасні погляди на проблему антимікотикорезистентності штамів грибів родів *Fusarium* та *Aspergillus* в розрізі концепції One Health. Український науково-медичний молодіжний журнал, 141(3), 103-111. [https://doi.org/10.32345/USMYJ.3\(141\).2023.103-111](https://doi.org/10.32345/USMYJ.3(141).2023.103-111)
6. Еволюція Antifungal Stewardship: Витоки, розвиток та сучасні виклики/ Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 19 березня 2025 р.
7. Two and a half year monitoring of fungi in ambient air: Is airborne *A. fumigatus* a health hazard?/ Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and Virulence in Human Fungal Pathogens, La Colle sur Loup, France (збірка матеріалів науково-практичної закордонної конференції з міжнародною участю), 18-24 травня 2024 р. 168 ст.
8. Профілактичні заходи та методи боротьби із збудником *A. fumigatus* у різних сферах діяльності людини/ Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 13 березня 2024 р. 92-94 ст.
9. Сучасні підходи до вивчення типів модифікацій у генотипі та їхній вплив на поширення резистентних штамів *A. fumigatus* в пацієнтів та у навколишньому середовищі (2023). науково-практична конференція з

міжнародною участю до 100-річчя кафедри гігієни, безпеки праці та професійного здоров'я НМУ імені О.О. Богомольця та всесвітнього дня безпеки пацієнтів 2023 року «Актуальні проблеми безпеки і гігієни лікарень, персоналу. Український науково-медичний молодіжний журнал, 140(3), 97. <https://doi.org/10.32345/USMYJ.SUPPLEMENT.3.2023.1-114>

10. Технологія DectiSomes: новий напрямок у лікуванні грибкових інфекцій / III Науково-практична міжнародна дистанційна конференція «МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ В СУЧАСНІЙ МЕДИЦИНІ» 24 березня 2023 року

11. Механізми резистентності до азолів та глобальне поширення стійких штамів *Aspergillus fumigatus*/ Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 15 березня 2023 р. 84-85 ст.

12. Використання фунгіцидів у рослинництві як можливий шлях розвитку резистентності збудників мікозів людини / Міжнародна науково-практична конференція "Біологічні, медичні та науково-педагогічні аспекти здоров'я людини" 17-18.11.2022 р. м. Полтава

13. Використання імідазолів в особистій гігієні як один із можливих чинників виникнення резистентності мікозів людини до лікарських препаратів групи імідазолів / Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 16 березня 2022 р.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Відповідно до мети та завдань, наукова робота носить експериментально-параклінічний характер. Вона присвячена фундаментальним питанням, пов'язаним із формуванням перехресної резистентності у клінічних штаммах грибів та вивченню впливу пестицидів (фунгіцидів), які використовуються у сфері рослинництва на формування стійкості резистентності мікроорганізмів до лікарських препаратів, зокрема похідних імідазолів та триазолів. Експериментальна частина виконувалась на базі Mycology Reference laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, (Madrid, Spain) на базі Інституту гігієни та екології та в науково-дослідній бактеріологічній лабораторії кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Навчально-наукового інституту профілактичної медицини та громадського здоров'я Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (Київ, Україна).

Для вирішення поставлених завдань було виконано перспективне дослідження закономірностей поширення чутливих та резистентних штамів *A.fumigatus* поміж клінічних ізолятів та штамів навколишнього середовища. Розроблено ефективний спосіб набуття штучної перехресної резистентності *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* при використанні азольних фунгіцидів.

Досліди виконані згідно із загальними етичними принципами, що засвідчено експертними висновками комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України (протокол №163 від 07.11.2022 р., протокол №193 від 24.03.2025р.).

2.1. Характеристика матеріалів і методів, пов'язаних із дослідженням клінічних ізолятів *Candida spp.*

2.1.1. Характеристика дослідних клінічних ізолятів *Candida spp.*

Культури мікроорганізмів: в роботі були використані музейні (еталонні) штами грибів роду *Candida* (табл. 2.1): *C. albicans* DSM 1386, *C. krusei* RN 7106

та *C. glabrata* Y-199, що отримані із відомих колекцій мікроорганізмів (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського», колекція мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного). Застосовували також клінічні штами кандид – *C. albicans* (n=10), *C. krusei* (n=5), *C. glabrata* (n=5) з музеїв культур мікроорганізмів кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології НМУ імені О.О. Богомольця та бактеріологічної лабораторії ВНМУ імені М.І. Пирогова. Ідентифікацію ізольованих культур грибів здійснювали з використанням приладу для ідентифікації та визначення чутливості мікроорганізмів до протимікробних засобів – Vitek 2 compact 30.

Мікроорганізми	Кількість штамів	Адреса одержання мікроорганізмів
<i>C. albicans</i> DSM 1386	1	Музей живих культур університету Лейпцигу
<i>C. krusei</i> RN 7106	1	Музей культур мікроорганізмів кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології НМУ ім. О. О. Богомольця
<i>C. glabrata</i> YI99	1	– // – //–
<i>C. albicans</i>	10	Культури, виділені з матеріалу від хворих в медичних установах м. Києва та м. Вінниці (Україна)
<i>C. krusei</i>	5	– // – //–
<i>C. glabrata</i>	5	– // – //–

Табл. 2.1. *Candida* spp., які використовувалися в даному дослідженні та їхні місця отримання/реєстрації

2.1.2. Методики мікробіологічного дослідження

Визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) та мінімальної фунгіцидної концентрації (МФЦК) дослідних препаратів:

МІК фунгіцидів визначали методом серійних розведень препаратів у рідкому поживному середовищі АМЗ (Antibiotic medium 3) [122]. Робочі розчини готували в асептичних умовах шляхом розведення кристалічних порошків (дифеноконазолу, тебуконазолу, флуатріяфолу, імазалілу та прохлоразу) вагою 800 мг (0,8 г) або 0,8 мл рідкого пропіконазолу в 9,2 мл ДМСО. Надалі проводили двократні послідовні в рідкому середовищі АМЗ до кінцевої концентрації фунгіциду 9,7 мг/мл (для дифеноконазолу, тебуконазолу, флуатріяфолу, імазалілу, прохлоразу) або 12,5 мг/мл для пропіконазолу (розрахунок маси та концентрації вираховували з урахуванням густини препарату). До отриманих

розведень препаратів додавали суспензію кандид. Кінцева доза інокуляту становила 1×10^4 – 5×10^4 клітин/мл. Пробірки поміщали у термостат на 48 годин для інкубації при температурі 35°C. Проведення оцінки результатів пригнічення росту мікроорганізмів у розчині за 4+ системою (0 – оптично прозорий, 4+ - немає відмінностей від позитивного контролю) виявилось утрудненим через каламутність розчинів, починаючи з першого розведення. Тому, антифунгальну активність досліджуваних антимікотиків проводили за МФцК.

Для визначення МФцК відбирали проби по 0,1 мл з концентрацією фунгіцидних препаратів $1,0 \times \text{МК}$, проби з вищою концентрацією, а також з позитивним контролем. Кожну пробу висівали на чашки Петрі з середовищем Сабуро та інкубували при температурі 35°C. Результати оцінювали через 24 та 48 год. Результат вважали негативним при наявності 5 або менше колоній на чашку, що еквівалентно 99,9 % загибелі дослідної культури. Найнижчу концентрацію, при якій реєструвалися негативні результати приймали за МФцК [122]. Для встановлення міжвидових відмінностей у чутливості кандид до фунгіцидів вираховували середні значення МФцК для видів *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*.

Визначення чутливості кандид до антифунгальних лікарських засобів диско-дифузійним методом (ДДМ):

Для вивчення можливості формування перехресної стійкості до протигрибкових препаратів медичного призначення у кандид, які були адаптовані до високих концентрацій сільськогосподарських фунгіцидів, проводили порівняльне визначення чутливості вихідних та пасажованих штамів грибів роду *Candida* до найбільш поширених у медичній практиці антифунгальних препаратів – похідних імідазолу, триазолу та полієнових антибіотиків. Чутливість визначали згідно стандартної методики, що зазначена в CLSI M44-A2 (2018), використовуючи середовище Мюлера-Хінтона з додаванням 2% глюкози та 0,5 мг/мл метиленової синьки та стандартних дисків з міконазолом (50 мг на диск), клотримазолом (10 мг на диск), флуконазолом (25 мг на диск), воріконазолом (1 мг на диск), ністатином (100 ОД на диск) виробництва HiMedia [123].

Формування резистентності кандид до фунгіцидних засобів:

З метою з'ясування можливості формування резистентності та вивчення динаміки появи резистентних до фунгіцидів кандид здійснено серію пасажів клінічних штамів видів *C. albicans* (2 штами), *C. glabrata* (1 штама), *C. krusei* (1 штама) у рідких поживних середовищах з різними концентраціями кожного із досліджуваних фунгіцидів. Пасажування проводили у поживних середовищах із зростаючою концентрацією фунгіциду, які інокулювали суспензією культури *Candida spp.* попереднього пасажу, що розмножувалась в присутності половинної мінімальної фунгіцидної концентрації певного препарату. Після інкубації в термостаті впродовж 24 год. та 48 год. вміст кожної пробірки висівали на щільне поживне середовище для визначення МФцК. Кількість пасажів коливалась від 10 до 16 в залежності від виду *Candida spp.*

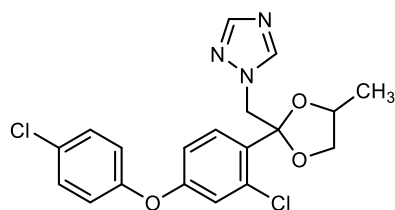
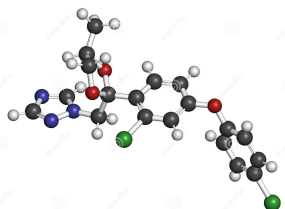
2.1.3. Фізико-хімічна характеристика фунгіцидів, використаних у дослідженні

Дифеноконазол

1. Фізико-хімічні властивості

- **Хімічна формула:** $C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$
- **Молекулярна маса:** 406,27 г/моль
- **Структура (рис.2.1.):** Дифеноконазол є похідним триазольного класу хімічних сполук. Він має хімічне кільце триазолу та дві хлорвмісні ароматичні групи, що робить його стійким і ефективним проти багатьох грибів.

Дифеноконазол
Difenoconazol



Триазол

Рис.2.1. Структурна формула дифеноконазолу, С карбон – сірий, Н гідроген – білий, Cl хлор – зелений, N нітроген – синій, O оксиген червоний

- **Розчинність:**

Добре розчиняється в органічних розчинниках (ацетон, дихлорметан, метанол). Малорозчинний у воді (приблизно 15 мг/л при 20°C).

- **Колір і форма:** Білий або світло-жовтий кристалічний порошок.
- **pH:** Водні розчини дифеноконазолу мають нейтральний або слабокислий pH (близько 6–7).

2. Біологічні властивості

• Спектр дії:

Дифеноконазол є системним фунгіцидом із широким спектром дії, ефективним проти багатьох грибкових захворювань рослин, включаючи збудників з класів Ascomycota, Basidiomycota, та Deuteromycota.

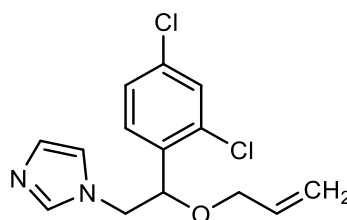
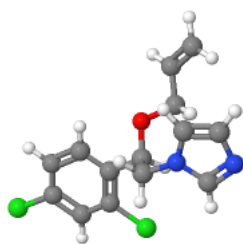
Використовується для контролю таких патогенів як *Septoria*, *Alternaria*, *Mycosphaerella*, *Cercospora*, *Powdery mildew* (борошниста роса), *Rust* (іржа) та інші.

Імазаліл

1. Фізико-хімічні властивості

- **Хімічна формула:** $C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$
- **Молекулярна маса:** 297,18 г/моль
- **Структура (рис.2.2.):** Імазаліл належить до групи імідазольних фунгіцидів, його структура включає ароматичні кільця та атоми хлору, що робить його ефективним проти широкого спектру грибкових патогенів.

Імазаліл
Imazalil



Імідазол

Рис.2.2. Структурна формула імазаліла, С карбон – сірий, Н гідроген – білий, Cl хлор – зелений, N нітроген – синій, O кисисген червоний

• Розчинність:

Помірно розчиняється у воді (приблизно 200 мг/л при 25°C). Добре розчиняється в органічних розчинниках, таких як метанол, етанол, ацетон.

- **Колір і форма:** Білий або світло-жовтий кристалічний порошок.
- **pH:** Водні розчини мають слабо кислий або нейтральний pH (близько 5–7).

2. Біологічні властивості

- **Спектр дії:**

Імазаліл є фунгіцидом із широким спектром дії. Він використовується для захисту сільськогосподарських культур від грибкових захворювань, зокрема, проти збудників, що викликають гнилі плодів під час зберігання, а також для обробки насіння.

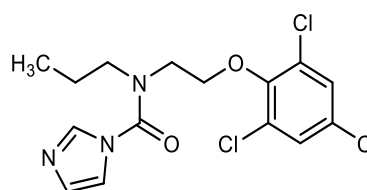
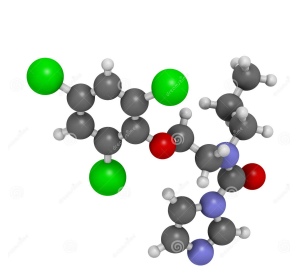
Ефективний проти патогенів, таких як *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, а також борошниста роса, парша та альтернаріоз.

Прохлораз

1. Фізико-хімічні властивості

- **Хімічна формула:** $C_{13}H_9Cl_3N_2O_2$
- **Молекулярна маса:** 331,58 г/моль
- **Структура (рис.2.3.):** Прохлораз є похідним імідазолу, що має хлоровані ароматичні кільця, які забезпечують стабільну і ефективну дію проти грибкових патогенів. Основною структурною ознакою є імідазольне кільце, яке блокує важливі біохімічні процеси у клітинах грибів.

Прохлораз
Prochloraz



Імідазол

Рис. 2.3. Структурна формула прохлоразу, С карбон – сірий, Н гідроген – білий, Cl хлор – зелений, N нітроген – синій, O кисисген червоний

- **Розчинність:**

Низько розчинний у воді (приблизно 34 мг/л при 20°C). Добре розчиняється в органічних розчинниках, таких як ацетон, метанол, етанол.

- **Колір і форма:** Білий або світло-жовтий кристалічний порошок.
- **pH:** Прохлораз є хімічно стабільним при нейтральному або слабокислому pH (близько 5-7).

2. Біологічні властивості

- **Спектр дії:**

Прохлораз є широкоспектральним фунгіцидом, ефективним проти грибкових збудників класів *Ascomycetes* та *Basidiomycetes*. Використовується для

боротьби з такими патогенами як *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, а також збудниками плямистостей, парші та інших грибкових захворювань.

Застосовується для обробки насіння, овочевих і зернових культур, фруктів і декоративних рослин.

Пропіконазол

1. Фізико-хімічні властивості

- **Хімічна формула:** $C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$
- **Молекулярна маса:** 342,22 г/моль
- **Структура (рис.2.4.):** Пропіконазол — це триазольний фунгіцид, який має хлоровані ароматичні кільця та триазольне кільце, що є характерною ознакою для сполук цього класу.

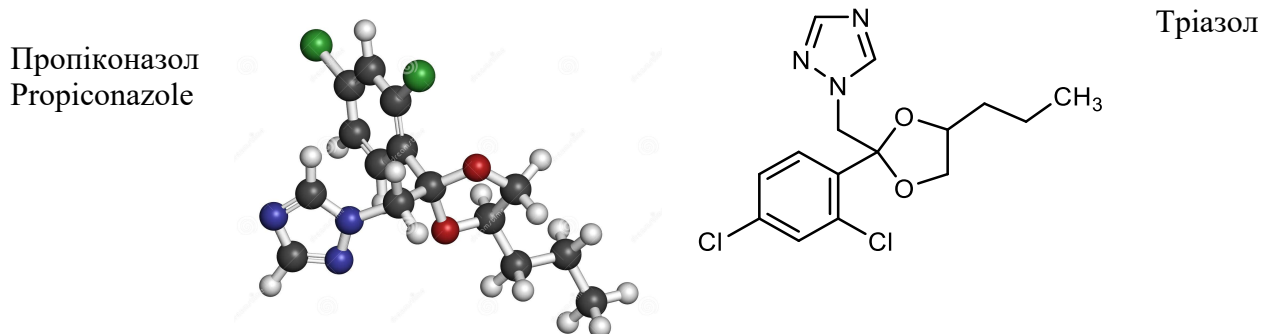


Рис.2.4. Структурна формула пропіконазолу, С карбон – сірий, Н гідроген – білий, Cl хлор – зелений, N нітроген – синій, O оксиген червоний

- **Розчинність:**

Помірно розчиняється у воді (приблизно 110 мг/л при 20°C). Добре розчиняється в органічних розчинниках, таких як метанол, етанол, ацетон та інші.

- **Колір і форма:** Світло-жовта або біла рідина (у технічній формі, або прозора в розчині).

- **pH:** Водні розчини пропіконазолу мають нейтральний або слабо кислий pH (близько 6–7).

2. Біологічні властивості

- **Спектр дії:**

Пропіконазол є системним фунгіцидом із широким спектром дії, ефективним проти багатьох грибкових захворювань рослин, включаючи патогени з класів *Ascomycota*, *Basidiomycota* та *Deuteromycota*.

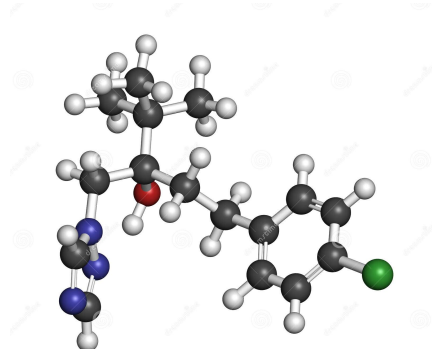
Він використовується для захисту від захворювань, таких як борошниста роса (*Erysiphe*), іржа (*Puccinia*), плямистості листя (*Cercospora*, *Septoria*), альтернаріоз (*Alternaria*), парша (*Venturia*) та інших.

Тебуконазол

1. Фізико-хімічні властивості

- **Хімічна формула:** $C_{16}H_{22}ClN_3O$
- **Молекулярна маса:** 307,82 г/моль
- **Структура (рис.2.5.):** Тебуконазол — триазольний фунгіцид, що має структуру, яка включає азольне кільце та хлоровані ароматичні групи. Це забезпечує його системну активність та високу ефективність.

Тебуконазол
Tebuconazole



Тріазол

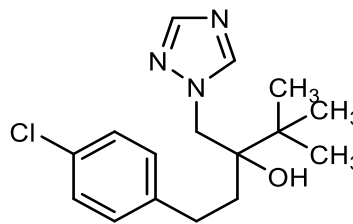


Рис. 2.5. Структурна формула тебуконазолу, С карбон – сірий, Н гідроген – білий, Cl хлор – зелений, N нітроген – синій, O оксиген червоний

- **Розчинність:**

Слабо розчиняється у воді (приблизно 36 мг/л при 20°C). Добре розчиняється в органічних розчинниках, таких як ацетон, метанол, етанол, толуол.

- **Колір і форма:** Білий або світло-жовтий кристалічний порошок або прозорий у рідкій формі.

- **pH:** Водні розчини тебуконазолу мають слабокислий або нейтральний pH (близько 5–7).

2. Біологічні властивості

- **Спектр дії:**

Тебуконазол є системним фунгіцидом із широким спектром дії, ефективним проти багатьох видів грибкових патогенів. Його використовують для контролю таких хвороб як борошниста роса (*Erysiphe*), іржа (*Puccinia*), плямистості листя (*Septoria*, *Cercospora*), альтернаріоз (*Alternaria*) та інші грибкові захворювання.

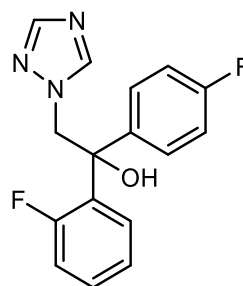
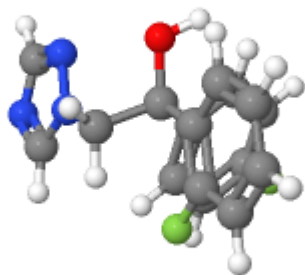
Використовується для захисту сільськогосподарських культур, таких як зернові (пшениця, ячмінь), олійні культури (ріпак), овочі, фрукти.

Флутріафол

1. Фізико-хімічні властивості

- **Хімічна формула:** $C_{16}H_{13}F_2N_3O$
- **Молекулярна маса:** 305,29 г/моль
- **Структура (рис.2.6.):** Флутріафол є похідним триазолу, який має фторвмісні ароматичні групи та триазольне кільце. Це забезпечує високу стабільність і ефективність його протигрибкової дії щодо грибкових патогенів.

Флутріафол
Flutriafol



Триазол

Рис.2.6. Структурна формула флутріафолу, С карбон – сірий, Н гідроген – білий, F фтор – зелений, N нітроген – синій, О кисень червоний

• Розчинність:

Малорозчинний у воді (близько 130 мг/л при 20°C). Добре розчиняється в органічних розчинниках, таких як ацетон, етанол і метанол.

- **Колір і форма:** Білий або світло-жовтий кристалічний порошок або прозора рідина (у розчинах).

- **pH:** Водні розчини флутріафолу мають слабокислий або нейтральний pH (близько 5-7).

2. Біологічні властивості

• Спектр дії:

Флутріафол є системним фунгіцидом широкого спектра дії, який використовується для боротьби з грибковими захворюваннями багатьох культур. Він особливо ефективний проти таких патогенів як борошниста роса (*Erysiphe*), іржа (*Puccinia*), плямистості листя (*Septoria*), альтернаріоз (*Alternaria*) та інші грибкові захворювання.

Застосовується для захисту зернових культур, плодових дерев, виноградників, овочевих та олійних культур.

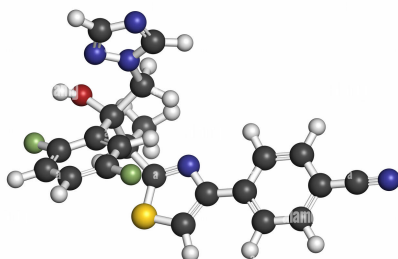
2.1.4. Фізико-хімічна характеристика фармацевтичних препаратів, використаних у дослідженні

Ізавуконазол

1. Фізико-хімічні властивості

- **Хімічна формула:** $C_{22}H_{17}F_2N_5O$
- **Молекулярна маса:** 437,4 г/моль
- **Структура(рис.2.7.):** Ізавуконазол є триазольним антимікотиком, що має триазольне кільце, два фторвмісні ароматичні кільця та інші функціональні групи, які забезпечують йому високу протигрибкову активність і низьку токсичність.

Ізавуконазол
Izavukonazol



Триазол

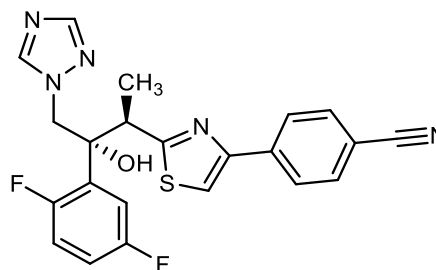


Рис. 2.7. Структурна формула ізавуконазолу, С карбон – сірий, Н гідроген – білий, F фтор – зелений, S сульфур – жовтий, N нітроген – синій, О кисень червоний

- **Розчинність:**

Погано розчиняється у воді, добре розчиняється в органічних розчинниках, таких як диметилсульфоксид (ДМСО) та метанол. У медичних формах використовується у вигляді ліофілізату для внутрішньовенного застосування або в капсулах для перорального прийому.

- **Колір і форма:** Білий або світло-жовтий кристалічний порошок.

- **pH:** Водні розчини ізавуконазолу мають слабокислий або нейтральний pH, що залежить від препарату.

2. Біологічні властивості

- **Спектр дії:**

Ізавуконазол має широкий спектр протигрибкової активності, включаючи дію проти дріжджоподібних грибів (*Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*), цвілевих грибів (*Aspergillus spp.*), а також патогенів, що спричиняють ендемічні мікози (*Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*).

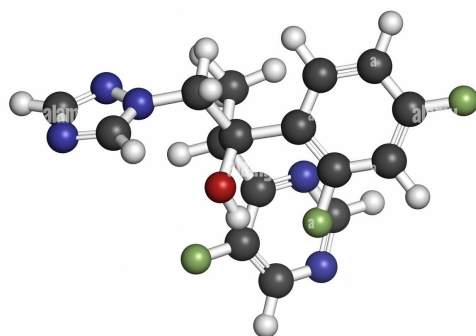
Препарат часто використовується для лікування інвазивних грибкових інфекцій, зокрема інвазивного аспергільозу, а також для профілактики грибкових інфекцій у пацієнтів з ослабленим імунітетом.

Вориконазол

1. Фізико-хімічні властивості

- **Хімічна формула:** $C_{16}H_{14}F_3N_5O$
- **Молекулярна маса:** 349,31 г/моль
- **Структура (рис.2.8.):** Вориконазол є похідним триазолу з основною хімічною структурою, що включає триазольне кільце та три фторвмісні групи. Його структура є дуже стабільною та забезпечує високу протигрибкову активність.

Вориконазол
Voriconazole



Триазол

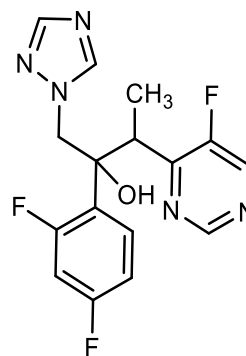


Рис. 2.8. Структурна формула вориконазолу, С карбон – сірий, Н гідроген – білий, F фтор – зелений, N нітроген – синій, О кисисген червоний

- **Розчинність:**

Помірно розчинний у воді (10 мг/мл), але добре розчиняється в органічних розчинниках, таких як етанол і диметилсульфоксид (ДМСО).

- **Колір і форма:** Білий або світло-жовтий кристалічний порошок.

- **pH:** Водні розчини вориконазолу мають слабокислий pH, що залежить від концентрації, зазвичай знаходиться в межах 3–5.

2. Біологічні властивості

- **Спектр дії:**

Вориконазол є протигрибковим препаратом широкого спектру дії, ефективним проти багатьох видів грибів, включаючи дріжджі (*Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*), цвілеві гриби (*Aspergillus spp.*) і деяких ендемічних грибів (*Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*).

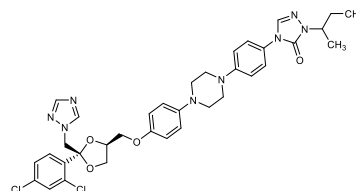
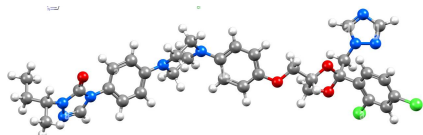
Препарат також ефективний проти видів, які можуть бути резистентними до інших азольних протигрибкових засобів, таких як *C. glabrata* та *C. krusei*.

Ітраконазол

1. Фізико-хімічні властивості

- **Хімічна формула:** $C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$
- **Молекулярна маса:** 705,64 г/моль
- **Структура (рис.2.9.):** Ітраконазол належить до групи триазольних антимікотиків. Він має складну молекулярну структуру, що включає триазольне кільце, два хлорвмісні ароматичні кільця та декілька гетероциклів.

Ітраконазол
Itraconazole



Триазол

Рис. 2.9. Структурна формула ітраконазолу, С карбон – сірий, Н гідроген – білий, Cl хлор – зелений, N нітроген – синій, О кисисген червоний

- **Розчинність:**

Ітраконазол погано розчиняється у воді, але добре розчиняється в органічних розчинниках, таких як метанол, етанол та диметилсульфоксид (ДМСО).

- **Колір і форма:** Білий або майже білий кристалічний порошок.
- **pH:** Ітраконазол є погано розчинним у воді, тому він зазвичай використовується у складі капсул або розчинів для перорального застосування, де pH може бути слабокислим (близько 5-7).

2. Біологічні властивості

- **Спектр дії:**

Ітраконазол є протигрибковим препаратом широкого спектра дії. Він ефективний проти дріжджоподібних грибів (*Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*), цвілевих грибів (*Aspergillus spp.*), дерматофітів, ендемічних грибів (*Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*) та деяких інших патогенів.

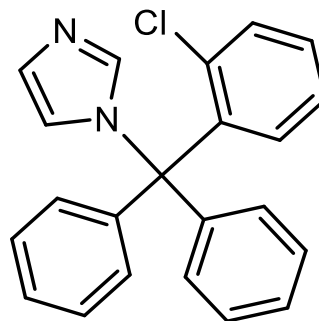
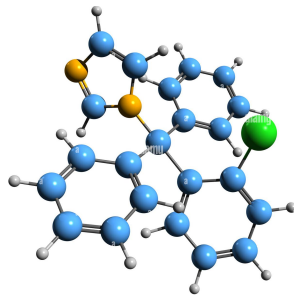
Використовується для лікування системних і поверхневих мікозів, включаючи оніхомікоз, аспергільоз, криптококовий менінгіт, ендемічні мікози, а також кандидози різного походження.

Клотримазол

1. Фізико-хімічні властивості

- **Хімічна формула:** $C_{22}H_{17}ClN_2$
- **Молекулярна маса:** 344,84 г/моль
- **Структура (рис.2.10.):** Клотримазол належить до групи імідазольних антимікотиків. У структурі містить хлорвмісні ароматичні кільця та імідазольне кільце, яке є активною частиною, що інгібує синтез ергостеролу у клітинній мембрані грибів.

Клотримазол
Clotrimazole



Імідазол

Рис. 2.10. Структурна формула клотримазолу, С карбон – голубий, Н гідроген – білий, Cl хлор – зелений, N нітроген – жовтий

- **Розчинність:**

Погано розчиняється у воді, добре розчиняється в органічних розчинниках, таких як метанол, етанол і хлороформ.

- **Колір і форма:** Білий або майже білий кристалічний порошок.
- **pH:** Водні розчини клотримазолу зазвичай мають нейтральний або слабокислий pH (близько 6-7).

2. Біологічні властивості

- **Спектр дії:**

Клотримазол є антимікотиком широкого спектру дії. Він ефективний проти дріжджоподібних грибів (*Candida spp.*), дерматофітів (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*), а також збудників інших грибкових захворювань шкіри і слизових оболонок.

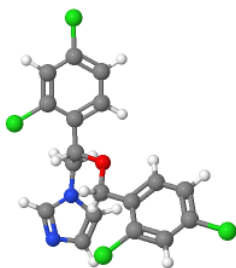
Застосовується для лікування вагінального кандидозу, оніхомікозу, дерматомікозу, а також поверхневих мікозів шкіри.

Міконазол

1. Фізико-хімічні властивості

- **Хімічна формула:** $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$
- **Молекулярна маса:** 416,13 г/моль
- **Структура (рис.2.11.):** Міконазол належить до групи імідазольних антимікотиків. Його структура включає імідазольне кільце та хлорвмісні ароматичні кільця, які забезпечують його активність проти грибів.

Міконазол
Miconazole



Імідазол

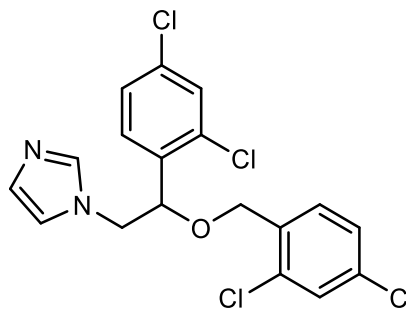


Рис. 2.11. Структурна формула міконазолу, С карбон – сірий, Н гідроген – білий, Cl хлор – зелений, N нітроген – синій, O кисисген – червоний

- **Розчинність:**

Погано розчиняється у воді, але добре розчиняється в органічних розчинниках, таких як етанол, метанол, ацетон і хлороформ.

- **Колір і форма:** Білий або майже білий кристалічний порошок.
- **pH:** Препарати на основі міконазолу, зокрема креми або гелі, зазвичай мають нейтральний або слабокислий pH (близько 6-7).

2. Біологічні властивості

- **Спектр дії:**

Міконазол є протигрибковим препаратом широкого спектру дії, який використовується для боротьби з дріжджоподібними грибами (*Candida spp.*),

дерматофітами (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*), а також іншими патогенами, включаючи деякі бактерії (*Staphylococcus*, *Streptococcus*).

Призначається для лікування вагінального кандидозу, дерматомікозів, оніхомікозу та інших грибкових інфекцій шкіри та слизових оболонок.

Ністатин

1. Фізико-хімічні властивості:

- **Хімічна формула:** $C_{47}H_{75}NO_{17}$
- **Молекулярна маса:** 926.11 г/моль
- **Структура:** Ністатин є полієновим макролідом, що складається з великого кільця з гідрофільними та ліпофільними сегментами, що дозволяє йому зв'язуватися з ергостеролом у клітинній мембрані грибів.

- **Розчинність:**

Практично нерозчинний у воді, але добре розчиняється в органічних розчинниках, таких як етанол, метанол і диметилсульфоксид (ДМСО).

- **Колір і форма:** Жовтий або жовто-коричневий порошок.
- **pH:** Водний розчин ністатину має pH близько 6.0-7.5.

2. Біологічні властивості:

- **Спектр дії:**

Ністатин активний проти грибів роду *Candida* (зокрема *C. albicans*), а також деяких інших грибкових патогенів, таких як *Cryptococcus*. Він не ефективний проти бактерій або вірусів.

Посаконазол

1. Фізико-хімічні властивості

- **Хімічна формула:** $C_{37}H_{42}F_2N_8O_4$
- **Молекулярна маса:** 700,78 г/моль
- **Структура (рис 2.12.):** Посаконазол є похідним триазольної групи антимікотиків. У структурі містить триазольне кільце, фторвмісні групи та велике гетероциклічне кільце, що робить його ефективним проти широкого спектра грибів.

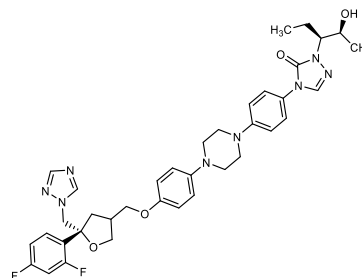
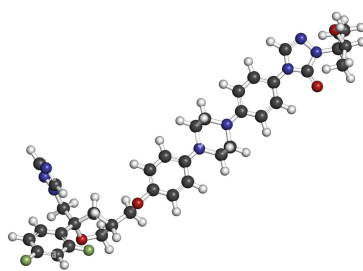


Рис. 2.12. Структурна формула позаконазолу, С карбон – сірий, Н гідроген – білий, F фтор – зелений, N нітроген – синій, О кисисген червоний

- **Розчинність:**

Позаконазол є погано розчинним у воді. Його розчинність покращується в середовищах з низьким рН, що пояснює необхідність приймати препарат із їжею або кислотними напоями для покращення абсорбції.

Добре розчиняється в органічних розчинниках, таких як метанол та диметилсульфоксид (ДМСО).

- **Колір і форма:** Білий або майже білий кристалічний порошок.
- **рН:** У водних розчинах має слабокислий рН, який залежить від концентрації препарату та середовища.

2. Біологічні властивості

- **Спектр дії:**

Посаконазол — це протигрибковий засіб широкого спектра дії, ефективний проти дріжджоподібних грибів, таких як *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* та цвілевих грибів, включаючи *Aspergillus spp.*, а також ендемічних грибів, таких як *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*.

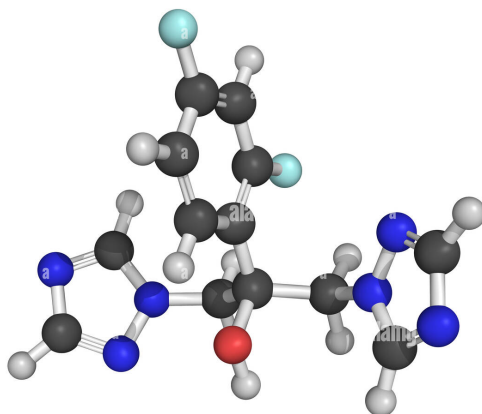
Препарат використовується для профілактики та лікування інвазивних мікозів, особливо у пацієнтів з ослабленим імунітетом, наприклад, після трансплантації або при хіміотерапії.

Флуконазол

1. Фізико-хімічні властивості

- **Хімічна формула:** $C_{13}H_{12}F_2N_6O$
- **Молекулярна маса:** 306,27 г/моль
- **Структура (рис.2.13.):** Флуконазол є похідним триазольних антимікотиків. Містить дві фторвмісні групи та азольне кільце, яке відповідає за механізм інгібування ергостеролу в грибових клітинах.

Флуконазол
Fluconazole



Тріазол

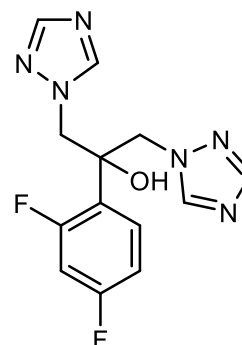


Рис. 2.13. Структурна формула флуконазолу, С карбон – сірий, Н гідроген – білий, Cl хлор – зелений, N нітроген – синій, О кисисген червоний

- **Розчинність:**

Добре розчиняється у воді (близько 10 мг/мл), диметилсульфоксиді (ДМСО) та етанолі.

- **Колір і форма:** Білий або майже білий кристалічний порошок.
- **pH:** Водні розчини мають нейтральний або слабокислий pH, приблизно 6-7.

2. Біологічні властивості

- **Спектр дії:**

Флуконазол є протигрибковим засобом широкого спектра дії. Він ефективний проти дріжджоподібних грибів роду *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, дерматофітів, *Coccidioides*, *Histoplasma*, а також деяких інших збудників грибкових інфекцій.

Основні показання до застосування включають лікування системного та поверхневого кандидозу, криптококового менінгіту, мікозів шкіри та інших інфекцій.

2.1.5. Методика світлової мікроскопії та електронної просвічуючої мікроскопії

Структурно-морфологічні особливості грибів порівнювали до та після формування резистентності шляхом використання світлової мікроскопії та електронної просвічуючої мікроскопії. Для роботи використовували добову

культуру, вирощену на МПБ. Препарати для світлової мікроскопії забарвлювали 1 % водним розчином метиленового синього протягом 3 хв.

Електронно-мікроскопічні дослідження виконували у науково-дослідній бактеріологічній лабораторії кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Навчально-наукового інституту профілактичної медицини та громадського здоров'я Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Свіжі культури грибів досліджували в електронних мікроскопах Jeol JEM 100 CX II (Японія) та ПЕМ-125 (Україна) за стандартною методикою. Об'єкти поміщали на плівку-підкладку з формвару або колодію, попередньо укріплену вуглецем [124]. Препарати не контрастували. Контролем слугували вихідні культури *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*.

Результати досліджень були оброблені статистично з використанням програмного забезпечення для статистичного аналізу Microsoft Excel 2016 та «Statistica 5.5». Аналіз вірогідності проводили за t-критерієм Стюдента. Різницю між показниками вважали статистично значимою при ймовірності нульової гіпотези менше 5% ($p < 0,05$).

2.2. Характеристика матеріалів і методів, пов'язаних із дослідженням клінічних штамів та ізолятів з навколишнього середовища *A. fumigatus*

2.2.1. Відбір зразків та ідентифікація ізолятів *A. fumigatus*

Клінічні ізоляти

Триста сімдесят вісім клінічних ізолятів *Aspergillus* були виділені з лютого 2022 р. по лютий 2024 р. в Hospital Universitario 12 de Octubre (Мадрид, Іспанія). Ізоляти були надіслані до Mycology Reference laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Мадрид, Іспанія) (рис. 2.14.).

Отримані ізоляти були пересіяні в пластикові пробірки з картопляним декстрозним агаром (Sigma, Мадрид, Іспанія) для отримання чистої культури та візуальної ідентифікації після культивування 2-3 доби при температурі 30°C.

Екологічні ізоляти

З лютого 2022 р. по лютий 2024 р. було проведено 19 відборів проб повітря у двох різних місцях (Махадаонда та Вільяверде) у Мадриді, Іспанія. Зразки

відбирали відповідно до технічної специфікації CEN UNE CEN/TS 16115-1:2013 шляхом фільтрації 12 м³ навколишнього повітря через стерилізовані фільтри за допомогою каліброваного обладнання впродовж 4-х годинних періодів щоразу. Після відбору зразків фільтри розчиняли в фізіологічному розчині (0,85 % NaCl) з 0,01 % Tween 80 і отримані суспензії культивували на чашках з агаром Сабуро (Sigma-Aldrich, Іспанія). Культури інкубували та підраховували колонієутворюючі одиниці (КУО). Кожну КУО потім субкультивували і види грибів ідентифікували за допомогою макроскопічної морфології та техніки MALDI-TOF, використовуючи VITEK® MS Mold Kit для екстракції білка, аналізуючи за системою VITEK® MS v3.2 IVD та Saramis v4.16 RUO база даних (46,47) (Biomerieux, Іспанія). 446 *A. fumigatus* були виділені та включені в це дослідження (рис. 2.14.).

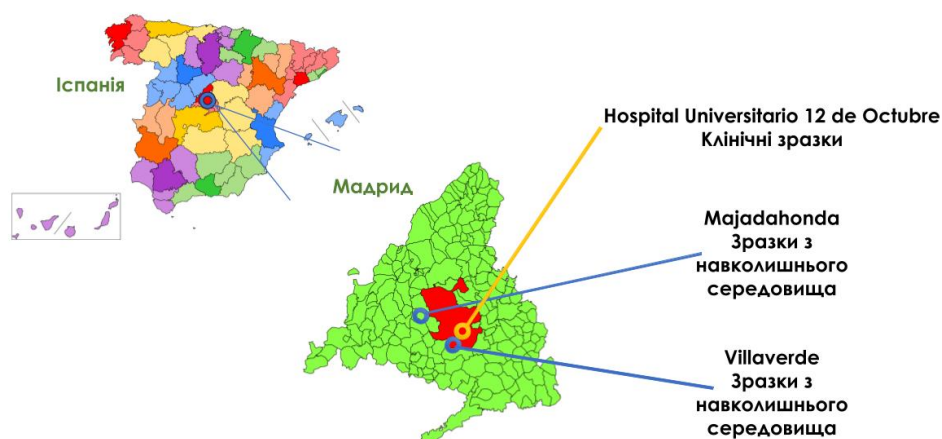


Рис. 2.14. Локації отримання клінічних зразків та з навколишнього середовища

Клінічні штами та ізоляти з навколишнього середовища

Вирощені ізоляти субкультивували в рідкому середовищі глюкоза-дріжджовий екстракт-пептон (GYEP), який містить 0,3 % дріжджового екстракту(Difco, Іспанія), 1 % пептону (Difco, Іспанія) та 2 % глюкози (Sigma-Aldrich, Іспанія) від 24 до 48 годин при 30°C до моменту утворення міцелію для подальшого виділення ДНК. Використовуючи аркуш фільтрувального паперу, який розділений чорним маркером на квадрати, міцелій збирали пластиковим наконечником піпетки і поміщають в попередньо ідентифікований за номером

штаму квадрант, який є достатньо великим для переміщення міцелію декілька разів. Після чого відбувається висушування міцелію(рис. 2.15.).

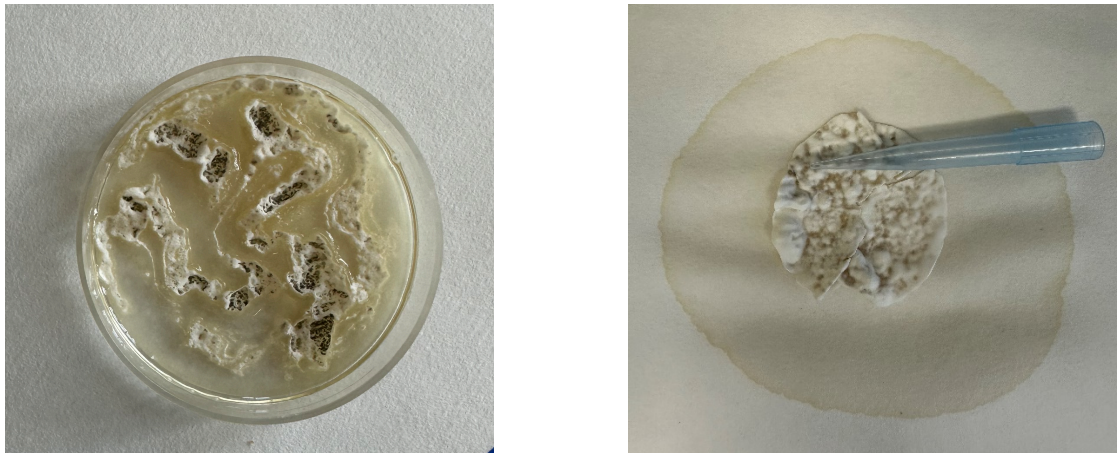


Рис. 2.15. Субкультивування в середовищі GYEP з подальшим висушування перед механічним руйнуванням міцелію.

Весь отриманий висушений міцелій переміщували у пропіленову пробірку Falcon об'ємом 50 мл із гвинтовою кришкою, до якої додано 6 скляних кульок діаметром 4 мм. Використовуючи захисні окуляри та рукавички, пробірку поміщають у рідкий N_2 (азот) і витримували 30 секунд, після чого використовували вортекс на максимальній швидкості протягом 30 секунд. Якщо повного подрібнення міцелію не досягнуто, повторно використовували рідкий азот та вортекс (максимум 3 рази).

Після механічного руйнування міцелію вихровим змішуванням зі скляними кульками, геномну ДНК ізолятів екстрагували фенол-хлороформним методом: 1. 800 мкл екстракційного буфера негайно додають у пробірку Falcon та всередині газової kabіни додається 800 мкл фенолу: хлороформу: ізоамілового спирту PCI:25:24:1 (SIGMA Ref. P-3803) після чого – використання вортексу протягом 30 секунд.

1. Перенесення в епандорф 2мл з подальшим центрифугуванням протягом 15 хв при 12 000 об/хв між 4 - 8 °C;

2. Піпеткою на 1000 мкл збирали всю надосадову рідину, намагаючись не захопити межі розділу 600 мкл і переноситься у інший епандорф. Решта викидається в трубку Falcon, яку ми зарезервували для відходів.

3. Додавали таку ж кількість (600 мкл), як і зібраний об'єм фенолу: хлороформ: ізоаміловий спирт PCI:25:24:1 (SIGMA Ref. P-3803), після чого енергійно струшують у вортексі з подальшим центрифугуванням протягом 15 хвилин при 12 000 об/хв при 4 - 8 °С.

4. Супернатант збирали (500 мкл) і екстрагували один раз сумішшю хлороформ: ізоаміловий спирт, після чого енергійно струшують у вортексі з подальшим центрифугуванням протягом 5 хвилин при 12 000 об/хв при 4 - 8 °С.

5. Супернатант збирали (400 мкл) і додають 240 мкл ізопропанолу з подальшим центрифугуванням протягом 15 хвилин при 12 000 об/хв при кімнатній температурі.

6. Супернатант видаляли аспірацією, а осад промивають 300 мкл 70% етанолу (EtOH). Його центрифугують 10 хвилин при 12 000 об/хв між 4 - 8 °С;

7. Супернатант видаляли шляхом аспірації та ресуспендують у 25 мкл – 50 мкл (залежно від розміру осаду) стерильної дистильованої води з РНКазою (1 мкл - 2 мкл вихідного розчину 1 мг/мл);

8. Інкубували впродовж 1 години при 37°C; [125].

Згодом була проведена молекулярна ідентифікація та таксономічна ідентифікація шляхом ПЛР-ампліфікації та секвенування гена ITS та β -тубуліну для зразків навколишнього середовища, для клінічних зразків - лише гена β -тубуліну в умовах, описаних раніше [126, 127]. Стрімкий розвиток методів секвенування ДНК зумовив глобальне збільшення інформації щодо геномних послідовностей різних організмів, яка на сьогодні є загальнодоступною в базах даних. Володіючи чіткими, достовірними даними щодо послідовностей у геномі, пошук ДНК-маркерів, які локалізуються в генах або поруч з ними, став достатньо простим. Послідовності редагували та аналізували за допомогою програмного забезпечення DNA Star Lasergene 12 (DNA Star Inc., США) і порівнювали з еталонними послідовностями з GenBank [128]

2.2.2. Визначення чутливості клінічних ізолятів *A. fumigatus* до протигрибкових препаратів

Скринінг чутливості до протигрибкових препаратів проводився відповідно до еталонного методу EUCAST 10.2 (рис. 2.16.)[129] Європейського комітету з

тестування чутливості до протигрибкових засобів (EUCAST), як описано раніше [130], з такими концентраціями: 4 мг/л ітраконазолу, 2 мг/л вориконазолу та 0,5 мг/л позаконазолу. (Sigma-Aldrich, Іспанія). Планшети інкубували при 35 °C протягом 48 годин, і штами вважалися нечутливими, коли спостерігався ріст.

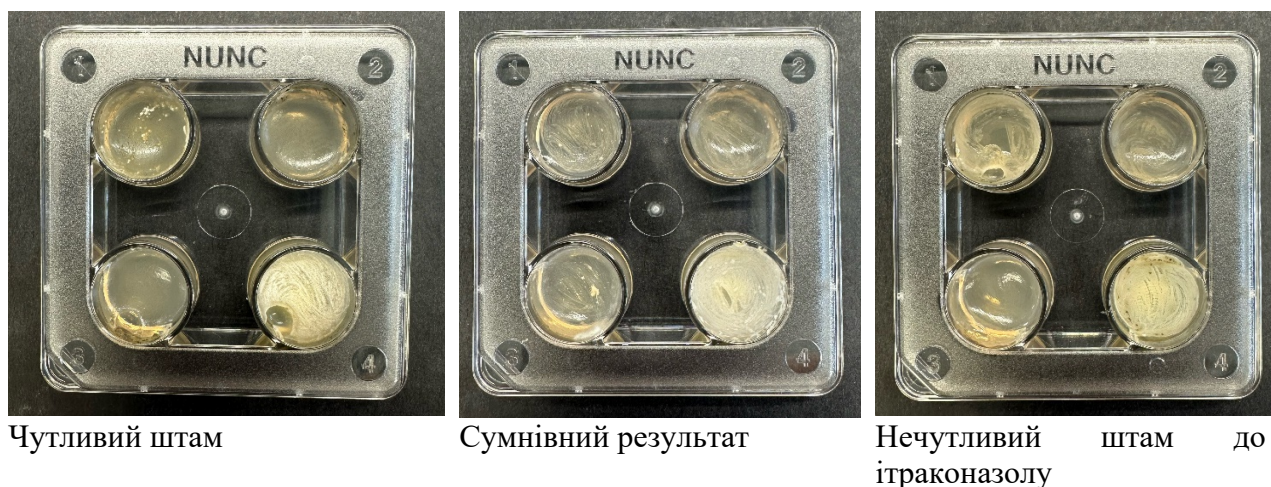


Рис. 2.16 Інтерпретація результатів скринінгового методу чутливості штамів EUCAST 10.2

Нечутливі штами були підтверджені за допомогою еталонного методу мікророзведення EUCAST 9.4 [131]. Тестування протигрибкової чутливості проводилося з такими протигрибковими препаратами в заданих діапазонах концентрацій: ітраконазол (0,015–8 мг/л, Sigma-Aldrich Química, Мадрид, Іспанія), вориконазол (0,015–8 мг/л, Sigma-Aldrich Química, Мадрид, Іспанія), позаконазол (0,015–8 мг/л, Sigma-Aldrich Química, Мадрид, Іспанія) та ізавуконазол (0,015–8 мг/л; Sigma-Aldrich Química, Мадрид, Іспанія).

A. flavus ATCC 204304 і *A. fumigatus* ATCC 204305 використовували як штами контролю якості в усіх проведених тестах. Планшети інкубували при 35 °C і через 48 годин оцінювали мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) для ітраконазолу, вориконазолу, позаконазолу та ізавуконазолу. Для визначення резистентності використовували клінічні контрольні точки EUCAST [132].

2.2.3. Генотипування та характеристика молекулярних механізмів стійкості клінічних ізолятів *A. fumigatus* до азолів.

Усі штами були генотиповані відповідно до методу типування TRESPERG для диференціації штамів *A. fumigatus* і їх генотипу за допомогою чотирьох

маркерів, які представляють ділянки з повторюваними кодуючими послідовностями, даний метод описаний раніше [133, 134].

Було проаналізовано послідовності *sur51A* у стійких до азолів ізолятів *A. fumigatus*. Молекулярні механізми резистентності до азолів були вивчені шляхом ампліфікації та секвенування повної послідовності *sur51A*, включаючи його промотор, для штамів, які були стійкі принаймні до одного азолу. Ген *sur51A*, включаючи його промотор, ампліфікували та секвенували, як описано раніше та в рис. 2.17. [135].

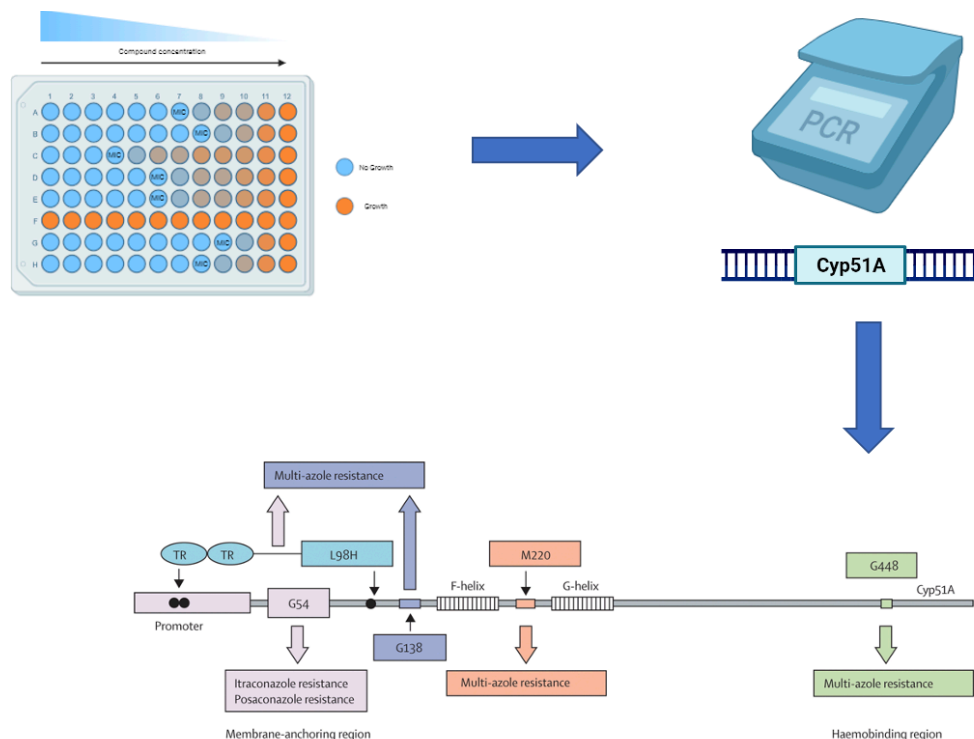


Рис. 2.17. Схематичне зображення аналізу гену *Cyp51A* у стійких до азолів ізолятів *A. fumigatus*

На всіх етапах генотипування відбувався контроль згідно загальноприйнятої методики гелевого електрофорезу. Гель-електрофорез — це лабораторна процедура поділу ДНК, що надає змогу визначити приблизну довжину фрагмента ДНК, провівши його на агарозному гелі поряд зі сходами ДНК (набір фрагментів ДНК відомої довжини). У даному дослідженні використовувався 1,5% агарозний гель на основі TAE, з додаванням бромід етидію (EtBr) до кінцевої концентрації приблизно 0,2-0,5 мкг/мл. Вивчення результатів відбувалося після додавання зразків ДНК та завантаження гелю в пристрій для електрофорезу під напругою 80V протягом 30-35 хв. Після чого

відбувалося вивчення та аналіз отриманих результатів

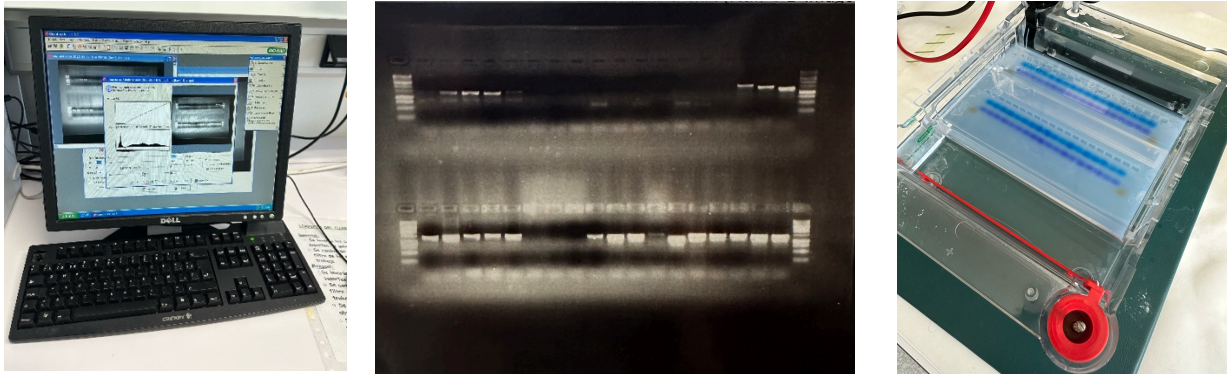


Рис. 2.18. Проведення гелевого електрофорезу

2.3 Методи статистичної обробки матеріалів дослідження

Числові результати підлягали статистичній обробці за загальноприйнятими методами. Первинну базу даних створювали та редагували в пакеті «Microsoft Excel». Для статистичної обробки використовували стандартний пакет прикладних програм для медико-біологічних досліджень (STATISTICA 6,0). Застосовували метод варіаційного аналізу, що включав визначення середньої арифметичної (M), середньої похибки середнього арифметичного ($\pm m$), медіани та моди. Результати вважали достовірними при значеннях $p < 0,05$, а високодостовірними – при $p < 0,01$.

Окрім цього, використовували методи варіаційної статистики для оцінки різниці між частотами появи ознак у серіях досліджень, а також порівняння середніх величин та середньоквадратичних відхилень. Для оцінки вірогідності різниці між показниками двох сукупностей використовували t -критерій Стьюдента.

Середні величини (M) обчислювали за формулою 2.1:

$$M' = \frac{M^1 + M^2 + \dots + M^N}{N}, \quad (2.1)$$

де N – кількість спостережень.

Середню квадратичну помилку вибіркового середнього визначали за формулою 2.2:

$$m = R/B \quad (2.2)$$

де R – розмах, різниця між максимальною та мінімальною величинами:

$M_{\max} - M_{\min}$;

B – коефіцієнт, значення якого визначається числом спостережень отримані величини виражали як $M \pm m$.

Оцінка вірогідності різниці шляхом визначення t-критерію Стьюдента за формулою 2.3:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}} \quad (2.3)$$

При невеликій кількості об'єктів ($n < 30$) для оцінки різниці між частотами використовували формули для розрахунку середньої квадратичної помилки та нормованого відхилення. Вірогідність (P), відповідну знайденому значенню t, визначали за табл.ми.

РОЗДІЛ 3

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗИСТЕНТНОСТІ ЗБУДНИКІВ ГРИБКОВИХ ІНФЕКЦІЙ, ВИДІЛЕНИХ ВІД ХВОРИХ ТА З НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

Широке використання протигрибкових препаратів останніми роками супроводжується зростанням кількості стійких штамів мікроорганізмів. Це може мати серйозні наслідки для пацієнтів, інфікованих штамами грибів, стійких до протигрибкових препаратів, через обмеження терапевтичних можливостей. Проблема формування стійкості грибів до антимікотичної терапії може мати різні причини, однак, основною з них є формування резистентності "*in vivo*" внаслідок тривалого лікування протигрибковими препаратами. Разом з тим, не можна виключати можливості формування резистентності "*de novo*" – формування резистентності внаслідок впливу на штам фунгіцидних засобів у сільському господарстві.

Насамперед, нашим завданням було з'ясувати питання поширення антимікотикорезистентних штамів грибів серед збудників грибкових інфекцій, виділених від хворих та з навколишнього середовища. Об'єктом дослідження було обрано *A. fumigatus*, враховуючи його високу поширеність у навколишньому середовищі та високий відсоток виділення даного збудника від хворих. Крім того, останні наукові дослідження свідчать про зростання резистентності *A. fumigatus* до протигрибкових препаратів у всьому світі [8,10-18].

3.1. Чутливість клінічних ізолятів *A. fumigatus* до протигрибкових препаратів та характеристика їх молекулярних механізмів резистентності

За період з лютого 2022 по лютий 2024 року було досліджено 378 клінічних штамів *A. fumigatus*, виділених від хворих, які перебували на лікуванні в лікарні Universitario 12 de Octubre (Мадрид, Іспанія). Скринінг чутливості до протигрибкових препаратів проводився відповідно до еталонного методу EUCAST 10.2 [129]. За результатами експериментальних досліджень було зареєстровано 19 не чутливих штамів *A. fumigatus*. МПК визначалася методом мікророзведення згідно стандарту EUCAST 9.4, який в свою чергу підтвердив,

що 3,40% (n=13) ізолятів *A. fumigatus* були стійкими до азолів. Із загальної кількості клінічних стійких ізолятів *A. fumigatus* 100% (n=13) зразків виявилися стійкими до ітраконазолу, 30,76% (n=4) – до вориконазолу, 69,2% (n=9) – до позаконазолу і 46,15% (n=6) – до ізавуконазолу (табл. 3.1). У чотирьох резистентних штамів було виявлено мутацію TR34/L98H в гені *sur51A*, яку пов'язують зі стійкістю до азолів, дані зразки виявилися панрезистентними. У дев'яти інших резистентних зразків відмічена відсутність мутації в гені *sur51A* і вони проявляли стійкість лише до позаконазолу та/або ітраконазолу.

Серед 13 клінічних резистентних штамів було зареєстровано 11 різних генотипів TRESPERG. Було виявлено 2 штами з мутацією *Sur51A* TR34/L98H, які характеризувалися однаковим генотипом TRESPERG (t04Bm1.1c09e05) та мали прояви панрезистентності до азолів. Також було виявлено в двох клінічних резистентних ізолятів WT (дикий тип) *sur51A* один генотип TRESPERG (t03m1.1c08Be07), однак, один з цих зразків мав резистентність до посаконазолу та ізавуконазолу в той час як інший зразок - ні. Всі інші клінічні резистентні ізоляти належали до різних генотипів TRESPERG (табл. 3.1).

Табл. 3.1.

Перелік резистентних клінічних штамів *A. fumigatus* до IZ, VZ, PZ, ISV та зв'язок мутації в гені *sur51A*

Дата виділення	n	ITR	VOR	POS	ISV	Ген <i>sur51A</i>	Генотип TRESPERG
21/6/2022	1	R	S	S	S	WT	t01m3.4c05Ae15
14/3/2022	1	R	S	R	S	WT	t01m3.4c20e11
23/2/2023	1	R	R	R	R	TR34/L98H	t02m1.1c09e05
7/3/2022	1	R	S	R	S	WT	t02m1.1c09e15
13/4/2022	1	R	S	S	S	WT	t03m1.1c08Ae07
30/3/2022	2	R	S	R/S	R/S	WT	t03m1.1c08Be07
13/4/2022							
14/2/2023	1	R	S	R	S	WT	t03m1.1c19e07
4/3/2022	1	R	S	R	S	WT	t04Am5.5c03e13
30/3/2022	2	R	R	R	R	TR34/L98H	t04Bm1.1c09e05
10/1/2023	1	R	R	R	R	TR34/L98H	t04Bm1.2c08Ae07
28/10/2022	1	R	S	S	S	WT	t04Am3.4c08Ae07

Примітка: ITC — Ітраконазол; VRC — Воріконазол; POS — Посаконазол; ISA — Ізавуконазол; жирним шрифтом позначено резистентні значення

Під час дослідження генотипу TRESPERG у 365 чутливих клінічних штамів *A. fumigatus* було виявлено 60 комбінацій генотипу TRESPERG, які повторювалися в кількох зразках. Загальна кількість чутливих штамів, з принаймні двома повтореннями одного і того ж генотипу TRESPERG, становила 61,36% (n=224) серед 365 чутливих клінічних штамів *A. fumigatus*. У даних штамів було зареєстровано 12 різних генотипів TRESPERG, кожен з яких повторювався в п'яти та більше штамів, що відображено в таблиці 3.2. Інші ж 48 генотипів TRESPERG реєструвалися від 2 до 4 штамів.

Табл. 3.2.

Генотипи TRESPERG у чутливих до протигрибкових препаратів клінічних штамів *A. fumigatus* з 5 і більше повторами

Генотип TRESPERG	n	%
t03m1.1c08Ae07	19	8,48%
t03 m1.1c10e06	12	5,35%
t02m1.3c09e11	9	4,02%
t01m1.1c08Ae07	8	3,57%
t03m1.1c08Be09	7	3,13%
t01m1.1c05Ae07	6	2,67%
t01m5.3c08Ae07	6	2,67%
t01m5.4c06e07	6	2,67%
t02m1.5c09e15	6	2,67%
t02m6.3c08Be13	6	2,67%
t01m3.4c22e15	5	2,23%
t03m1.1c05Ae09	5	2,23%

Серед чутливих клінічних штамів було зареєстровано генотипи TRESPERG, які були унікальними та не повторювалися в інших штамів і склали 38,64% (n=141) серед 365 чутливих клінічних штамів *A. fumigatus*.

При порівнянні генотипів TRESPERG чутливих та резистентних клінічних ізолятів було виявлено 3 спільні генотипи. Під час проведення дослідження, у штамів із генотипом TRESPERG (t02m1.1c09e05) було зареєстровано мутацію в гені *cyp51A* TR34/L98H, для інших двох генотипів TRESPERG (t03m1.1c08Be07, t03m1.1c08Ae07) ізолятів був виявлений дикий тип *cyp51A* (WT) (табл. 3.3).

Табл. 3.3.

Спільні генотипи TRESPERG у резистентних і чутливих клінічних ізолятів *A. fumigatus*

Генопит TRESPERG	n	ITC	VRC	POS	ISA	Ген <i>sur51A</i> для R зразків
t03m1.1c08Be07	4 (2R/2S)	R/S	S	R/S	S	WT
t02m1.1c09e05	4 (1R/3S)	R/S	R/S	R/S	R/S	TR34/L98H
t03m1.1c08Ae07	20 (1R/19S)	R/S	S	R/S	S	WT
Всього 3 типи TRESPERG						28 зразків

Примітка: ITC — Ітраконазол; VRC — Воріконазол; POS — Посаконазол; ISA — Ізавуконазол; R – резистентні значення; R/S – в зразках присутні і чутливі і резистентні значення; S – чутливі значення

Аналіз частоти реєстрації однакових генотипів TRESPERG серед чутливих та резистентних штамів *A. fumigatus* дав змогу встановити певні закономірності їх формування у часовому еквіваленті (рис. 3.1). На представленому графіку зображено зміну генотипів TRESPERG у штамів *A. fumigatus* з різними рівнями резистентності протягом часового періоду з січня 2022 до січня 2024 року. Фіолетові точки позначають дикі типи (WT), сині - резистентні штами з мутацією TR34/L98H, а зелені - чутливі штами (Sensibles). Відзначено три генотипи: t03m1.1c08Ae07, t02m1.1c09e05, та t03m1.1c08Be07, кожен з яких демонструє свою динаміку в рамках періоду дослідження.

Графік показує певні закономірності, пов'язані зі стійкістю штамів. Зокрема, у даному дослідженні початково було зареєстровано резистентні штами з генотипами TRESPERG (t03m1.1c08Ae07 та t03m1.1c08Be07) після чого через місяць уже було зареєстровано чутливі штами з даними генотипами, що вказує на поступову втрату стійкості. Така динаміка свідчить про нестабільність резистентних мутацій у цих генотипах, що може бути пов'язано з умовами середовища або селективним тиском.

З іншого боку, резистентні штами з генотипом TRESPERG t02m1.1c09e05 виявлено після первинного виявлення чутливого штаму, і через декілька місяців відбувається повторне виявлення чутливого штаму. Що, в свою чергу, може бути ознакою нестійкості резистентності штамів з даним генотипом або вказувати на наявність зовнішніх факторів, які сприяють поверненню чутливості штамів з цим генотипом.

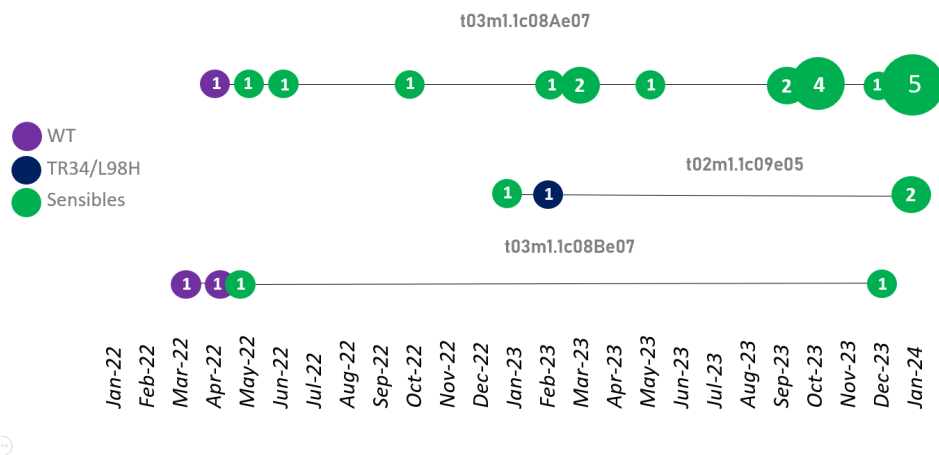


Рис. 3.1. Найпоширеніші генотипи TRESPERG стійких і чутливих штамів клінічних зразків.

Отже, на підставі одержаних результатів дослідження можна зробити висновок, що клінічні ізоляти *A. fumigatus* в цілому характеризуються вираженою резистентністю до лікарських препаратів групи азолів, водночас, деякі штами демонструють панрезистентність до даних препаратів. Крім того, встановлено різні генетичні характеристики стійких і чутливих штамів *A. fumigatus*, що може свідчити про різноманітність шляхів поширення резистентності.

3.2. Чутливість ізолятів з навколишнього середовища *A. fumigatus* до протигрибкових препаратів та характеристика їх молекулярних механізмів резистентності

Із навколишнього середовища було відібрано 446 зразків *A. fumigatus*, серед яких 10,98% (n=49) характеризувались резистентністю до протигрибкових препаратів. Зокрема, у 97,95% (n=48) стійких штамів виявлено резистентність до ітраконазолу, вориконазолу та ізавуконазолу, в той час як у 91,84% (n=45) – до позаконазолу; результати наведені у таблиці 3.4.

Генетичний аналіз гену *sur51A* дав змогу встановити, що 12 ізолятів мали дикий тип (WT), тоді як у 37 зразків було зареєстровано мутацію TR34/L98H і всі зразки із зазначеною мутацією демонстрували фенотип панрезистентності.

Серед 49 досліджених резистентних ізолятів з навколишнього середовища було виявлено 5 різних варіацій TRESPERG. У 33 з 37 ізолятів з мутацією TR34/L98H був зареєстрований однаковий тип TRESPERG (t02m1.1c09e05).

Водночас, п'ять із 12 стійких ізолятів з диким типом (WT) *sup51A* мали інший тип TRESPERG (t03m1.1c08Ae08). Також було виявлено в 5 резистентних ізолятів WT (дикий тип) *sup51A* один генотип TRESPERG (t03m1.1c08Ae08), однак, лише один із п'яти зразків був чутливим до ітраконазолу, вориконазолу та ізавуконазолу, тоді як чотири з п'яти зразків виявились чутливими до посаконазолу. Результати наведені у таблиці 3.4.

Табл. 3.4.

Перелік резистентних штамів з навколишнього середовища *A. fumigatus* до IZ, VZ, PZ, ISV та зв'язок мутації в гені *sup51A*

Дата виділення	n	ITR	VOR	POS	ISV	Ген <i>sup51A</i>	Генотип TRESPERG
11/4/2022 17/5/2022 13/6/2022	33	R	R	R	R	TR34/L98H	t02m1.1c09e05
17/5/2022	2	R	R	R	R	TR34/L98H	t02m1.1c09e16
17/5/2022	6	R	R	R	R	WT	t03m1.1c05Ae07
28/2/2022 17/5/2022	5	4R/1S	4R/1S	1R/4S	4R/1S	WT	t03m1.1c08Ae08
13/6/2022	1	R	R	R	R	WT	t04Am1.3c08Be07
11/4/2022	1	R	R	R	R	TR34/L98H	t04Bm1.2c08Ae07
21/8/2023	1	R	R	R	R	TR34_L98H	t04bm1.2c20e06

Примітка: TC — Ітраконазол; VRC — Вориконазол; POS — Посаконазол; ISA — Ізавуконазол; R – резистентні значення; R/S – в зразках присутні і чутливі і резистентні значення; S – чутливі значення

За результатом експериментальних досліджень генотипів TRESPERG 49 чутливих штамів до антимікотиків, які виділені з навколишнього середовища, зареєстровано 9 комбінацій генотипу TRESPERG, які повторювалися у двох або більше ізолятів (табл. 3.5). Разом з тим, 55,08% (n=27) з 49 за даними характеристиками виявились унікальними.

Табл. 3.5.

Генотипи TRESPERG у чутливих до протигрибкових препаратів штамів з навколишнього середовища *A. fumigatus*

Генотип TRESPERG	n	%
t02m1.2c09e05	5	10,20%
t04Am1.2c08Ae15	5	10,20%
t04Am1.3c08Be07	4	8,16%
t05m1.3c03e13	3	6,12%

t03m1.1c08Ae07	2	4,08%
t03m1.1G09e07	2	4,08%
t03m1.3c08Ae07	2	4,08%
T04am5.5G03e11	2	4,08%
t11m2.5c08Ae16	2	4,08%
Всього	27	55,08%

Під час дослідження ізолятів *A. fumigatus*, виділених із навколишнього середовища, було зареєстровано один генотип TRESPERG (t04Am1.3c08Be07) у одного резистентного (WT) та у чотирьох чутливих штамів. Слід підкреслити, що резистентний ізолят був виділений у червні 2022 року, тоді як чутливі до антимікотиків штами були виявлені у лютому 2023 року. Також було виділено 2 резистентних штами з навколишнього середовища з мутацією TR34/L98H в гені *sur51A* та один чутливий ізолят з навколишнього середовища з однаковим генотипом TRESPERG (t02m1.1c09e16).

Отже, отримані нами дані свідчать про значну частку резистентних штамів *A. fumigatus* (10,98%), виділених з навколишнього середовища. Більшість з них проявляють стійкість до кількох протигрибкових препаратів, що може свідчити про поширення мультирезистентності в природному середовищі. Разом з тим, виявлення спільного генотипу TRESPERG (t04Am1.3c08Be07) для резистентного і чутливих штамів у різні періоди часу може вказувати на потенційний зв'язок між цими популяціями.

3.3. Порівняльний генетичний аналіз чутливих і резистентних штамів *A. fumigatus*, виділених від хворих та з навколишнього середовища

На даному етапі дослідження ми також намагалися встановити зв'язок поширення резистентності *A. fumigatus* до антимікотичних препаратів з місцем виділення штамів. Всього у дослідженні було використано 824 штами *A. fumigatus*, при чому, 378 з них (46%) складали клінічні ізоляти, а 446 (54%) були виділені з навколишнього середовища (табл. 3.6).

Табл. 3.6.

Характеристика штамів *A. fumigatus* в залежності від місця виділення

	Зразки навколишнього середовища	з Клінічні зразки	Разом
Загальна кількість <i>A. fumigatus</i>	446 (54%)	378 (46%)	824

Кількість резистентних <i>A. fumigatus</i> (% до загальної кількості <i>A. fumigatus</i> з даної локалізації)			
– WT	12 (2,69%)	9 (2,35%)	21
– TR34/L98H	37 (8,29%)	4 (1,05%)	41
Загальна кількість резистентних <i>A. fumigatus</i> (% до загальної кількості <i>A. fumigatus</i> з даної локалізації)	49 (10,98%)	13 (3,40%)	62

В результаті дослідження методом мікророзведень за стандартом EUCAST 9.4 було встановлено значну різницю в рівнях резистентності до азолів серед клінічних ізолятів *A. fumigatus* 3,44% (n=13 із 378) та ізолятів, отриманих із навколишнього середовища 10,98% (n=49 із 446). Одержані дані доводять, що кількість резистентних штамів у навколишньому середовищі в 3 рази вища ніж у клінічних ізолятів. До всіх видів азолів ізоляти з навколишнього середовища мали вищий відсоток резистентності ніж у клінічних штамів. Це може свідчити про те, що штами грибів з навколишнього середовища значно частіше проявляють множинну резистентність.

Під час дослідження всіх 378 клінічних штамів стало відомо, що загальний відсоток резистентних ізолятів становив 3,44% (n=13 із 378). В свою чергу, серед даної групи ізолятів у 2,35% (n=9) штамів встановлено відсутність мутації в гені *sur51A*, в той час як у 1,05% (n=4 із 378) ізолятів зареєстровано мутацію TR34/L98H.

За результатами дослідження всіх 446 штамів з навколишнього середовища стало відомо, що загальний відсоток резистентних ізолятів становив 10,98% (n=49 із 446). В свою чергу, серед даної групи ізолятів у 2,69% (n=12 із 446) штамів встановлено відсутність мутації в гені *sur51A*, в той час як у 8,29% (n=37 із 446) ізолятів зареєстровано мутацію TR34/L98H.

Під час дослідження було зареєстровано 62 резистентні штами *A. fumigatus*, серед яких були клінічні ізоляти та ізоляти з навколишнього середовища. У 66,13% випадків (n=41 з 62) було виявлено мутацію TR34/L98H у гені *Sur51A*. Зокрема, серед клінічних ізолятів цей тип мутації зустрічався у 6,46% випадків (n=4 з 62), тоді як серед ізолятів з навколишнього середовища частота мутації становила 59,67% (n=37 з 62).

Водночас, відсутність мутації в гені *Cyp51A* спостерігалася у 33,87% випадків (n=21 з 62). З них клінічні ізоляти становили 14,52% (n=9 з 62), тоді як ізоляти з навколишнього середовища мали частоту відсутності мутації на рівні 19,35% (n=12 з 62).

Дослідження генотипування TRESPERG дозволило ідентифікувати 266 різних типів із загальної кількості 476 генотипованих ізолятів (98 ізолятів з навколишнього середовища та 378 клінічних штамів). Разом з тим, слід відмітити, що серед клінічних ізолятів (230 генотипів) у порівнянні з ізолятами з навколишнього середовища (35 генотипів) відмічається зростання числа різних генотипів TRESPERG. Однак, цей результат може бути зумовлений генотипуванням значно більшої кількості клінічних ізолятів у порівнянні з ізолятами з навколишнього середовища.

Під час проведення дослідження щодо різноманітності генотипів TRESPERG резистентних клінічних зразків було зареєстровано 4.13% (n=11) різних генотипів із 266 всіх генотипів TRESPERG, зафіксованих у даному дослідженні. В той час як у резистентних штамів, отриманих з навколишнього середовища, цей показник становив 2.63% (n=7) з 266 всіх генотипів TRESPERG.

При порівнянні генотипів TRESPERG серед резистентних клінічних ізолятів та штамів з навколишнього середовища, було встановлено два однакових генотипи: генотип TRESPERG (t02m1.1c09e05) (був ідентифікований в одному клінічному резистентному ізоляті та в 33 штаммах, отриманих з навколишнього середовища) і генотип TRESPERG (t04Bm1.2c08Ae07) (одноразово виявлявся в клінічному ізоляті та штамі з навколишнього середовища).

Експериментальні генетичні дослідження, спрямовані на виявлення генотипу TRESPERG у клінічних ізолятів чутливих до азолів, дали змогу зареєструвати наявність 60 комбінацій генотипів TRESPERG, що становить 47,05% (n=224) із 476 генотипованих ізолятів (98 із навколишнього середовища та 378 клінічних), які повторювалися у кількох штамів і мали щонайменше два повторення одного і того ж генотипу TRESPERG. Без дублікатів це становило 29,62% (n=141) з усіх 476 генотипів TRESPERG.

Під час дослідження генотипу TRESPERG у чутливих до азолів ізолятів з навколишнього середовища, було виявлено 9 комбінацій генотипів TRESPERG, що становить 5.67% (n=27) з 476 генотипованих ізолятів (98 із навколишнього середовища та 378 клінічних). Ці комбінації були виявлені у кількох зразках, які мали щонайменше два повторення одного і того ж генотипу TRESPERG. Без дублікатів залишилося 4.62% (n=22) з усіх 476 генотипів TRESPERG.

Проведені експерименти дозволили виявити 10 генотипів TRESPERG серед чутливих до азолів клінічних штамів та ізолятів з навколишнього середовища (табл. 3.7), що становить 5.8% (n=38) із 476 генотипованих ізолятів. Загалом, слід відмітити, що клінічні ізоляти демонструють більшу кількість ідентичних генотипів, в той час як ізоляти з навколишнього середовища характеризуються максимум двома повтореннями одного і того ж генотипу TRESPERG.

Табл. 3.7.

Частота реєстрації однакових генотипів TRESPERG у чутливих клінічних штамів *A. fumigatus* та ізолятів з навколишнього середовища

Клінічні зразки	Генотипи TRESPERG	Зразки з навколишнього середовища
6	t01m5.4c06e07	1
1	t02m1.1c09e16	2
1	t02m6.1c08Ae11	1
5	t03m1.1c05Ae09	1
2	t03m1.1c08Ae09	1
2	t03m1.1c08Ae11	1
4	t03m1.1c09e07	2
1	t03m1.3c08Ae07	2
4	t03m1.3c08Ae09	1
1	t04Am3.4c17e11	1

Під час порівняння різноманітності генотипів TRESPERG клінічних штамів та ізолятів з навколишнього середовища, було виявлено, що серед чутливих штамів *A. fumigatus* клінічного походження спостерігається більша генотипова різноманітність порівняно зі штамми з навколишнього середовища.

При порівнянні всіх чутливих і резистентних штамів *A. fumigatus* було встановлено, що серед чутливих штамів *A. fumigatus* спостерігалася більша генотипова різноманітність TRESPERG порівняно зі стійкими штамми: 93,2%

(n=247) були чутливими генотипами TRESPERG (S), тоді як лише 6,8% (n=18) належали до стійких генотипів TRESPERG (R).

У межах дослідження було проведено аналіз на наявність однакових генотипів TRESPERG між резистентними та чутливими клінічними штамами та ізолятами із навколишнього середовища (табл. 3.8).

Табл. 3.8.

Частота реєстрації однакових генотипів TRESPERG поміж чутливих та резистентних клінічних штамів *A. fumigatus* та ізолятів із навколишнього середовища

Клінічні зразки		Генотип TRESPERG	Зразки з навколишнього середовища	
Резистентні	Чутливі		Резистентні	Чутливі
-	-	t02m1.1c09e16	2 TR34/L98H	1
1 TR34/L98H	3	t02m1.1c09e05	33 TR34/L98H	-
1 WT	19	t03m1.1c08Ae07		2
-	4	t03m1.1c05Ae07	6 WT	-
-	1	t03m1.1c08Ae08	5 WT	-
2 WT	2	t03m1.1c08Be07	-	-
-	3	t04Am1.3c08Be07	1 WT	4

Водночас, вивчаючи генотип TRESPERG (t02m1.1c09e05) було визначено, що він являється найпоширенішими серед ізолятів із навколишнього середовища. З іншого боку, мутація в гені *sur51A* TR34/L98H, яка наявна як у клінічних, так і в резистентних ізолятів з навколишнього середовища з генотипом TRESPERG (t02m1.1c09e05) асоціюється з панрезистентністю до азолів. Разом з тим, зареєстровані три чутливі до азолів клінічні штами з даним генотипом. Один з них виділений за місяць до ідентифікації резистентного зразка, а інші два чутливі клінічні ізоляти були виділені рівно через рік (рис. 3.2).

Під час експериментального дослідження було виявлено, що генотип TRESPERG (t03m1.1c08Ae07) є найпоширенішими серед клінічних ізолятів та асоціюється з низьким рівнем резистентності до азолів. Водночас, (t03m1.1c08Ae08) демонструє змішану чутливість, перший клінічний ізолят, виділений у квітні 2022 року, реєструвався як резистентний (рис. 3.2). Ізоляти з генотипом TRESPERG (t04Am1.3c08Be07) без мутацій у *sur51A* демонструють меншу кількість повторень і частіше асоціюються з чутливими ізолятами (рис. 3.2). Водночас, генотип TRESPERG (t03m1.1c08Be07) було ідентифіковано у

чотирьох клінічних ізолятів: спочатку серед двох резистентних, а згодом – серед двох із чутливим профілем до азолів (рис. 3.2).

У генотипах TRESPERG t03m1.1c05Ae07 та t03m1.1c08Ae08 спочатку переважно виділялися резистентні ізоляти з навколишнього середовища. Згодом було виявлено чутливі клінічні ізоляти з даними генотипами TRESPERG (рис. 3.2).

Генотип TRESPERG t02m1.1c09e16 спочатку реєструвався серед резистентних ізолятів, виділених із навколишнього середовища. У подальшому, цей генотип також було зафіксовано у чутливого ізолята, отриманого з навколишнього середовища, що може свідчити про можливі механізми адаптації або зміни в профілі чутливості до азолів (рис. 3.2).

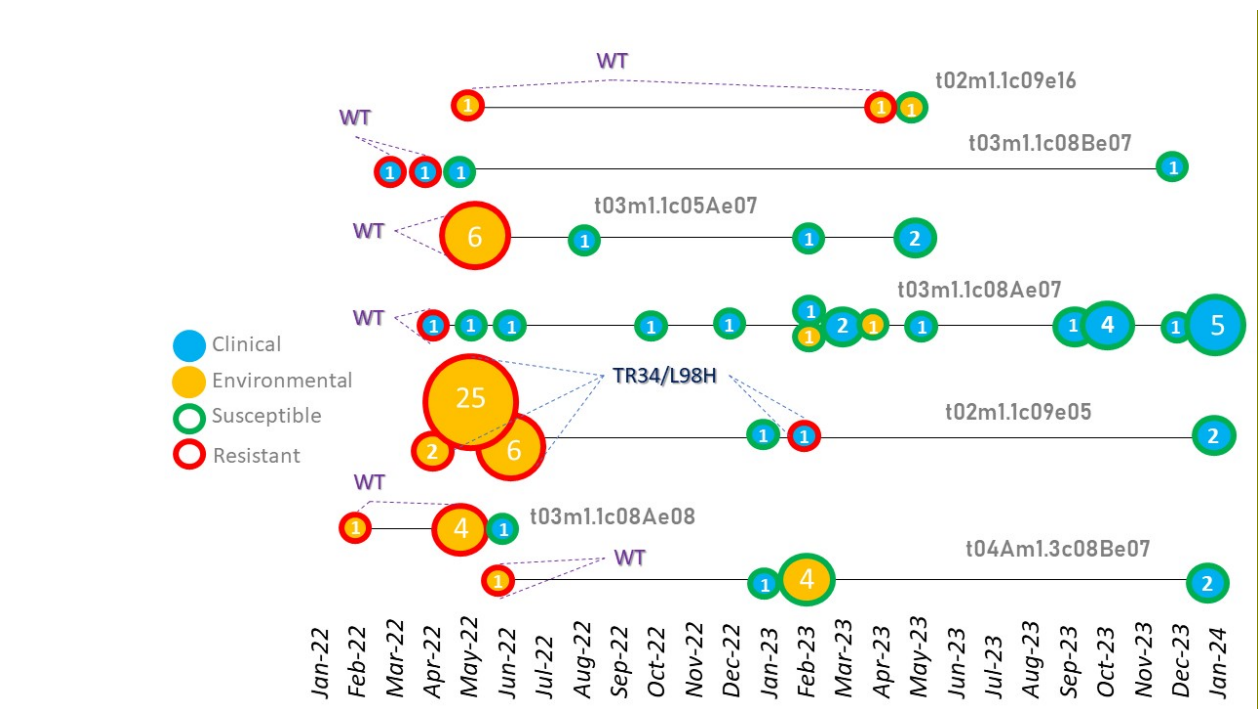


Рис. 3.2. Зареєстровані генотипи TRESPERG серед резистентних і чутливих клінічних штамів та ізолятів із навколишнього середовища.

Наведений рисунок детально ілюструє часову динаміку серед клінічних штамів та ізолятів із навколишнього середовища, різноманітність штамів за генотипами TRESPERG, профіль резистентності та чутливості до азолів. Це дозволяє глибше зрозуміти механізми поширення резистентності, генетичну адаптацію, а також специфіку популяції *A. fumigatus*.

Таким чином, узагальнюючи отримані результати щодо чутливості, різноманітності генотипу TRESPERG та наявності мутації в гені *sur51A*, можна виділити ключові позиції (табл. 3.9).

- Серед резистентних клінічних штамів та ізолятів із навколишнього середовища переважають повторення однакових генотипів TRESPERG у ізолятах із навколишнього середовища.
- Серед резистентних клінічних штамів та ізолятів із навколишнього середовища, при групуванні однакових генотипів TRESPERG за WT і TR34/L98H у гені *sur51A*, переважають ізоляти із навколишнього середовища з мутацією TR34/L98H.
- Серед чутливих клінічних штамів та ізолятів із навколишнього середовища повторення однакових генотипів TRESPERG частіше зустрічається у клінічних штамів.
- Серед резистентних клінічних штамів та ізолятів із навколишнього середовища, при групуванні окремих генотипів за WT і TR34/L98H у гені *sur51A*, переважають WT клінічні штами.

Табл. 3.9.

Характеристика клінічних зразків *A. fumigatus* та ізолятів із навколишнього середовища в залежності від місця виділення, чутливості, різноманітності генотипів TRESPERG

Тип штаму	Чутливість штамів	Загальна кількість штамів	Кількість штамів з індивідуальним генотипом TRESPERG		Кількість штамів із повторюваним генотипом TRESPERG	
Штами з навколишнього середовища	Чутливі	Nt=49 (100%)	N=22 (44,90%)		N=27 (8 генотипи TRESPERG) (55,10%)	
	Резистентні	Nt=49 (100%)	N=3 (6,12%)		N=46 (4 генотипи TRESPERG) (93,88%)	
			WT	TR34/L98H	WT	TR34/L98H
			N=1 (2,04%)	N=2 (4,08%)	N=11 (2 генотипи TRESPERG) (22,45%)	N=35 (2 генотипи TRESPERG) (71,43%)
Клінічні штами	Чутливі	Nt=365 (100%)	N=141 (38,63%)		224 (60 генотипи TRESPERG) (61,37%)	
	Резистентні	Nt=13 (100%)	N=9 (69,23%)		N=4 (2 генотипи TRESPERG) (30,77%)	

			WT	TR34/L98H	WT	TR34/L98H
			N=7 (53,86%)	N=2 (15,38%)	N=2 (1 генотипи TRESPERG) (15,38%)	N=2 (1 генотипи TRESPERG) (15,38%)

Отже, представлені в розділі результати експериментальних досліджень свідчать про виражену генетичну різноманітність серед резистентних і чутливих клінічних ізолятів *A. fumigatus*. Мутація TR34/L98H у гені *cyp51A*, яка раніше була типовою для ізолятів із навколишнього середовища, все частіше виявляється у клінічних штамів і асоціюється з панрезистентністю до азолів. Це підкреслює важливість генетичного аналізу для моніторингу клінічних штамів мікроорганізмів. Водночас, деякі клінічні штами демонструють змішаний профіль резистентності, що може свідчити про поступову адаптацію до протигрибкових препаратів.

Хочемо підкреслити, що у ізолятів із навколишнього середовища частка резистентних штамів була вдвічі вищою, ніж у клінічних і становила 10,98%. За даними нашого дослідження у значної частини резистентних до азолів ізолятів *A. fumigatus* із навколишнього середовища була виявлена мутація TR34/L98H у гені *cyp51A*, що підтверджує її ключову роль у формуванні панрезистентності. Більшість ізолятів з мутацією TR34/L98H належать до одного генотипу TRESPERG (t02m1.1c09e05), що може вказувати на поширення конкретного клону резистентного штаму в природному середовищі.

Мутація TR34/L98H у гені *cyp51A* є домінуючим механізмом резистентності серед ізолятів *A. fumigatus*, вона була зареєстрована у 66,13% (n=41 з 62) усіх резистентних ізолятів. Однак, її розподіл нерівномірний між клінічними та ізолятами з навколишнього середовища: 6,46% (n=4 з 62) та (59,67%, n=37 з 62) відповідно. Це свідчить про те, що мутація TR34/L98H є основним фактором резистентності до азолів, особливо в ізолятів із навколишнього середовища. Водночас, наявність резистентних ізолятів без мутації в *cyp51A* як у клінічних, так і в ізолятах із навколишнього середовища, свідчить про існування інших механізмів резистентності, які потребують подальшого дослідження.

В цілому, ізоляти з навколишнього середовища демонструють меншу генетичну різноманітність у порівнянні з клінічними штамами, але наявність одного генотипу TRESPERG у чутливих і резистентних ізолятів не виключає того факту, що штами з навколишнього середовища можуть бути джерелом поширення резистентності серед клінічних варіантів через інфікування пацієнтів штамами із зовнішнього середовища.

Не виключено, що використання азолів у сільському господарстві, зокрема у складі пестицидів, може сприяти формуванню резистентності у мікроорганізмів грибкової природи. Очевидно ці хімічні речовини можуть мати селективний тиск, сприяючи виживанню штамів із мутацією TR34/L98H, яка забезпечує панрезистентність до азолів. Цілком очевидно, що згодом ці штами можуть інфікувати пацієнтів. Крім того, виявлення клінічних ізолятів у навколишньому середовищі свідчить про можливість зворотного поширення штамів від пацієнтів до навколишнього середовища, що створює небезпеку формування циклічного процесу обміну резистентними штамами. Таким чином, зменшення використання азолів у сільському господарстві, а також активний моніторинг взаємозв'язку між клінічним та навколишнім середовищами є критично важливими для запобігання подальшому поширенню мультирезистентних штамів *A. fumigatus*.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Hrynzovska A., & Bobyr, V. (2024). NEW STRATEGIES IN COMBATING FUNGAL PATHOGENS. Medical Science of Ukraine (MSU), 20(2), 115-125. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.2.2024.14>
2. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2023) Формування механізмів перехресної резистентності *A. fumigatus* за рахунок хімічної подібності азольних антимікотиків та фунгіцидів. Україна. Здоров'я нації, № 3, 27-33. <https://doi.org/10.32782/2077-6594/2023.3/04>
3. Гринзовська, А., & Бобир, В. (2023). Сучасні погляди на проблему антимікотикорезистентності штамів грибів родів *Fusarium* та *Aspergillus* в розрізі

концепції One Health. Український науково-медичний молодіжний журнал, 141(3), 103-111. [https://doi.org/10.32345/USMYJ.3\(141\).2023.103-111](https://doi.org/10.32345/USMYJ.3(141).2023.103-111)

4. Coubani AO, editor. Pulmonary Aspergillosis: A Comprehensive Guide to the Disease Spectrum and Advances in Diagnosis and Management. 1st ed. Cham: Springer; 2024. XVIII, 356 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-76524-7>

5. Two and a half year monitoring of fungi in ambient air: Is airborne *A. fumigatus* a health hazard?/ Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and Virulence in Human Fungal Pathogens, La Colle sur Loup, France (збірка матеріалів науково-практичної закордонної конференції з міжнародною участю), 18-24 травня 2024 р. 168 ст.

6. Профілактичні заходи та методи боротьби із збудником *A. fumigatus* у різних сферах діяльності людини/ Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 13 березня 2024 р. 92-94 ст.

7. Сучасні підходи до вивчення типів модифікацій у генотипі та їхній вплив на поширення резистентних штамів *A. fumigatus* в пацієнтів та у навколишньому середовищі (2023). науково-практична конференція з міжнародною участю до 100-річчя кафедри гігієни, безпеки праці та професійного здоров'я НМУ імені О.О. Богомольця та всесвітнього дня безпеки пацієнтів 2023 року «Актуальні проблеми безпеки і гігієни лікарень, персоналу. Український науково-медичний молодіжний журнал, 140(3), 97. <https://doi.org/10.32345/USMYJ.SUPPLEMENT.3.2023.1-114>

8. Технологія DectiSomes: новий напрямок у лікуванні грибкових інфекцій / III Науково-практична міжнародна дистанційна конференція «МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ В СУЧАСНІЙ МЕДИЦИНІ» 24 березня 2023 року

9. Механізми резистентності до азолів та глобальне поширення стійких штамів *Aspergillus fumigatus*/ Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 15 березня 2023 р. 84-85 ст.

РОЗДІЛ 4

ХАРАКТЕРИСТИКА ЧУТЛИВОСТІ ТА ДИНАМІКИ ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ГРИБІВ РОДУ *CANDIDA* ДО ПРОТИГРИБКОВИХ ПРЕПАРАТІВ НЕМЕДИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

Розвиток резистентності до антимікотиків у грибів роду *Candida* не тільки ускладнює лікування грибкових інфекцій, але й створює ризик розповсюдження мультирезистентних штамів. Актуальність цієї проблеми підсилюється тим, що багато азольних препаратів, які широко використовуються у медицині для лікування кандидозу, також застосовуються як фунгіциди у рослинництві. Це породжує питання про можливість формування перехресної резистентності до препаратів групи азіолів, які використовуються у медичній та аграрній сфері.

Дослідження, проведені в цьому розділі, спрямовані на вивчення чутливості клінічних штамів *Candida spp.* до немедичних протигрибкових препаратів, які використовуються у сільському господарстві. Метою є встановлення залежності між хімічною структурою фунгіцидів та ступенем стійкості грибів до них, а також дослідження потенційного впливу цих препаратів на структурно-морфологічні зміни у *Candida spp.* Результати цих досліджень є важливими для подальшого розуміння механізмів формування резистентності та розробки ефективних підходів до контролю грибкових інфекцій як у медичній, так і в аграрній галузях.

4.1 Чутливість клінічних штамів *Candida spp.* до фунгіцидів немедичного призначення

У даній частині дослідження вивчали видові та штамові відмінності в чутливості *Candida spp.* до найбільш поширених сільськогосподарських фунгіцидів, які включають похідні 1,2,4-триазолу (дифеноконазол, тебуконазол, флутріяфол, пропіконазол) та імідазолу (імазаліл, прохлораз).

Дослідження відбувалося шляхом вивчення клінічних ізолятів трьох видів: *C. albicans*, *C. krusei* та *C. glabrata*. Вимірювали мінімальну фунгіцидну концентрацію (МФцК), за якої гриби гинули під впливом різних фунгіцидів. Для порівняння використовували клінічні ізоляти та референс-штами кожного виду. Показники, що демонструють МФцК, представлені в табл. 4.1.

Табл. 4.1

Характеристика мінімальної фунгіцидної концентрації (МФцК) $X \pm \sigma$
(мг/мл) чутливості *Candida spp.* до фунгіцидів

Мікроорганізми	Дифеноконазол	Тебу-коназол	Флутрі-афол	Пропі-коназол	Імазаліл	Прохлораз
	Мінімальна фунгіцидна концентрація (МФцК) $X \pm \sigma$ (мг/мл)					
<i>C. albicans</i> DSM 1386	0,63±0	0,31±0	1,3±0	0,2±0	0,63±0	1,25±0
<i>C. albicans</i> (n=10)	0,45±0,04	0,3±0,03	0,41±0,06	0,09±0,01	0,26±0,03	1,68±0,11
<i>C. krusei</i> RN 7106	0,63±0	0,31±0	0,63±0	0,8±0	0,63±0	10,0±0
<i>C. krusei</i> (n=5)	0,81±0,09	0,23±0,04	0,3±0,05	0,27±0,07	0,30±0,06	8,0±0,65
<i>C. glabrata</i> YI99	2,5±0	0,14±0	2,5±0	0,2±0	0,63±0	10,0±0
<i>C. glabrata</i> (n=5)	6,21±0,89	0,23±0,01	7,83±0,84	0,17±0,01	2,92±0,03	7,21±0,97

Отримані результати свідчать про видові та штамові відмінності в чутливості *Candida spp.* до найбільш поширених фунгіцидів (похідні 1,2,4-триазолу (дифеноконазол, тебуконазол, флутріафол, пропіконазол) та імідазолу (імазаліл, прохлораз) (рис. 4.1).

Найбільш чутливими до дифеноконазолу виявились клінічні ізоляти *C. albicans*, для яких МФцК становила 447,9±38,7 мкг/мл (0,45±0,04 мг/мл), тоді як клінічні штами *C. krusei* мали меншу чутливість з МФцК на рівні 812,5±85,2 мкг/мл (0,81±0,09 мг/мл). Референс-штами обох цих видів демонстрували однакову чутливість до дифеноконазолу з МФцК 625 мкг/мл (0,63±0 мг/мл). Найменш чутливими виявились клінічні ізоляти *C. glabrata*, для яких МФцК дорівнювала 6208,3±889,1 мкг/мл (6,21±0,89 мг/мл), що перевищувало відповідні показники для *C. krusei* та *C. albicans* у 7,6 та 13 разів відповідно.

Найвищу чутливість до тебуконазолу продемонстрували штами *C. glabrata*, для яких мінімальна фунгіцидна концентрація (МФцК) становила 135,5±9,2 мкг/мл (0,14±0,01 мг/мл), тоді як клінічні ізоляти *C. krusei* та *C. albicans* гинули при концентраціях 234,4±37,3 мкг/мл (0,23±0,04 мг/мл) та 304,7±32,7 мкг/мл (0,3±0,03 мг/мл) відповідно.

Зафіксовано також різну чутливість кандид до флутріафолу – фунгіциду, який має структурну подібність до флуконазолу, воріконазолу та інших триазолів, що використовуються в медичній практиці. Найбільш чутливими до

флутріафолу виявились клінічні штами *C. krusei*, відомі своєю природною резистентністю до флуконазолу: вони гинули при середніх концентраціях флутріафолу $296,9 \pm 50,1$ мкг/мл ($0,3 \pm 0,05$ мг/мл), тоді як загибель *C. albicans* відбувалась при концентрації $414,1 \pm 60,9$ мкг/мл ($0,41 \pm 0,06$ мг/мл). Чутливість референс-штаму *C. albicans* DSM 1386 була значно меншою, ніж у клінічних ізолятів цього виду: загибель клітин відбувалась при концентрації флутріафолу 1250 мкг/мл ($1,25 \pm 0$ мг/мл), що втричі перевищувало показник для клінічних штамів. Найменшу чутливість до флутріафолу продемонстрували клінічні та референс-штами *C. glabrata*, знищення яких спостерігали при концентраціях $7833,3 \pm 840,4$ мкг/мл ($7,83 \pm 0,84$ мг/мл) та 2500 мкг/мл ($2,5 \pm 0$ мг/мл) відповідно, що перевищувало показники інших видів у понад 20 разів.

Дослідження чутливості представників роду *Candida* до пропіконазолу показало, що клінічні штами трьох досліджених видів гинули в присутності середніх мінімальних концентрацій, які варіювалися від *C. albicans* $88,3 \pm 8,2$ мкг/мл ($0,09 \pm 0,01$ мг/мл), до *C. glabrata* $170 \pm 13,6$ мкг/мл ($0,17 \pm 0,01$ мг/мл) та *C. krusei* $270,0 \pm 66,9$ мкг/мл ($0,3 \pm 0,05$ мг/мл). Примітно, що референс-штами кожного з досліджуваних видів виявились більш стійкими до пропіконазолу, про що свідчать показники мінімальної фунгіцидної концентрації (МФцК).

При визначенні чутливості грибів роду *Candida* до імазалілу не було виявлено значущих міжвидових відмінностей, оскільки мінімальні згубні концентрації для клінічних штамів коливались в межах від $260,4 \pm 28,6$ до $302,1 \pm 58,5$ мкг/мл, тоді як референс-штами гинули при концентрації 625 мкг/мл. Водночас референс-штами *Candida spp.* виявились менш чутливими до імазалілу (МФцК = $0,63$ мг/мл), тоді як клінічні ізоляти показали вищу чутливість, з МФцК у межах від $0,26 \pm 0,03$ до $0,30 \pm 0,06$ мг/мл незалежно від виду. Це дослідження має особливе значення, оскільки структурна формула імазалілу дуже близька до лікарських препаратів групи імідазолів, які застосовують для лікування мікозів, таких як міконазол, ізоконазол та еконазол.

Штами всіх досліджених видів *Candida* характеризувалися високою стійкістю до прохлоразу, при цьому було зафіксовано міжвидові відмінності в чутливості до цього фунгіциду. Найвищу активність прохлораз проявляв до

C. albicans, що підтверджується даними МФцК на рівні $1687,5 \pm 116,6$ мкг/мл ($1,68 \pm 0,11$ мг/мл) для клінічних штамів та 1250 мкг/мл (1,25 мг/мл) для референс-штаму. Відповідні показники МФцК для *C. krusei* та *C. glabrata* були в 4,7 та 4,3 рази вищими для клінічних ізолятів і в 8 разів вищими для референс-штамів відповідно.

Згідно з отриманими результатами, штами всіх досліджених видів *Candida* мали найвищу стійкість до дії прохлоразу, фунгіциду класу імідазолів, у порівнянні з іншими протигрибковими препаратами (рис.4.1).

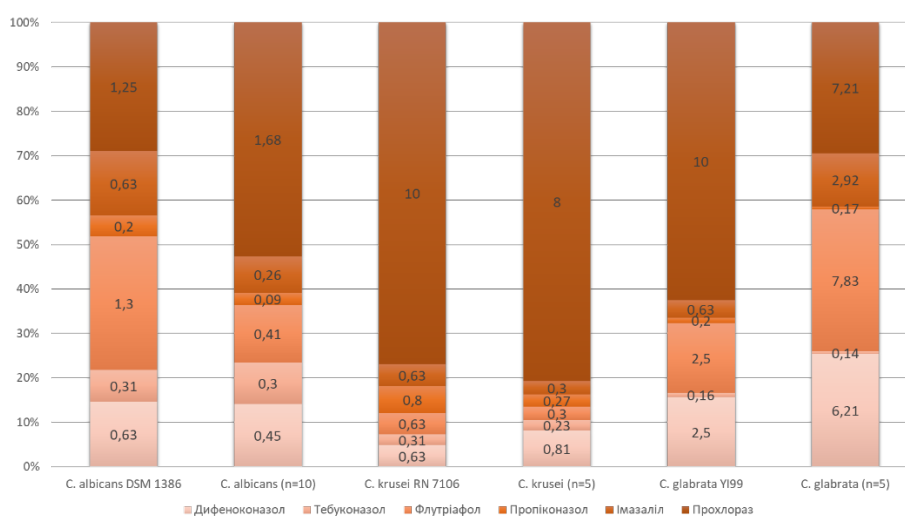


Рис. 4.1. Характеристика мінімальної фунгіцидної концентрації (МФцК) $X \pm \sigma$ (мг/мл) чутливості *Candida spp.* до сільськогосподарських фунгіцидів.

Отже, чутливість грибів роду *Candida* до фунгіцидів залежить від видових і штамових особливостей мікроорганізмів. Зокрема, клінічні штами *C. albicans* показали найвищу чутливість до 1,2,4-триазолу пропіконазолу та водночас найбільшу стійкість до прохлоразу. Штами *C. krusei* і *C. glabrata* продемонстрували найвищу чутливість до тебуконазолу, при цьому *C. krusei* показали найвищу стійкість до прохлоразу, а *C. glabrata* – до флутриафолу. Достовірної різниці у чутливості музейних штамів та клінічних ізолятів до даних препаратів не встановлено.

4.2. Формування резистентності у клінічних штамів кандид до фунгіцидів немедичного призначення в умовах експерименту

Наступний етап досліджень передбачав вивчення можливості адаптації кандид до фунгіцидів в умовах експерименту. Для роботи було обрано два клінічних штами *C. albicans* та по одному штаму *C. krusei* та *C. glabrata*. При їх

відборі керувались наступними критеріями: стабільність результатів вихідних МФцК щодо певного штаму в усіх серіях дослідження чутливості та типові для виду морфологічні і культуральні властивості.

Встановлено, що культивування *Candida spp.* у поживних середовищах з фунгіцидами призводить до змін їх чутливості, і цей процес залежить як від штамових та видових особливостей, так і від хімічної структури препарату. Зокрема, ізоляти *C. albicans* під час адаптації змінювали свою чутливість до тебуконазолу, імазалілу та прохлоразу: чутливість до тебуконазолу та прохлоразу незначно знижувалася, при цьому мінімальна фунгіцидна концентрація (МФцК) зростала вдвічі, тоді як чутливість до імазалілу знижувалася значно — у 8 разів, що свідчить про виражене формування резистентності до цього препарату (Табл. 4.2).

Незначні штамові відмінності виявляли під час адаптації культур до флутріяфолу: для *C. albicans* 77 не вдалося сформувати резистентність до цього препарату, тоді як стійкість штаму *C. albicans* 1 після 12 пасажів незначно зросла, а МФцК збільшувалась у 2 рази. Більш істотні штамові відмінності спостерігали при формуванні резистентності до дифеноконазолу та пропіконазолу: від формування високорезистентних популяцій, чутливість яких зменшувалась у 4 рази, до відсутності результату після 10 або 12 пасажів. На підставі представлених результатів можна зробити висновок, що обидва клінічні штами *C. albicans* не сформували стійкої резистентності до імазалілу, хоча резистентність формувалась найбільш активно саме до цього препарату (табл. 4.2).

Табл. 4.2

Формування резистентності до фунгіцидів у клінічних штамів *C. albicans*

Назва препарату	МФцК вихідна (мг/мл)		МФцК пасажування (мг/мл)		Кількість пасажів		Зростання стійкості (n разів)	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Дифеноконазол	0,31	0,31	1,25	0,31	10	12	4	-
Тебуконазол	0,63	0,31	1,25	0,63	10	12	2	2
Флутріяфол	1,25	0,63	1,25	1,25	10	10	-	2
Пропіконазол	0,05	0,05	0,05	0,20	10	10	-	4
Імазаліл	0,08	0,08	0,63	0,63	10	12	8	8
Прохлораз	1,25	1,25	2,50	2,50	10	12	2	2

Примітка: 1 - клінічний штаб *C. albicans* 77; 2 клінічний штаб *C. albicans* 1.

Виявлені видові відмінності у формуванні резистентності до фунгіцидних препаратів у *Candida* з групи *non-albicans*. Пасажування *C. glabrata* у поживних середовищах із фунгіцидами призводило до формування резистентності до триазолів пропіконазолу та тебуконазолу, що підтверджувалось зростанням мінімальних фунгіцидних концентрацій (МФЦК) цих сполук у 16 та 8 разів відповідно. Резистентність до сполук, до яких *C. glabrata* була спочатку мало чутливою (дифеноконазол, прохлораз), формувалась повільніше, зі збільшенням МФЦК у 2 рази, тоді як до флутріафолу вона не формувалась взагалі, що підтверджується незмінними показниками МФЦК. У процесі адаптації до імазалілу, вираженої резистентності не було досягнуто: навіть після 10 пасажів загибель мікроорганізмів відбувалась при концентраціях препарату, що лише вдвічі перевищували вихідні показники (табл. 4.3).

Табл. 4.3

Формування резистентності до фунгіцидів у *C. glabrata* та *C. krusei*

Назва препарату	МФЦК вихідна (мг/мл)		МФЦК після пасажування (мг/мл)		Кількість пасажів		Зростання стійкості (в п разів)	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Дифеноконазол	10,0	1,25	20,0	10,0	10	16	2	8
Тебуконазол	0,16	0,08	1,25	2,50	10	16	8	32
Флутріафол	10,0	0,08	10,0	5,0	10	16	-	64
Пропіконазол	0,20	0,20	3,20	3,20	10	10	16	16
Імазаліл	0,31	0,08	0,63	1,25	10	14	2	16
Прохлораз	10,0	5,0	20,0	5,0	10	16	2	-

Примітка: 1 - *C. glabrata* 91 ; 2 - *C. krusei* B.

Пасажування *C. krusei* у присутності фунгіцидів супроводжувалось формуванням стійкості до всіх препаратів, за винятком прохлоразу (група імідазолів). Найбільш виражена резистентність спостерігалась до тебуконазолу та флутріафолу, при цьому, мінімальна фунгіцидна концентрація (МФЦК) збільшувалась у 32 та 64 рази відповідно. Процес адаптації до пропіконазолу та імазалілу призводив до зростання стійкості у 16 разів, а до дифеноконазолу — у 8 разів.

Аналіз динаміки формування стійкості до фунгіцидів у різних видів *Candida spp.* показав певні особливості цього процесу. У штамів *C. albicans* часто

спостерігалось значне зниження чутливості після одного-двох пасажів культури, що супроводжувалося наступною "сенсibiliзацією" штаму до фунгіциду на наступні два пасажі, що підтверджувалось зменшенням МФцК порівняно з вихідними даними. Як приклад, подібні особливості динаміки змін фунгіцидних концентрацій в процесі адаптації *C. albicans* до протигрибкових препаратів наочно демонструє рис. 4.2.

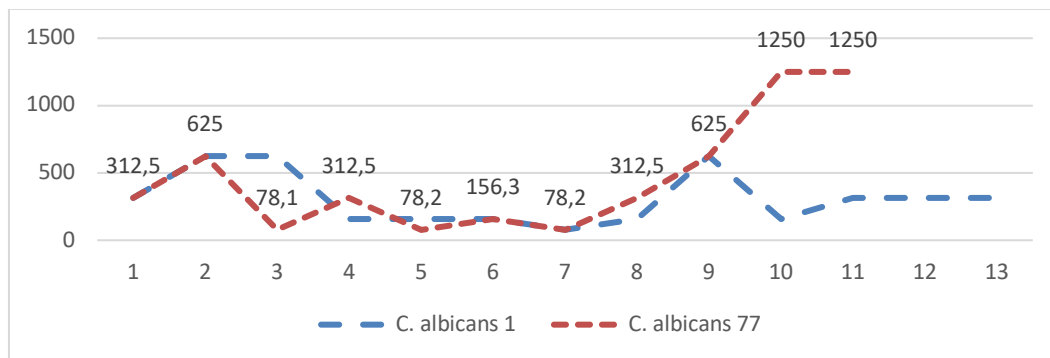


Рис. 4.2. Динаміка адаптації штамів *C. albicans* до дифеноконазолу

Примітка: перше значення МФцК (312,5 мкг/мл) вихідна чутливість штамів *C. albicans* до дифеноконазолу

У процесі пасажування *C. albicans* з фунгіцидом на 7-8 пасажі часто спостерігалось сповільнення росту культури та дисоціація культуральних властивостей популяцій, що проявлялося утворенням нетипових колоній менших розмірів, напівпрозорих і з в'язкою консистенцією (рис. 4.3.А). Подальші пасажі призводили до поступового підвищення мінімальної фунгіцидної концентрації (МФцК) та зникнення "малих" культуральних форм, однак сповільнення росту культури до 48 годин зберігалось. Такі зміни зазвичай відзначали при пасажуванні культур у присутності фунгіцидів, до яких не вдалося сформувати стійкі популяції, або якщо адаптована культура збільшувала свою стійкість не більше ніж удвічі. У *C. krusei* уповільнення росту та поява малих культуральних форм відбувались пізніше, після 9-10 пасажу, тоді як у *C. glabrata* ці зміни з'являлися у п'ятій-шостій субпопуляції клітин під постійним впливом фунгіциду (рис. 4.3 Б-В).

А

Б

В

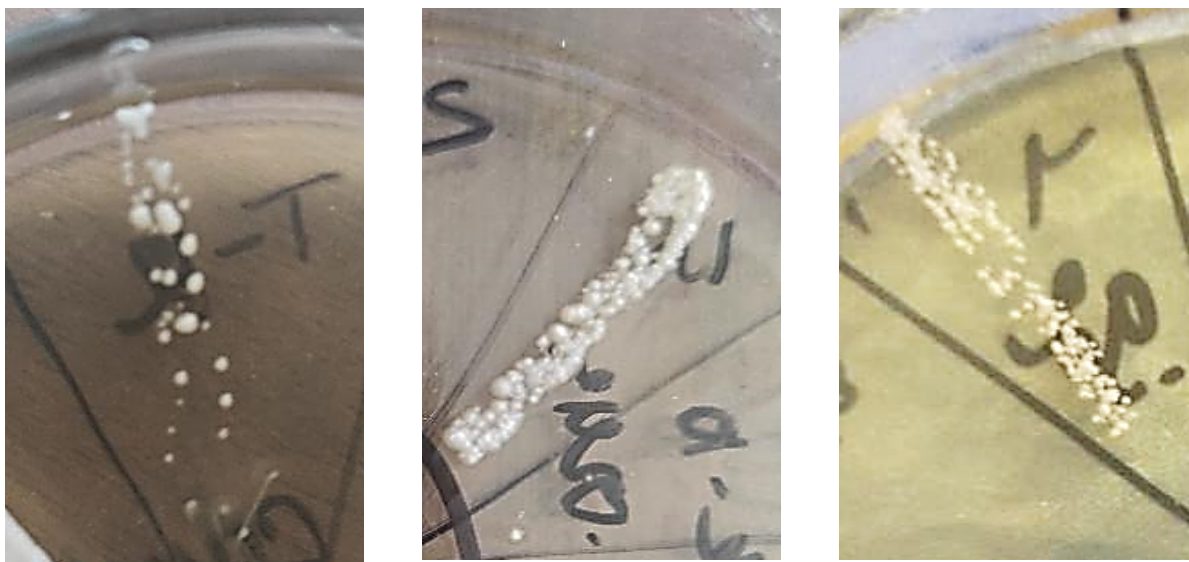


Рис. 4.3. “Малі” культуральні форми кандид, які утворювались внаслідок адаптації грибів до фунгіцидних препаратів.

Примітка: А. *C. albicans*; Б. *C. krusei*; В. *C. glabrata*.

Тривале пасажування *C. albicans* та *C. glabrata* призводило до поступового "виснаження" популяцій, що обмежувало подальше формування резистентності у цих культур. На 11-12 пасажах навіть у контрольних пробірках без фунгіциду спостерігали уповільнення росту, а на 14-15 пасажах ріст адаптованих до фунгіцидів кандид не реєструвався ні в дослідних, ні в контрольних зразках. Через це процес адаптації для штамів цих видів обмежувався 10-12 пасажами. Винятком стала *C. krusei*, для якої пасажування продовжували до 20-го пасажу, але починаючи з 12-15 пасажу досягалося стійке підвищення мінімальної фунгіцидної концентрації (МФцК), яке більше не зростало при подальших пасажах.

Таким чином, результати експериментальних досліджень дають можливість стверджувати, що процес адаптації мікроорганізмів роду *Candida* до фунгіцидних пестицидів залежить як від штамових та видових особливостей, так і від хімічної структури препаратів. Зокрема, *C. krusei* швидко формує стійкість до всіх сполук, крім прохлоразу, тоді як *C. glabrata* набуває стійкості до триазолів, таких як тебуконазол і пропіконазол, а *C. albicans* стає резистентною до імазалілу, представника групи імідазолів.

Аналіз динаміки формування стійкості у різних видів *Candida spp.* показав, що у *C. albicans* часто спостерігається значне зниження чутливості після одного-

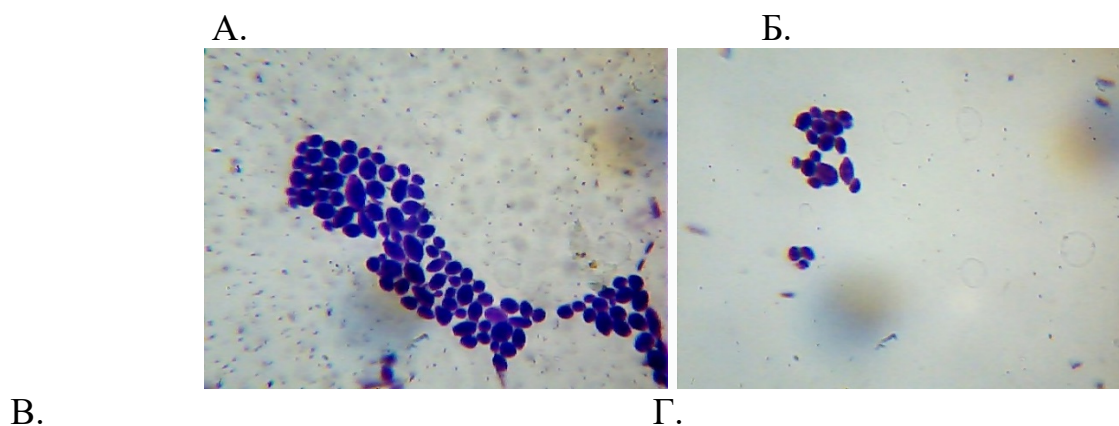
двох пасажів, з подальшою сенсibiliзацією штаму до фунгіциду на наступні пасажі. Також процес адаптації може супроводжуватись уповільненням росту на 7-10 пасажах і появою нетипових колоній менших розмірів, напівпрозорих і з в'язкою консистенцією. На відміну від *C. krusei*, процес адаптації у *C. albicans* і *C. glabrata* супроводжується виснаженням популяцій та уповільненням їх росту.

Оскільки протигрибкові препарати, що використовуються в медичній практиці, мають схожу хімічну структуру з фунгіцидами, які застосовуються в сільському господарстві, не можна виключати можливості, що мікроорганізми, які адаптувались до фунгіцидів, будуть резистентними і до антимікотиків.

4.3. Структурно-морфологічні зміни грибів роду *Candida* в процесі штучного формування у них резистентності до азолів

У результаті експериментальних досліджень встановлено, що пасажування штамів *Candida spp.* в присутності сільськогосподарських фунгіцидів призводило до змін у чутливості культур мікроорганізмів, причому, ці зміни залежали від виду кандид та хімічної структури використаного фунгіциду.

Під час світлової мікроскопії вихідної культури *C. albicans* та штамів, резистентних до вказаних фунгіцидів, відмінностей у структурно-морфологічних особливостях не виявлено. У всіх випадках структурно-морфологічна картина відповідала характеристикам *C. albicans*: одноклітинні мікроорганізми з бластоспорами округлої, овальної, еліпсоїдної, циліндричної або яйцеподібної форми, довжиною від 10 до 20 мкм та шириною від 5 до 10 мкм (рис. 4.4). Електронно-мікроскопічно резистентні штами також не відрізнялись від вихідних.



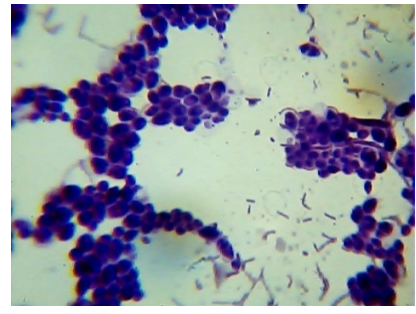
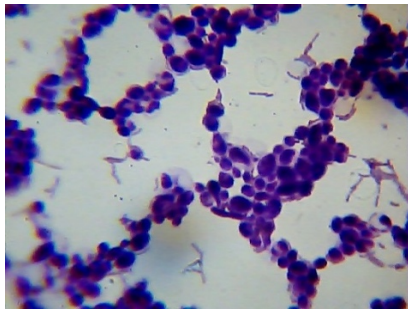
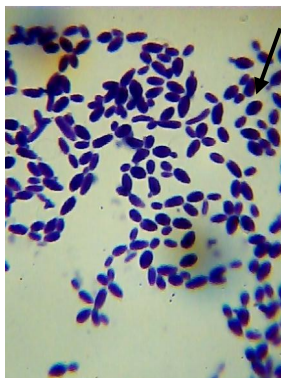


Рис. 4.4. Морфологія *C. Albicans*: А – резистентна до імазалілу; Б – мало резистентна до прохлоразу; В – резистентна до пропіконазолу; Г – – мало резистентна до флутриафолу. Світлова мікроскопія. Збільшення $\times 900$.

Порівнюючи структурно-морфологічні властивості вихідної популяції та резистентних штамів *C. krusei*, було встановлено деякі закономірності: на відміну від вихідної популяції, штами *C. krusei*, резистентні до флутриафолу та тебуконазолу, статистично частіше набували здатність утворювати гіфи або переходити в псевдогіфальний стан (рис. 4.5). У всіх інших випадках морфологічних особливостей порівняно з вихідним штамом не зафіксовано. Загалом, для *Candida spp.* характерні три морфотипи: дріжджі, гіфи та псевдогіфи, при цьому, гіфи та псевдогіфи іноді асоціюють з ниткоподібним ростом [32, 33]. Представлені на рис. 4.5 Б-В псевдогіфи відрізняються від гіф своєю розгалуженою структурою. Хоча псевдогіфальний ріст зазвичай спостерігається серед представників роду *Candida*, види, ступінь і частота, з якою різні види можуть переходити в псевдогіфальний стан, а також довжина та зовнішній вигляд псевдогіф можуть значно відрізнятися між видами. Нещодавно ниткоподібний ріст описаний також у високовірулентного грибового патогену *C. auris* [136,137].

А.



Б.



В.



Рис. 4.5. Морфологія *C. krusei*. А – вихідна культура. Б – резистентна до тебуконазолу; В – резистентна до флутриафолу. Стрілками показано гіфи. Світлова мікроскопія. Збільшення $\times 900$.

Серед *Candida spp.* лише деякі види здатні до морфологічного переходу між дріжджовими та ниткоподібними станами росту. Найбільш дослідженою є *C. albicans*, яка легко переходить між дріжджовими, псевдогіфальними та гіфальними формами в різноманітних умовах середовища [138]. Перехід між дріжджовими та псевдогіфальними станами у *C. krusei* описаний також іншими дослідниками, які часто розглядають такі властивості як прояв вірулентності [139]. У нашому дослідженні вперше показано, що ці властивості посилюються на фоні штучного формування резистентності до фунгіцидних препаратів.

Сучасні дослідження свідчать, що гіфальний стан сприяє глибокій колонізації тканин, покращує утворення біоплівки та захищає від макрофагів [36]. Гіфи *Candida* також виділяють кандидалізін – пептидний токсин, який пошкоджує мембрани епітеліальних клітин господаря та активує сигнальні шляхи в клітинах, що є критичним для вірулентності збудника [40]. Крім виявлених особливостей морфогенезу *C. krusei*, електронно-мікроскопічний аналіз не виявив структурно-морфологічних змін, які б супроводжували процес формування резистентності у цих мікроорганізмів.

Мікроскопічні дослідження бульйонної культури *C. glabrata* після 10 пасажів у середовищі з імазалілом та пропіконазолом показали, що клітини залишились у формі яйцеподібних, поодиноких або згрупованих клітин, які ділилися за допомогою осьового та біполярного брунькування (рис 4.6.). Водночас, на відміну від вихідної культури, у резистентних штамів *C. glabrata* інколи спостерігались мікробні клітини з ознаками форми гіф: витягнутий стан з рівномірною шириною та паралельними сторонами (рис. 4.6 Б-В). Загалом, після тривалого пасажування в присутності інгібуючих концентрацій антифунгальних засобів дані гриби зберегли свій початковий морфотип.

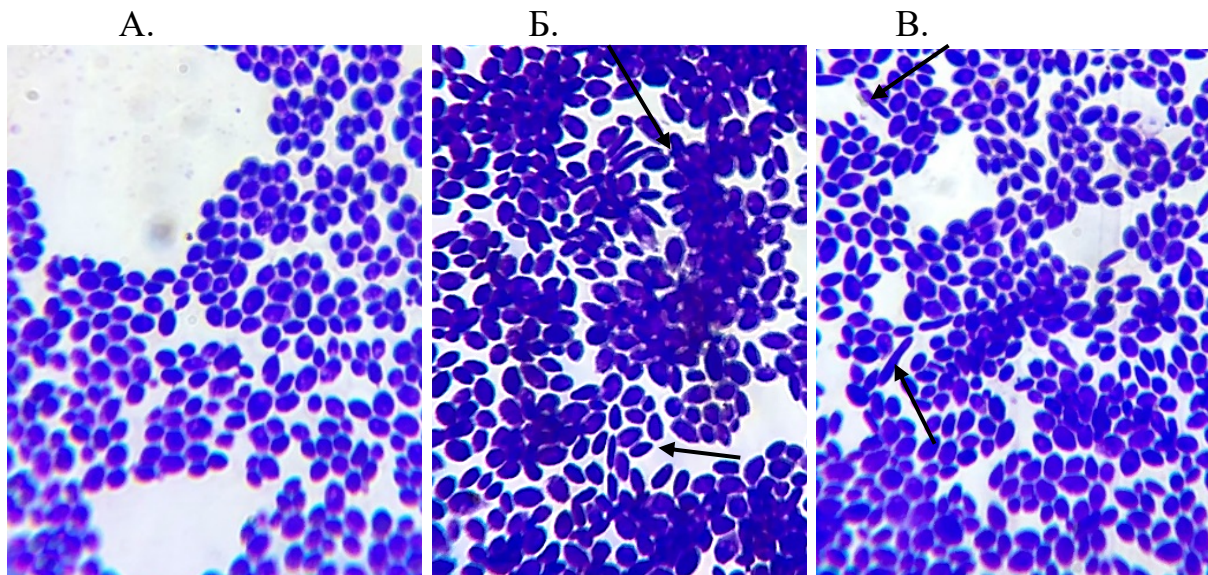


Рис. 4.6. Морфологія *C. glabrata*. А – вихідна культура. Б – штам, адаптований до імазаліла (чутливість зменшилась в 2 рази); В – штам, резистентний до пропіконазолу (фунгіцидна концентрація зросла в 16 разів). Стрілками показано гіфові форми грибів. Світлова мікроскопія. Збільшення $\times 900$.

Отримані експериментальні дані свідчать про зниження вірулентності або її повну втрату, коли поліморфні *Candida spp.* фіксуються в одному з морфотипів [40]. Це вказує на те, що специфічні функції кожного морфотипу безпосередньо впливають на загальну вірулентність цих поліморфних патогенів. Однак, серед представників роду *Candida* є види, що існують переважно в дріжджовій формі, але при цьому зберігають вірулентність. Наприклад, *C. glabrata* зазвичай має дріжджовий морфотип, але може бути високо вірулентною [43]. З нашого боку, можемо лише додати, що навіть після набуття різного рівня стійкості, *C. glabrata* залишилась переважно в дріжджовій формі, що є характерною рисою цього виду патогенів.

Вивчення морфології *C. glabrata* методом електронної мікроскопії показало типову для цього виду ультраструктурну організацію контрольних зразків вихідних штамів: клітини *C. glabrata* здебільшого мали сферичну форму, іноді траплялися поодинокі клітини, проте, частіше спостерігалися скупчення у вигляді коротких ланцюжків (рис. 4.7А). Розміри клітин вихідної популяції *C. glabrata* коливались від 2 до 4 мікрометрів.

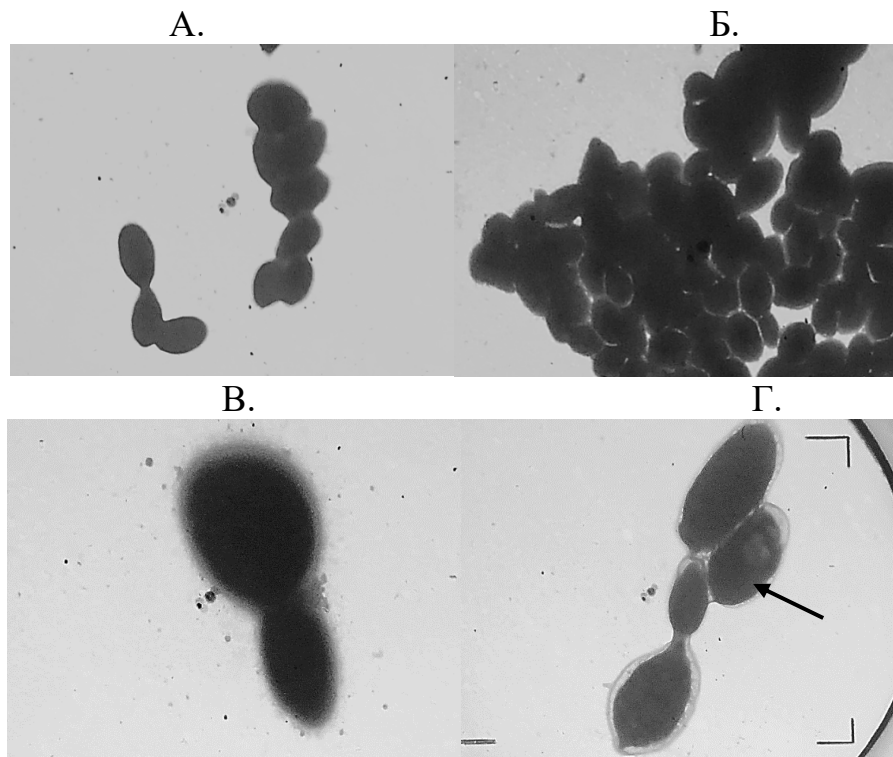


Рис. 4.7. Електронна мікроскопія. Вплив формування резистентності на ультраструктуру *C. glabrata*. А – Вихідна культура, $\times 3200$; Б – Зростання електронної щільності зовнішнього шару $\times 3200$; В – Відшаровування зовнішньої оболонки від цитоплазми $\times 6400$; Г – Нерівномірність розподілу органел $\times 4800$.

Електронна мікроскопія клітин *C. glabrata* після десятого пасажу в умовах формування резистентності до пропіконазолу виявила виражені структурно-морфологічні зміни у мікроорганізмів. Зокрема, спостерігалася підвищена електронна щільність зовнішнього шару, що на електроннограмах проявлялася просвітленнями по периметру зовнішньої оболонки (рис. 4.7Б). У деяких клітин фіксувалися сегментарні зміни оболонки з втратою її типової чіткої структури; оболонка набувала хвилястої форми і в окремих випадках відшаровувалася від цитоплазми (рис. 4.7В). Краї грибкових клітин ставали нечіткими, а цитоплазма мала строкату текстуру, ймовірно, через нерівномірний розподіл органел (рис. 4.7Г). Такі особливості морфології та ультраструктури клітин були характерними лише для штамів, резистентних до пропіконазолу і не спостерігалися у клітин, адаптованих до інших фунгіцидів.

Отже, результати експериментальних досліджень, представлені в даному розділі, свідчать про те, що чутливість грибів роду *Candida* до фунгіцидів залежить від видових і штамових особливостей мікроорганізмів. Зокрема,

клінічні штами *C. albicans* показали найвищу чутливість до 1,2,4-триазолу пропіконазолу та водночас найбільшу стійкість до прохлоразу. Штами *C. krusei* і *C. glabrata* продемонстрували найвищу чутливість до тебуконазолу, при цьому *C. krusei* показали найвищу стійкість до прохлоразу, а *C. glabrata* – до флутріяфолу.

Крім того, встановлено, що процес адаптації мікроорганізмів роду *Candida* до фунгіцидних пестицидів залежить як від штамових та видових особливостей, так і від хімічної структури препаратів. Зокрема, *C. krusei* швидко формує стійкість до всіх сполук, крім прохлоразу, тоді як *C. glabrata* набуває стійкості до триазолів, таких як тебуконазол і пропіконазол, а *C. albicans* стає резистентною до імазалілу, представника групи імідазолів.

Аналіз динаміки формування стійкості у різних видів *Candida spp.* показав, що у *C. albicans* часто спостерігається значне зниження чутливості після одного-двох пасажів з подальшою сенсibiliзацією штаму до фунгіциду на наступні пасажі. Також процес адаптації може супроводжуватись уповільненням росту на 7-10 пасажах і появою нетипових колоній менших розмірів, напівпрозорих і з в'язкою консистенцією. На відміну від *C. krusei*, процес адаптації у *C. albicans* і *C. glabrata* супроводжується виснаженням популяцій та уповільненням їх росту.

Водночас, отримані дані дозволяють припустити, що між формуванням резистентності і морфогенезом окремих видів грибів існує складний, можливо, еволюційний зв'язок. Якщо вплив морфогенезу мікроскопічних грибів на їх вірулентність є вже добре відомим і активно вивчається [36], то вплив тривалої дії протигрибкових препаратів на біологічні властивості *Candida* потребує подальшого, більш глибокого вивчення.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Hrynzovska A.A., Bobir V.V., Shirobokov V.P., Vovk I.M., Poniatovsky V.A., Nazarchuk O.A. (2025) ANTIFUNGAL THERAPY AND PESTICIDES: IS THERE A CONNECTION? Clinical and Preventive Medicine, №2(2025). Available from: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.2.2025.17>

2. Hrynzovska A, Bobyr V. Formation of resistance of *Candida* fungi to fungicidal drugs. USMYJ [Internet]. 2024Jun.27 [cited 2024Jul.4];146(2):60-7. Available from: <https://mmj.nmuofficial.com/index.php/journal/article/view/398>
3. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2024) STUDY OF THE SENSITIVITY OF *CANDIDA* ADAPTED TO FUNGICIDES TO MEDICAL ANTIFUNGAL DRUGS «Bulletin of problems biology and medicine», 2024 Issue 2, 173, 348-357 pages, index UDC 615.282.015.8:579.61. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2024-2-173-348-357>
4. Гринзовська А.А., Бобир В.В., Вовк І.М., Назарчук О.А. (2023) Структурно-морфологічні зміни грибів роду *Candida* в процесі штучного формування у них резистентності до азолів. Перспективи та інновації науки, №14(32), 941-955. [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14\(32\)-941-955](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14(32)-941-955)
5. Використання фунгіцидів у рослинництві як можливий шлях розвитку резистентності збудників мікозів людини / Міжнародна науково-практична конференція "Біологічні, медичні та науково-педагогічні аспекти здоров'я людини" 17-18.11.2022 р. м. Полтава
6. Використання імідазолів в особистій гігієні як один із можливих чинників виникнення резистентності мікозів людини до лікарських препаратів групи імідазолів / Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 16 березня 2022 р.
7. Стандартна операційна процедура з визначення ризиків в секторі санітарно-мікробіологічного та санітарно-вірусологічного дослідження / Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 17 березня 2021 р.
8. Передумови виникнення надзвичайних ситуацій медико-біологічного характеру в Україні / Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю) 11 березня 2020 р.

РОЗДІЛ 5

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО ПРОТИГРИБКОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ У ГРИБІВ РОДУ *CANDIDA* ПІСЛЯ ЇХ АДАПТАЦІЇ ДО ФУНГІЦИДНИХ ПРЕПАРАТІВ

Резистентність грибів до протигрибкових препаратів є однією з найактуальніших проблем сучасної медицини, яка потребує глибокого вивчення. Існує ймовірність, що ця резистентність може бути частково обумовлена широким використанням антимікотичних засобів не тільки в медицині, але й у сільському господарстві, де азольні фунгіциди, зокрема похідні триазолів і імідазолів, застосовуються найчастіше. Цей аспект має особливе значення, оскільки зростаюча стійкість до протигрибкових препаратів стає критичною проблемою для медицини та аграрної галузі.

На даному етапі досліджень ми намагались з'ясувати вплив процесу адаптації мікроскопічних грибів до азольних фунгіцидів на їхню чутливість до препаратів, які використовуються в медицині для лікування грибкових інфекцій, оскільки відомо, що протигрибкові препарати, похідні імідазолу та триазолу, незалежно від їх призначення, мають схожий механізм згубної дії на грибові клітини.

5.1. Хімічна спорідненість антимікотиків і фунгіцидів

Вивчення хімічної подібності між фунгіцидами та фармацевтичними препаратами має важливе значення для медицини, оскільки дозволяє оцінити їх ефективність, безпеку та можливі побічні ефекти. Порівняльний аналіз показав значну структурну подібність між молекулами пестицидів і медичних протигрибкових препаратів, що обґрунтовує вибір для дослідження аналогічних сполук із цих класів. Орієнтуючись на це, для дослідження було обрано фунгіциди та лікарські засоби з класів триазолів та імідазолів зі схожою хімічною структурою (табл. 5.1).

Табл. 5.1

Класифікація протигрибкових засобів, використаних у даному
дослідженні, за хімічною формулою

Групи	Фунгіциди (пестициди)	Лікарські протигрибкові препарати
-------	-----------------------	-----------------------------------

Триазоли	Флутріафол	Вориконазол Ізавуконазол Ітраконазол	Посаконазол Флуконазол
Імідазоли	Імазаліл	Біфоназол Еконазол Ізоконазол Кетоконазол Клотримазол	Міконазол Оксиконазол Омоконазол Сертаконазол Фентиконазол

Так звані «медичні» триазоли та імідазоли можуть містити різні функціональні групи та бічні ланцюги, що робить їх ефективними для лікування інфекційних процесів. У фунгіцидах триазоли та імідазоли зазвичай мають склад, спеціально адаптований для боротьби з грибовими хворобами рослин. Обидві групи азольних сполук, антимікотики та фунгіциди, містять азольні гетероциклічні кільця в своїй структурі, які взаємодіють з ферментами та біологічними процесами грибів, що відповідають за синтез ергостеролу та інші важливі функції. Ці сполуки інгібують синтез мембрани та клітинної стінки грибів, гальмуючи їхній ріст та розмноження.

Проводячи порівняльний аналіз досліджуваних сполук було виявлено, що молекули пестицидів (фунгіцидів) та лікарських протигрибкових препаратів з класу триазолів мають структурно подібні фрагменти. Аналогічно, молекули пестицидів (фунгіцидів) та фармпрепаратів з класу імідазолів також мають структурно подібні фрагменти. Порівняльний аналіз сполук вказує на певну хімічну подібність, але також враховує різницю у функціональних групах і механізмах дії. Було виокремлено кілька лікарських протигрибкових препаратів, які мають найбільшу та найменшу хімічну схожість з фунгіцидами, що може мати важливе значення для дослідження можливості формування перехресної резистентності та вибору ефективних засобів лікування (табл. 5.2).

Табл. 5.2.

Структурна подібність фунгіцидів та лікарських протигрибкових препаратів з класів триазолів та імідазолів

Хімічний клас	Пестициди (фунгіциди)	Фармпрепарати		
		Найбільш структурно подібні	Структурно подібні	Найменш структурно подібні

Триазолі	Флутріафол	Вориконазол Флуконазол Ізавуконазол	Посаконазол Ітраконазол	—
Імідазолі	Імазаліл	Міконазол Еконазол Ізоконазол	Кетоконазол Оксиконазол Фентиконазол Омоконазол Сертаконазол	Клотримазол Біфоназол

Подальшим етапом дослідження являлася оцінка європейських та українських протоколів і рекомендацій щодо лікарських засобів азольної групи для лікування захворювань, викликаних грибами роду *Candida spp.* та *Aspergillus spp.* Аналіз показав, що першою лінією терапії в європейській та українській практиці зазвичай використовуються певні азолові препарати, які ми, в свою чергу, розподілили згідно нашого дослідження щодо структурної подібності пестицидів та фунгіцидів. Дані представлені в таблиці 5.3.

Табл. 5.3.

Азольні лікарські препарати першої лінії терапії захворювань, викликаних грибами роду *Candida spp.* та *Aspergillus spp.*

Збудник	Азольні фармпрепарати першої лінії терапії		
	Найбільш структурно подібні	Структурно подібні	Найменш структурно подібні
<i>Candida spp.</i>	Вориконазол Флуконазол	Ітраконазол	—
<i>Aspergillus spp.</i>	Вориконазол Ізавуконазол	Посаконазол Ітраконазол	-

Відповідно до отриманих результатів можемо спостерігати, що у лікуванні захворювань, збудниками яких є гриби роду *Candida spp.* та *Aspergillus spp.*, використовуються лікарські препарати найбільшої структурної подібності та структурно подібні, в той час як найменш структурно подібні не використовуються, що може бути черговим підтвердженням наявності перехресної резистентності між клінічними ізолятами грибів та штамами, виділеними з навколишнього середовища.

Враховуючи те, що фармацевтичні препарати першої лінії лікування грибкових захворювань у людей мають високу структурну подібність із аналогічними фунгіцидами, наступним важливим питанням має стати вивчення

відповідності їх дозування. Проблема цього питання полягає у тому, що дозування фармацевтичних препаратів визначається для досягнення терапевтичного ефекту, тоді як у фунгіцидах ці показники визначались з позиції ефективності захисту рослин від грибкових захворювань. Використання антимікотиків у медицині може призвести до розвитку резистентності грибів, що може вплинути на ефективність фунгіцидів у сільському господарстві та вимагати збільшення дози або розробки нових фунгіцидів. В Україні дозування антимікотиків та фунгіцидів регулюється законодавством та вимогами щодо безпеки. Виробники мають дотримуватися цих норм, і це також може впливати на дозування.

Кореляція між дозуванням антимікотиків і фунгіцидів може залежати від спільної основи хімічної структури і механізмів дії, але вона також залежить від багатьох інших чинників, включаючи регулювання, розвиток резистентності та інші фактори.

Отже, отримані дані показують високу структурну та хімічну подібність між азольними антимікотиками і фунгіцидами. Висловлено обґрунтоване припущення, що подальше збільшення кількості резистентних, мультирезистентних і панрезистентних штамів може призвести до зниження ефективності азольних антимікотиків у терапії та посилити вибіркового тиск на чутливі штами як у сільському господарстві, так і в медицині.

5.2. Чутливість клінічних штамів кандид та адаптованих до фунгіцидів штамів до антимікотиків медичного призначення

Завершальний етап роботи був спрямований на вивчення можливості формування перехресної резистентності до антимікотиків, що використовуються в медичній практиці, у штамів грибів, які були адаптовані до високих концентрацій фунгіцидів. Нашою метою було визначити, чи можуть штами, які набули стійкості до аграрних фунгіцидів, також набувати стійкості до медичних антимікотиків, що становить важливу проблему для лікування грибкових інфекцій.

Для цього було проведено порівняльне дослідження чутливості грибів до антимікотиків як до, так і після їхньої адаптації до фунгіцидів. При цьому було

використано кількісний підхід для оцінки змін мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК) до таких препаратів як флуконазол, воріконазол та інші. Це дозволило не лише оцінити поточний рівень чутливості штамів, але й виявити закономірності у формуванні перехресної резистентності. Отримані результати, що демонструють зміну чутливості після адаптації до фунгіцидів, наведені в таблиці 5.4.

Табл. 5.4.

Чутливість резистентних до фунгіцидів популяцій кандид до
антимікотиків медичного призначення

Характеристика штаму	Протигрибкові препарати				
	Ністатин	Міконазол	Клотримазол	Флуконазол	Воріконазол
	Діаметр зони затримки росту (мм)				
<i>C. albicans 1</i>	16	20	20	30	30
<i>C. albicans 1</i> (Д)	15	20	16	5	5
<i>C. albicans 1</i> (Т)	20	44	30	45	30
<i>C. albicans 1</i> (Ф)	16	28	20	44	40
<i>C. albicans 1</i> (Пп*)	12	24	20	36	32
<i>C. albicans 1</i> (І*)	14	40	40	45	45
<i>C. albicans 1</i> (Пх)	14	40	30	45	45
<i>C. albicans 77</i>	10	15	20	5	32
<i>C. albicans 77</i> (Д*)	12	17	16	32	5
<i>C. albicans 77</i> (Т)	14	8	12	32	32
<i>C. albicans 77</i> (Ф)	20	10	24	40	30
<i>C. albicans 77</i> (Пп)	12	16	14	35	5
<i>C. albicans 77</i> (І*)	12	26	22	40	35
<i>C. albicans 77</i> (Пх)	9	20	16	34	26
<i>C. krusei B</i>	11	14	16	5	40
<i>C. krusei B</i> (Д*)	12	10	11	5	16
<i>C. krusei B</i> (Т*)	11	13	20	5	36
<i>C. krusei B</i> (Ф*)	12	8	6	5	16
<i>C. krusei B</i> (Пп*)	12	10	15	5	34
<i>C. krusei B</i> (І*)	5	14	12	5	6
<i>C. krusei B</i> (Пх)	11	14	15	5	30
<i>C. glabrata 91</i>	12	12	26	22	26
<i>C. glabrata 91</i> (Д)	14	12 / 30	30	18 ¹	40 ¹
<i>C. glabrata 91</i> (Т*)	10	12	20	40	20
<i>C. glabrata 91</i> (Ф)	15	30	30	30	44
<i>C. glabrata 91</i> (Пп*)	15	20	22	30	25
<i>C. glabrata 91</i> (І)	8	15 / 30	30	40	20 ¹
<i>C. glabrata 91</i> (Пх)	12	14	15	20	5

Примітка: (Т*), (Пп*) штам із сформованою резистентністю до тебуконазолу, пропіконазолу, відповідно; (Д), (Ф), (І), (Пх) штучно адаптований штам до дифеноконазолу, флутріяфолу, імазалілу, прохлоразу, відповідно; ¹ зона

повністю заростала після 48 годин інкубації.

За результатами диско-дифузійного методу штам *C. albicans* 1 був визначений як високочутливий до лікарських препаратів флуконазолу і воріконазолу, а також чутливий до міконазолу, клотримазолу та ністатину. Дані, наведені на рис. 5.1, демонструють певні зміни чутливості до антимікотиків у клінічних штамів *C. albicans* 1 після пасажування в поживних середовищах з різними фунгіцидами. Згідно з отриманими результатами, у штамів, адаптованих до фунгіциду дифеноконазолу, спостерігалось зниження чутливості до лікарських препаратів з групи триазолів (флуконазолу та воріконазолу), а також до клотримазолу. У штамів, адаптованих до високих концентрацій фунгіцидів імазалілу та прохлоразу (похідні імідазолу), не було виявлено перехресної резистентності до медичних антимікотиків з групи триазолів та імідазолів. Навпаки, спостерігалось збільшення зон затримки росту, що свідчить про підвищення чутливості до цих препаратів.

Підвищення чутливості до ністатину, всіх використаних у досліді імідазольних препаратів та флуконазолу спостерігалось у штамів, адаптованих до високих концентрацій тебуконазолу. Штам *C. albicans* 1, який був малочутливий до фунгіциду флутріяфолу, виявив високу чутливість як до триазольних антимікотиків (флуконазолу та воріконазолу), так і до імідазольного антимікотика міконазолу. Для штаму, резистентного до пропіконазолу, зміни чутливості були мінімальними.

Дані результати підкреслюють складний характер адаптації штамів грибів до фунгіцидів та їх можливу взаємодію з антимікотиками, що може мати важливе клінічне значення при виборі терапії.

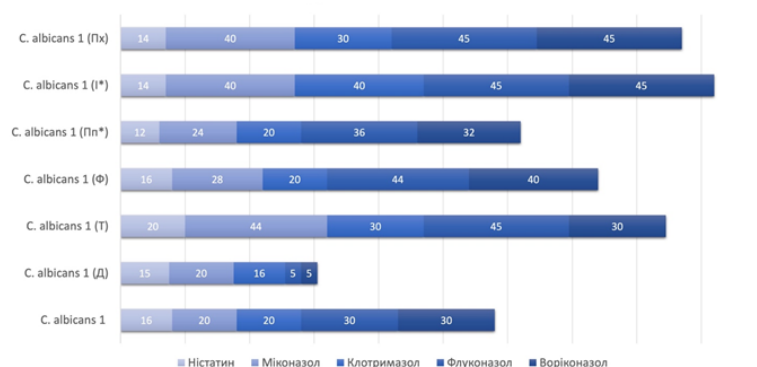


Рис. 5. 1 Чутливість адаптованих до фунгіцидів штамів *C. albicans* 1 до

антимікотиків медичного призначення.

Примітки: (Д), (Т), (Ф), (Пх) адаптований до дифеноконазолу, тебуконазолу, флутріяфолу, прохлоразу, відповідно; (Пп*), (І*) штамп із сформованою резистентністю до пропіконазолу, імазалілу, відповідно.

На основі розмірів зон затримки росту навколо дисків із протигрибковими препаратами, штамп *C. albicans* 77 був визначений як резистентний до ністатину та флуконазолу, чутливий до воріконазолу та клотримазолу, малочутливий до міконазолу та помірно стійкий до ністатину.

У штамів цієї групи, адаптованих до високих концентрацій фунгіцидів, формувалася підвищена чутливість до флуконазолу. Однак популяції, які проходили пасажування в середовищах з триазольними фунгіцидами (дифеноконазолом і пропіконазолом), втрачали чутливість до воріконазолу, що свідчить про формування перехресної резистентності. Гриби, які були малочутливі до фунгіциду тебуконазолу, розвивали стійкість до імідазолів, зокрема до міконазолу та клотримазолу. Крім того, у штамів, адаптованих до імідазольного фунгіциду пропіконазолу, спостерігалось зниження чутливості до клотримазолу, але підвищувалася чутливість до міконазолу у штамів, резистентних до імідазольних фунгіцидів. Отримані результати підтверджуються даними, наведеними на рис. 5.2.

Слід також відмітити, що у резистентного до фунгіциду флутріяфолу штаму *C. albicans* 77 зростала чутливість до полієнового антибіотика ністатину, однак знижувалась чутливість до міконазолу. Отже, на підставі аналізу чутливості цих двох штамів можна лише стверджувати, що у резистентних до дифеноконазолу штамів може з'являтися перехресна стійкість до триазолів. Однак, у переважної кількості адаптованих культур зростає чутливість до флуконазолу та/або воріконазолу. Адаптовані або резистентні штами до

імідазолів мали більш високу чутливість до імідазолів медичного призначення.

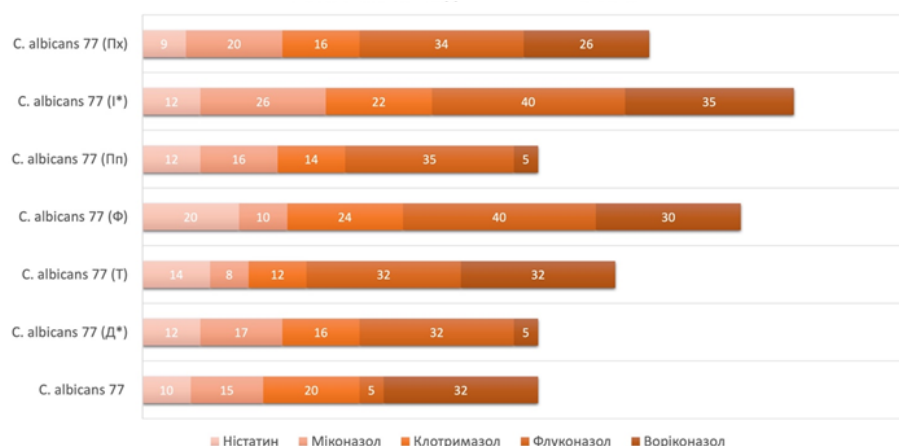


Рис. 5.2. Чутливість адаптованих до фунгіцидів штамів *C. albicans* 77 до антимікотиків медичного призначення.

Примітки: (Т), (Ф), (Пп), (Пх) штам, адаптований до тебуконазолу, флутріяфолу, пропіконазолу, прохлоразу, відповідно; (Д*), (І*) штам із сформованою резистентністю до дифеноконазолу, імазалілу, відповідно.

Згідно з результатами дослідження чутливості диско-дифузійним методом, штам *C. krusei* В був визначений як резистентний до флуконазолу, високо чутливий до воріконазолу, чутливий до клотримазолу, малочутливий до міконазолу та ністатину. Встановлено, що у штамів *C. krusei* В, резистентних до фунгіцидів, зберігалася стійкість до флуконазолу. Водночас, у штамів, адаптованих до високих доз дифеноконазолу, флутріяфолу та імазалілу, істотно знижувалася чутливість до воріконазолу або ж розвивалася стійкість до нього, що було особливо виражено у штамів, резистентних до імазалілу. Ці зміни підтверджуються даними, наведеними на рис. 5.3.

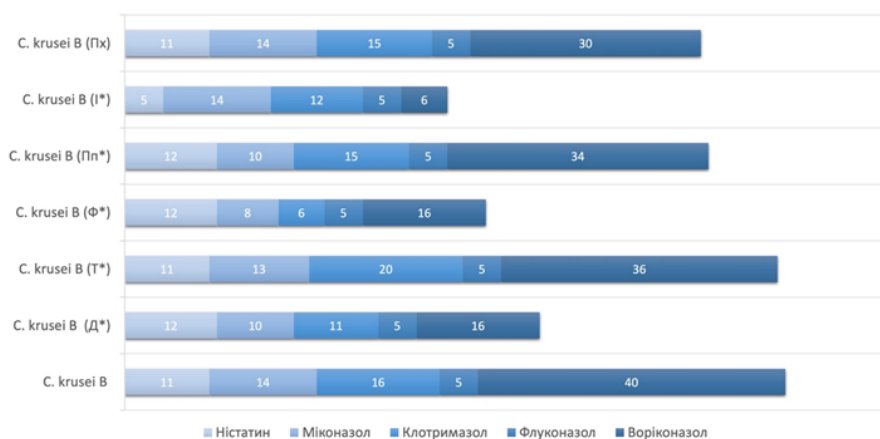


Рис. 5.3. Чутливість адаптованих до фунгіцидів штамів *C. krusei* В до

антимікотиків медичного призначення.

Примітки: (Д*) (Т*), (Ф*), (Пп*), (І*) штам із сформованою резистентністю до дифеноконазолу, тебуконазолу, флутріяфолу, пропіконазолу, імазалілу, відповідно; (Пх) адаптований штам до прохлоразу.

За результатами експериментальних досліджень було встановлено, що штам *C. krusei* В, який набув резистентність до флутріяфолу, втратив чутливість до імідазолів (міконазолу та клотримазолу), а втрата чутливості до ністатину спостерігалася у штамів даного виду, резистентних до фунгіциду імазалілу. На відміну від клінічних штамів *C. albicans*, у штамів *C. krusei*, резистентних до фунгіцидів, не було виявлено зростання чутливості до антимікотиків різних хімічних груп, за винятком незначного підвищення чутливості до клотримазолу у штаму *C. krusei* В, резистентного до тебуконазолу.

На підставі отриманих результатів були виявлені певні особливості спектру антимікробної активності медичних антимікотиків щодо штаму *C. glabrata* 91 та його резистентних до фунгіцидів популяцій. За нашими даними, клінічний ізолят *C. glabrata* 91 був помірно чутливим до міконазолу та ністатину, а також чутливим до клотримазолу, флуконазолу та воріконазолу. Дослідження, представлені на рис. 5.4 та 5.5, демонструють деякі особливості біологічної дії антимікотиків на штами *C. glabrata* 91, адаптовані до фунгіцидів. Зокрема, при визначенні протимікробної дії міконазолу на штами, адаптовані до дифеноконазолу та імазалілу, спостерігалася утворення "подвійної зони": центральної, меншого діаметру, де відмічалася повна відсутність росту та більш широкої зони, де реєструвався слабкий ріст. Крім того, резистентні до дифеноконазолу кандиди зберігали чутливість до триазолів протягом перших 24 годин, але через 48 годин зона затримки росту повністю заростала, що може свідчити про формування перехресної резистентності у повільноростучої популяції. Подібна тенденція спостерігалася також у штамів, стійких до імазалілу, але тільки щодо воріконазолу.

Також було встановлено підвищення чутливості до протигрибкових препаратів у штамів *C. glabrata*, резистентних до флутріафолу, а також підвищення чутливості до флуконазолу у штамів, які набули резистентності до пропіконазолу та імазалілу.

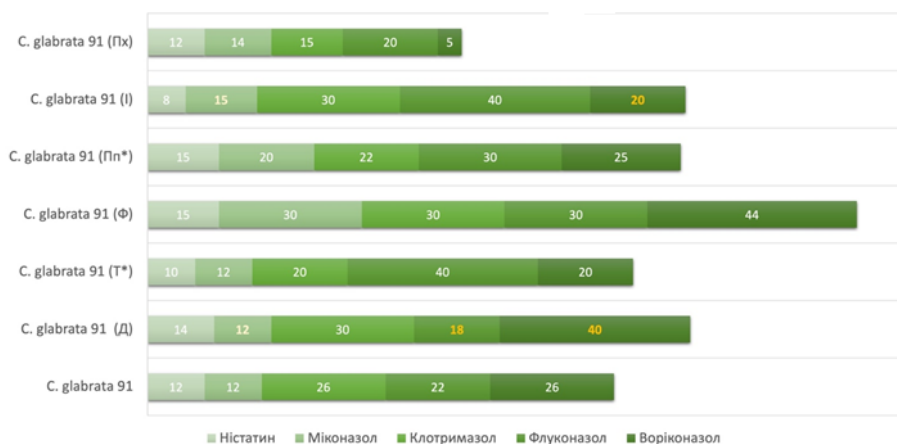


Рис. 5.4. Чутливість адаптованих до фунгіцидів штамів *C. Glabrata 91* до антимікотиків медичного призначення через 24 год.

Примітки: (Т*), (Пп*) штам із сформованою резистентністю до тебуконазолу, пропіконазолу, відповідно; (Д), (Ф), (І), (Пх) адаптований штам до дифеноконазолу, флутріафолу, імазалілу, прохлоразу, відповідно; цифри, виділені помаранчевим кольором – зона повністю заростала після 48 годин інкубації.

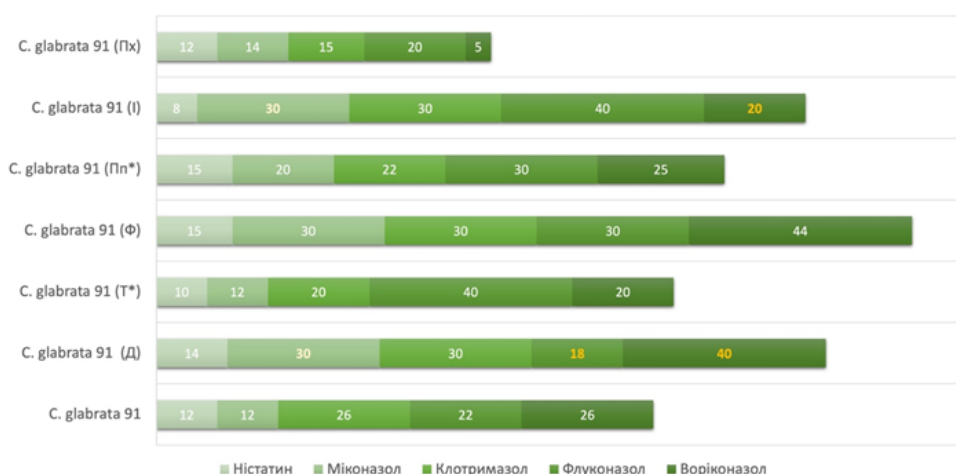


Рис. 5.5. Чутливість адаптованих до фунгіцидів штамів *C. Glabrata 91* до антимікотиків медичного призначення через 48 год.

Примітки: (Т*), (Пп*) штам із сформованою резистентністю до тебуконазолу, пропіконазолу, відповідно; (Д), (Ф), (І), (Пх) адаптований штам до

дифеноконазолу, флутріафолу, імазалілу, прохлоразу, відповідно; цифри, виділені помаранчевим кольором — зона повністю заростала після 48 годин інкубації.

У цілому, процес адаптації грибів до фунгіцидів супроводжувався як формуванням перехресної резистентності до лікарських антимікотиків, так і підвищенням їх чутливості до певних препаратів. Це дослідження є важливим для розуміння механізмів формування резистентності та розробки стратегій боротьби з мультирезистентними штамми, що можуть виникати як у сільському господарстві, так і в клінічних умовах. Результати мають значний вплив на охорону здоров'я, оскільки зростання резистентності грибів до азольних препаратів може ускладнити лікування пацієнтів з інвазивними грибковими інфекціями.

Доведено, що в умовах експерименту кандиди можуть набувати резистентність до фунгіцидів, і цей процес залежить від хімічного класу фунгіциду, а також від штамових та видових особливостей мікроорганізмів. Наприклад, у клінічних штамів *C. albicans* чутливість до тебуконазолу зменшувалася у 8 разів, що свідчить про значне формування резистентності, тоді як у штамів *C. glabrata* резистентність до флутріафолу не формувалася взагалі.

Отже, результати досліджень показують зв'язок між використанням фунгіцидів та поширенням резистентності серед збудників грибкових інфекцій до антимікотиків, що використовуються в медичній практиці. Інтенсивне застосування фунгіцидів у сільському господарстві може сприяти розвитку стійкості грибкових патогенів до основних груп лікарських антимікотиків.

Таким чином, результати експериментальних досліджень демонструють зв'язок між використанням фунгіцидів та поширенням резистентності серед збудників грибкових інфекцій до лікарських препаратів антимікотичної дії. Не можна виключати, що інтенсивне застосування фунгіцидів у сільському господарстві сприяє формуванню стійкості у збудників грибкових інфекцій людини до основних груп антимікотиків, які використовуються у медичній практиці.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в

таких публікаціях:

1. Hrynzovska A.A., Bobir V.V., Shirobokov V.P., Vovk I.M., Poniatovsky V.A., Nazarchuk O.A. (2025) ANTIFUNGAL THERAPY AND PESTICIDES: IS THERE A CONNECTION? *Clinical and Preventive Medicine*, №2(2025). Available from: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.2.2025.17>
2. Hrynzovska A., Bobyr V. Formation of resistance of *Candida* fungi to fungicidal drugs. *USMYJ* [Internet]. 2024Jun.27 [cited 2024Jul.4];146(2):60-7. Available from: <https://mmj.nmuofficial.com/index.php/journal/article/view/398>
3. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2024) STUDY OF THE SENSITIVITY OF *CANDIDA* ADAPTED TO FUNGICIDES TO MEDICAL ANTIFUNGAL DRUGS «Bulletin of problems biology and medicine», 2024 Issue 2, 173, 348-357 pages, index UDC 615.282.015.8:579.61. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2024-2-173-348-357>
4. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2023) Формування механізмів перехресної резистентності *A. fumigatus* за рахунок хімічної подібності азольних антимікотиків та фунгіцидів. Україна. Здоров'я нації, № 3, 27-33. <https://doi.org/10.32782/2077-6594/2023.3/04>
5. Гринзовська А.А., Бобир В.В., Вовк І.М., Назарчук О.А. (2023) Структурно-морфологічні зміни грибів роду *Candida* в процесі штучного формування у них резистентності до азолів. Перспективи та інновації науки, №14(32), 941-955. [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14\(32\)-941-955](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14(32)-941-955)
6. Еволюція Antifungal Stewardship: Витоки, розвиток та сучасні виклики/ Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 19 березня 2025 р.
7. Технологія DectiSomes: новий напрямок у лікуванні грибкових інфекцій / III Науково-практична міжнародна дистанційна конференція «МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ В СУЧАСНІЙ МЕДИЦИНІ» 24 березня 2023 року
8. Використання фунгіцидів у рослинництві як можливий шлях розвитку резистентності збудників мікозів людини / Міжнародна науково-

практична конференція "Біологічні, медичні та науково-педагогічні аспекти здоров'я людини" 17-18.11.2022 р. м. Полтава

9. Використання імідазолів в особистій гігієні як один із можливих чинників виникнення резистентності мікозів людини до лікарських препаратів групи імідазолів / Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 16 березня 2022 р.

10. Стандартна операційна процедура з визначення ризиків в секторі санітарно-мікробіологічного та санітарно-вірусологічного дослідження / Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю), 17 березня 2021 р.

11. Передумови виникнення надзвичайних ситуацій медико-біологічного характеру в Україні / Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини (збірка матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю) 11 березня 2020 р.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Резистентність збудників грибкових інфекцій до антимікотичних препаратів стає глобальним викликом для усього людства, що потребує міждисциплінарного підходу. У 2022 році ВООЗ вперше було оприлюднено перелік найбільш небезпечних грибкових патогенів, серед яких *Cryptococcus neoformans*, *C. auris*, *A. fumigatus* та *C. albicans*. Існують наукові повідомлення, в яких йдеться про епідеміологію інвазивних грибкових інфекцій у реципієнтів трансплантатів, зокрема після трансплантації солідних органів (ТСО) та гемопоетичних стовбурових клітин (ТГСК). Автори зазначають, що такі пацієнти отримують тривалі імуносупресивні режими для запобігання відторгненню, що підвищує їхню сприйнятливість до інфекцій [139]. Разом з тим, у літературі описано, що *C. albicans* є провідним збудником кандидемії в Європі, складаючи 56% випадків. 30-денна смертність при кандидемії становить 37,9%. [1]. Ці дані узгоджуються з отриманими нами результатами, які показують зростання резистентності як серед клінічних штамів, так і серед ізолятів з навколишнього середовища.

Серед пліснявих грибів провідним збудником інвазивного аспергільозу є *A. fumigatus*, особливо часто він реєструється у пацієнтів після трансплантації легень та серця. У реципієнтів ТГСК *A. fumigatus* також є ключовим збудником інвазивних грибкових інфекцій [140]. Оскільки дане питання набуває все більшої актуальності, частина дисертаційної роботи була приділена власне *A. fumigatus*.

За нашими даними в період 2022-2024 рр. частка резистентних штамів серед клінічних ізолятів *A. fumigatus* становила 3,40%. Отримані дані корелюють з результатами інших дослідників, наприклад Howard SJ & Pasqualotto AC показали, що резистентність до азолів у клінічних штамів *A. fumigatus* зросла з 0% у 1997 році до 17% у 2007 році [141]. Стаття авторів Bosetti D та Neofytos D, опублікована у 2023 році в Current Fungal Infection Reports, описує дослідження SCARE-Network, проведене у 23 центрах (19 європейських та 4 неєвропейських), і показує, що загальна поширеність азол-резистентних штамів *A. fumigatus*

становила 3,2%, з діапазоном від 0 до 26%. У Нідерландах також спостерігалось значне зростання резистентності: з 1,7–6% у період 1997–2007 років до 8–15% у 2013–2018 роках. У Данії дослідження, проведені в розрізі Національної програми спостереження за грибковими інфекціями, показали поширеність *A. fumigatus* на рівні 6,1% у період 2018–2020 років. У Бельгії однорічне ретроспективне мультицентрове дослідження показало поширеність *A. fumigatus* на рівні 5,5% [142]. В той же час, дослідження науковцем van der Linden JWM та співавторами 3 788 клінічних ізолятів *A. Fumigatus* у 22 центрах з 19 країн виявило резистентність до азолів у 3,2% випадках, як інвазивних, так і неінвазивних форм аспергільозу, що є вищим показником, ніж раніше вважалося [143]. Це свідчить про подібні тенденції у формуванні стійкості в різних географічних регіонах.

Отримані нами результати досліджень на території Іспанії (Мадрид) дали змогу зафіксувати, що частка резистентних штамів *A. fumigatus* серед клінічних штамів була 3,40%, тоді як серед ізолятів з навколишнього середовища цей показник складав 10,98%. Відповідно було проведено кореляцію з іншими дослідженнями в даній країні, одне з яких включало два періоди: жовтень 2010 року та травень 2011 року, охоплюючи 29 лікарень. Авторами було виділено 325 клінічних штамів, серед яких мікроорганізми роду *Aspergillus* становили 86,3% випадків, найчастіше виділявся *A. fumigatus* (48,5%), резистентність до триазолів коливалася від 10% до 12,7%, залежно від препарату [127]. У статті Escribano P, Rodríguez-Sánchez описане інше дослідження, проведене в Іспанії, яке охоплювало 30 лікарень та 1007 ізолятів *A. fumigatus* від 928 пацієнтів [144].

Нами виявлено 4 клінічних мультирезистентних штами *A. fumigatus*. В той час як автори Bosetti D та Neofytos D зазначають, що інвазивний аспергільоз, спричинений резистентними до азолів штамми, асоціюється з вищим клінічним навантаженням та підвищеною смертністю [140].

Автори Thompson GR III, Young JH зазначають, що *A. fumigatus* є найбільш поширеним патогеном серед цього роду грибів, відповідальним за більшість випадків інвазивного аспергільозу. Вони підкреслюють, що при інвазивному аспергільозі смертність може сягати 20% [145]. Основними факторами ризику

розвитку інвазивного аспергільозу є імуносупресія, зокрема у пацієнтів після трансплантації органів або стовбурових клітин, а також у хворих на гематологічні злоякісні новоутворення. Клінічні прояви можуть варіювати від гострого легеневого аспергільозу до хронічних форм захворювання.,

Важливим, на наш погляд, є той факт, що за результатами досліджень даних авторів для терапії інвазивного аспергільозу препаратом першої лінії є вориконазол, в той час як нами встановлено, що всі штами *A. fumigatus* з мутацією *cup51A* TR34/L98H були резистентними до даного препарату. Згідно даних дослідників, інші препарати, такі як посаконазол та ізавуконазол, можуть використовуватися як альтернативи для профілактики у пацієнтів з високим ризиком [144]. Разом з тим, наші дослідження показали, що всі штами *A. fumigatus* з мутацією *cup51A* TR34/L98H резистентні також і до вказаних вище препаратів. Також в даній статті зазначається, що ітраконазол має обмежену активність проти *Aspergillus* spp. Однак, нами встановлено, що всі резистентні клінічні штами *A. fumigatus* були резистентними до даного препарату.

Враховуючи той фактор, що за нашими даними в ізолятів з навколишнього середовища показник резистентності був 10,98%, що є утричі вищим ніж серед клінічних штамів (3,40%), все більш обґрунтованою стає гіпотеза про можливість формування резистентності грибів до антимікотичних препаратів не лише внаслідок тривалої терапії азольними препаратами, але й через вплив сільськогосподарських фунгіцидів на ізоляти з навколишнього середовища з подальшим формування перехресної резистентності до лікарських антимікотиків у клінічних штамів. В цьому контексті цінними для нас є дослідження Meis JF, Chowdhary A [16] щодо формування резистентності грибів під впливом азольних фунгіцидів. Хоча *A. fumigatus* не є фітопатогеном, сільськогосподарські фунгіциди, які застосовуються проти рослинних патогенних грибів, таких як *Fusarium*, *Mycosphaerella* та *A. flavus*, також впливають на *A. fumigatus* у навколишньому середовищі і вплив на нецільові гриби є неминучим. Крім того, не можна виключати, що схожість у структурі молекул між азольними фунгіцидами та протигрибковими препаратами призводить до перехресної резистентності *A. fumigatus* до медичних азолів.

У дослідженні Chowdhary A, Kathuria S [66] зазначається, що використання азольних фунгіцидів, таких як дифеноконазол, тебуконазол, флуатріяфол, імазаліл та прохлораз у сільському господарстві може сприяти розвитку резистентності у *A. fumigatus*, оскільки ці сполуки мають подібну структуру до медичних азолів і впливають на синтез ергостеролу у мікроскопічних грибів. Проводячи порівняльний аналіз досліджуваних у дисертаційній роботі сполук, було виявлено, що молекули пестицидів (фунгіцидів) та лікарських протигрибкових препаратів з класу триазолів мають структурно подібні фрагменти. Аналогічно, молекули пестицидів (фунгіцидів) та фармпрепаратів з класу імідазолів також мають структурно подібні фрагменти.

Автори іншого дослідження запевняють, що триазоли не є мутагенними, але сприяють відбору резистентних штамів при виникненні спонтанних мутацій, які краще виживають у середовищі, що містить триазоли. Основною мішенню для мутацій, пов'язаних з резистентністю, є ген *sur51A*, який кодує фермент, залучений у синтезі клітинної стінки [65]. Існують наукові повідомлення, в яких йдеться про те, що основним механізмом резистентності у збудників грибкових інфекцій є мутація TR34/L98H у гені *sur51A*. Ця мутація пов'язана з використанням азольних фунгіцидів у сільському господарстві, що призводить до розвитку резистентності у навколишньому середовищі та подальшого інфікування людей. З іншого боку, клінічні дослідження даних авторів показали, що двом третинам пацієнтів з азол-резистентними інфекціями не проводили попередньої азольної терапії, а високі показники смертності від 50% до 100% спостерігаються при азол-резистентному інвазивному аспергільозі. Резистентність була пов'язана з ключовими мутаціями в гені *sur51A*, включаючи типи резистентності TR34/L98H, TR53 та TR46/Y121F/T289A [16]. Під час аналізу результатів нашого дослідження основним механізмом резистентності виявилася мутація TR34/L98H у гені *sur51A*, яка була виявлена у 66,13% усіх резистентних штамів.

Під час нашого дослідження виявлено лише один тип мутації у гені *sur51A*, а саме TR34/L98H серед 37 ізолятів з навколишнього середовища та 4 резистентних клінічних штамів *A. fumigatus*. Разом з тим, дослідниками Snelders

E & Verweij PE [146] встановлено, що резистентність до азолів у *A. fumigatus* може виникати не лише внаслідок тривалого лікування пацієнтів, але й через контакт з азолами у навколишньому середовищі. За їх даними - ізоляти з мутацією TR34/L98H у гені *cyp51A*, яка відповідає за резистентність до азолів, були присутні як у клінічних ізолятів, так і у штамів з навколишнього середовища.

Описані в літературі дані свідчать про значну поширеність резистентних до азолів штамів серед клінічних ізолятів *A. fumigatus* в Італії. Серед 533 досліджених авторами клінічних ізолятів – 3,5% виявилися резистентними до даної групи препаратів. Основним механізмом резистентності виявилась мутація TR34/L98H у гені *cyp51A* [147]. Отримані нами дані також демонструють схожий відсоток резистентності та механізм резистентності в клінічних штамів у вигляді мутації TR34/L98H у гені *cyp51A*.

Відомо, що значна частина резистентних ізолятів з'являється в результаті впливу зовнішніх чинників, таких як використання азолів у сільському господарстві. Деякі дослідники вказують, що використання фунгіцидів у сільському господарстві, таких як дифеноконазол, тебуконазол та прохлораз, є ключовим фактором відбору резистентних штамів *A. fumigatus* [66]. Наші результати підтверджують цю тенденцію, оскільки серед ізолятів з навколишнього середовища частка резистентних штамів була втричі вищою, ніж серед клінічних. У подальшому такі штами можуть інфікувати пацієнтів або зворотно поширюватися у навколишнє середовище, створюючи циклічний процес обміну резистентними штамів.

Серед молекулярних методів типування, які використовуються для аналізу резистентності грибів, в тому числі і *A. fumigatus* до азолів, особливо ефективним виявився метод TRESPERG, який мав високу дискримінаційну здатність ($D = 0,9972$) і не потребував спеціального обладнання чи висококваліфікованого персоналу, що дозволяє легко інтегрувати його в будь-яку клінічну мікробіологічну лабораторію [148]. При використанні даного методу під час наших досліджень було встановлено спільний генотип TRESPERG (t04Am1.3c08Be07) для резистентних і чутливих ізолятів з навколишнього

середовища у різні періоди часу, що може вказувати на потенційний зв'язок між цими популяціями.

Нами також було ідентифіковано генотип TRESPERG (t01m1.1c05Ae07) у 6 чутливих клінічних штамів, що певним чином корелює з даними, отриманими Ogawa et al., (2023), які одержали ізоляти *Aspergillus* від пацієнтів з COVID-19 у Японії. Для молекулярно-епідеміологічного аналізу штамів *A. fumigatus* автори також використали метод типування TRESPERG. Результати даної методики продемонстрували, що в пацієнта №11 зафіксовано генотип TRESPERG (t01m1.1c05Ae07) [149].

Аналіз даних, отриманих дослідниками на території Іспанії, свідчить про певні закономірності у поширенні генотипів TRESPERG серед клінічних ізолятів та штамів із навколишнього середовища [150]. Виявлені подібності та відмінності результатів даного дослідження та нашої роботи дозволяють простежити динаміку поширення генетичних варіантів та їхньої стійкості до впливу антимікробних засобів. Даними дослідниками генотип t01m1.1c05Ae07 був виявлений серед клінічних ізолятів, в той час як за нашими даними – він був представлений шістьма клінічними штамми, які проявили чутливість, що вказує на відсутність механізмів резистентності у даних ізолятів. Крім того, генотип t01m1.1c08Ae07 у дослідженні колег виявлявся у двох клінічних штамів, нами ж даний генотип зафіксовано у восьми чутливих клінічних штамів.

Зазначені вище дослідники виявили генотип t01m3.4c05Ae15 у одного штаму з навколишнього середовища, тоді як нами цей генотип ідентифіковано в одного клінічного ізоляту, який виявився резистентним. Цу може свідчити про можливе поширення резистентних штамів з навколишнього середовища у клініку.

Разом з тим, колеги відмічають присутність генотипу t01m5.3c08Ae07 у двох клінічних штамів та одного ізоляту з навколишнього середовища [150]. Водночас, у нашій роботі цей генотип був зафіксований у шести чутливих клінічних штамів, що підкреслює його широку циркуляцію в медичних установах.

Також генотип t02m1.1c09e05 був виділений в ізолятів з навколишнього

середовища на території Іспанії. Нами ж цей генотип виявлений у чотирьох ізолятів з навколишнього середовища, з яких один виявився резистентним, а три залишалися чутливими. Це свідчить про змішану природу розподілу механізмів резистентності серед даного генотипу [150]. За нашими даними генотип TRESPERG (t02m1.1c09e05) був найпоширенішим серед резистентних ізолятів з навколишнього середовища, що вказує на ймовірність розповсюдження клону штаму з високим рівнем антимікотикорезистентності. Деякі генотипи TRESPERG, зокрема t02m1.1c09e05, були виявлені як серед резистентних штамів із навколишнього середовища, так і серед чутливих клінічних штамів. Це свідчить про можливість перенесення штамів між середовищами, а також про вплив навколишнього середовища як можливого джерела формування резистентності.

Результати дослідження колег також показують, що генотип t03m1.1c05Ae07 був зафіксований в одного ізоляту з навколишнього середовища та у двох клінічних ізолятів. У нашому дослідженні цей генотип зустрічався в шести ізолятів з навколишнього середовища, усі з них були резистентними, що може свідчити про посилення механізмів резистентності в середовищах поза межами медичних закладів.

Отримані результати співставлення даних досліджень свідчать про варіативність генотипів TRESPERG серед клінічних та екологічних ізолятів. Деякі генотипи мають тенденцію до чутливості незалежно від середовища (наприклад, t01m1.1c05Ae07, t03m1.1c10e06, t05m1.3c03e13), тоді як інші демонструють певний рівень резистентності, що може бути пов'язано з адаптацією до умов клінічного середовища (наприклад, t01m3.4c05Ae15, t03m1.1c05Ae07).

Таким чином, результати дослідження підкреслили важливість моніторингу генетичних механізмів резистентності *A. fumigatus* як у клінічному, так і у природному середовищі. Виявлення спільних генотипів серед резистентних та чутливих штамів свідчить про необхідність обмеження використання азолів у сільському господарстві та посилення заходів щодо профілактики поширення резистентних штамів.

Не зважаючи на суворі регламенти, розроблені з метою мінімізації ризиків, масштабне застосування фунгіцидів погіршує екологічну ситуацію, підвищуючи пестицидне навантаження в агробіоценозах, що супроводжується цілою низкою медичних проблем, а також виникненням у мікроорганізмів резистентності до цих препаратів [151]. Результати нашого дослідження чутливості клінічних штамів *Candida spp.* до фунгіцидів, що використовуються в сільському господарстві, показало значні видові та штамові відмінності. Найвищу чутливість до триазолів, зокрема пропіконазолу, продемонстрували клінічні ізоляти *C. albicans* (МФцК $0,09 \pm 0,01$ мг/мл). Водночас *C. glabrata* виявилася найбільш резистентною до флутріафолу (МФцК $7,83 \pm 0,84$ мг/мл), перевищуючи відповідні показники інших видів у понад 20 разів. Зокрема, *C. krusei* швидко формує стійкість до всіх сполук, крім прохлоразу, тоді як *C. glabrata* набуває стійкості до триазолів, таких як тебуконазол і пропіконазол, а *C. albicans* стає резистентною до імазалілу, представника групи імідазолів. Доведено, що в умовах експерименту кандиди можуть набувати резистентність до фунгіцидів, і цей процес залежить від хімічного класу фунгіциду, а також від штамових та видових особливостей мікроорганізмів. Наприклад, у клінічних штамів *C. albicans* чутливість до тебуконазолу зменшувалася у 8 разів, що свідчить про значне формування резистентності. Аналогічні тенденції щодо динаміки формування резистентності спостерігали й інші дослідники, відзначаючи, що тривалий вплив фунгіцидів сприяє поступовому зниженню чутливості клінічних та екологічних ізолятів *Candida spp.*, що може призводити до закріплення адаптивних механізмів на популяційному рівні.

Одним із ключових аспектів досліджень щодо адаптаційних механізмів *Candida spp.* є їхня здатність змінювати морфологічні стани залежно від умов середовища. Серед *Candida spp.* лише певні види мають здатність проходити морфологічний перехід між дріжджовими та ниткоподібними станами росту. Найкраще вивченим з них є *C. albicans*, яка легко може переходити між дріжджовими, псевдогіфальними та гіфальними станами росту в різноманітних умовах середовища [138]. Під час нашого дослідження світлової та електронної мікроскопії штами роду *C. albicans* продемонстрували типові результати

характеристик структурно-морфологічної картини. В той час як процес адаптації *C. krusei* супроводжувався морфологічними змінами та було сформовано гіфи та псевдогіфи, що в літературі асоціюється зі зростанням вірулентності [139]. Наприклад, є повідомлення про те, що *C. glabrata* зазвичай є дріжджами, здатними бути високо вірулентними [152]. Водночас, ми з свого боку, можемо лише додати, що навіть після того як дані мікроорганізми набули більш або менш вираженої стійкості, вони залишились переважно в стані дріжджів, що і є особливістю даного виду цих патогенів. Також у *C. glabrata* виявляли підвищену електронну щільність оболонки та відшарування мембран, що може бути ознакою стресових адаптаційних механізмів.

Таким чином, морфологічна пластичність і стресові адаптаційні механізми *Candida spp.* можуть впливати не лише на їхню резистентність, але й на здатність колонізувати різні середовища та організми.

У цьому контексті важливо зазначити, що серед реципієнтів ТСО найбільш поширеними збудниками є дріжджі роду *Candida*, серед яких *C. albicans* залишається домінуючим видом [141]. В той час як результати проведення наших досліджень адаптації грибів роду *C. albicans* до умов постійного впливу фунгіцидів продемонстрували поступове формування стійкості, яка була найвиразнішою у випадку з імазалілом (зростання МФцК у 8 разів). Для прохлоразу цей процес виявився менш інтенсивним, із дворазовим збільшенням стійкості.

У Вроцлавському медичному університеті (1999–2018) було досліджено 125 ізолятів *Candida spp* [153]. За результатами наших колег МІК клотримазолу варіювали від 0,008 до 8 мг/л, МІК₉₀ = 1 мг/л, МІК₅₀ = 0,008 мг/л. 88% ізолятів мали МІК < 1 мг/л і класифікувалися як WT, тоді як у 3,2% *C. albicans* зафіксовано МІК ≥ 1 мг/л, що свідчить про зростання резистентності в невеликій частині популяції. В той час як у нашому дослідженні *C. albicans 1* виявився чутливим до клотримазолу, але після адаптації до дифеноконазолу його чутливість знизилася, що може вказувати на розвиток перехресної резистентності. Штам *C. albicans 77* залишався чутливим до клотримазолу, хоча був резистентним до флуконазолу та ністатину, малочутливим до міконазолу.

Наші результати частково узгоджуються з цими даними, оскільки ми також спостерігали зниження чутливості *C. albicans* до клотримазолу після адаптації до дифеноконазолу.

Слід підкреслити, що останніми роками спостерігається зростання частоти інфекцій, викликаних іншими видами, такими як *C. glabrata* та *C. krusei*, які часто демонструють знижену чутливість до стандартних протигрибкових препаратів [141]. Дані факти повторно підтверджують необхідність більш глибокого дослідження даного питання. *C. glabrata* відзначається підвищеною стійкістю до азолів, що ускладнює лікування таких інфекцій. У нашому дослідженні при визначенні протимікробної дії міконазолу на штами, адаптовані до дифеноконазолу та імазалілу, спостерігалася утворення "подвійної зони": центральної (без росту) та більш широкої (слабкий ріст). Резистентні до дифеноконазолу кандиди зберігали чутливість до триазолів перші 24 години, але через 48 годин зона затримки повністю заростала, що може вказувати на перехресну резистентність у повільноростучих популяцій. Подібну тенденцію зафіксовано для штамів, стійких до імазалілу, але лише щодо воріконазолу.

За нашими даними, клінічний ізолят *C. glabrata* 91 був помірно чутливим до міконазолу та ністатину, а також чутливим до клотримазолу, флуконазолу та воріконазолу. В той час як стаття від Perlin DS та співавторів [154] висвітлює результати дослідження зростання резистентності *C. glabrata* до азолів та ехінокандинів протягом десятиліття, підкреслюючи появу мультирезистентних штамів. За даними авторів – резистентність до флуконазолу у період з 2001 та 2010 р. зросла з 18% до 30%.

За результатами наших експериментальних досліджень було встановлено, що штам *C. krusei* B, який набув резистентність до флутріяфолу, втратив чутливість до імідазолів (міконазолу та клотримазолу), а втрата чутливості до ністатину спостерігалася у штамів даного виду, резистентних до фунгіциду імазалілу. Ці дані частково підтверджують результати інших дослідників, які пояснюють це природною резистентністю *C. krusei* до флуконазолу [141].

Результати літературного аналізу та проведених досліджень підтвердили необхідність обмеження використання аграрних фунгіцидів, зокрема азолів, для

зменшення ризику поширення резистентних форм патогенів та збереження ефективності лікування грибкових інфекцій у клінічній практиці. Встановлений зв'язок між застосуванням фунгіцидів і розвитком резистентності до медичних антимікотиків підкреслює важливість моніторингу резистентності грибів *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* та інших патогенів.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі за результатами експериментальних досліджень здійснено теоретичне узагальнення та досягнуто вирішення важливої наукової та медичної проблеми – встановлено вплив сільськогосподарських фунгіцидів на формування резистентності клінічних штамів грибів до медичних антимікотиків (похідних імідазолів та триазолів).

1. Порівняльно досліджено поширеність резистентності до протигрибкових препаратів серед клінічних штамів та ізолятів з навколишнього середовища на території м. Мадрид (Іспанія). Експериментально доведено, що серед клінічних штамів *A. fumigatus* 3,4% були стійкими до азолів, водночас в ізолятів отриманих з навколишнього середовища даний показник сягав 10,98%. Зроблено аргументоване припущення, що так звані «екологічні» штами являються важливим фактором поширення резистентності серед збудників грибкових інфекцій у клініці.

2. Проведено порівняльний аналіз мутацій, які зумовлюють стійкість до азольних препаратів (ген *sur51A*) та вивчено механізми формування резистентності *A. fumigatus* у клінічних штамів та ізолятів із навколишнього середовища. Ідентифіковано штами *A. fumigatus* з мутаціями в гені *sur51A*, які відповідають за стійкість до азольних препаратів. Встановлено, що мутація TR34/L98H, характерна для ізолятів з навколишнього середовища, може зустрічатись у клінічних ізолятів, що свідчить про спільний механізм формування резистентності. Крім того, показано, що дана мутація є типовою для штамів, які адаптувалися до впливу азольних фунгіцидів, які використовуються у сільському господарстві.

3. Порівняльно вивчено чутливість грибів роду *Candida* до основних фунгіцидних препаратів, які використовуються в аграрній промисловості та показано, що вона є різною і залежить від видових та штамових особливостей досліджуваних культур. Зокрема, клінічні штами *C. albicans* показали найвищу чутливість до пропіконазолу та водночас найбільшу стійкість до прохлоразу.

Штами *C. krusei* і *C. glabrata* продемонстрували найвищу чутливість до тебуконазолу, при цьому *C. krusei* показали найвищу стійкість до прохлоразу, а *C. glabrata* – до флутріафолу.

4. Доведено можливість адаптації (набуття резистентності) кандид до фунгіцидів в умовах експерименту та показано, що цей процес залежить від класу фунгіциду, а також від штамових та видових особливостей використаних у досліді культур мікроорганізмів. В одних випадках, як наприклад у клінічних штамів *C. albicans*, чутливість до тебуконазолу в процесі адаптації зменшувалась у 8 разів, що є свідченням вираженого формування резистентності, в інших, як наприклад у *C. glabrata*, резистентність до флутріафолу не формувалась взагалі.

5. Встановлено, що процес адаптації клінічних ізолятів кандид до фунгіцидних препаратів по-різному впливає можливість набуття ними резистентності до близьких за хімічною формулою лікарських протигрибкових препаратів. В одних випадках відмічається виражене формування перехресної резистентності, в інших, навпаки – підвищення чутливості даної групи мікроорганізмів до основаних антимікотиків, які використовуються для лікування грибкових інфекцій.

6. Встановлено зв'язок між сільськогосподарськими фунгіцидами та розвитком резистентності грибів до медичних антимікотиків. Експериментально доведено, що використання азольних фунгіцидів у рослинництві сприяє селекції резистентних штамів грибів, зокрема *A. fumigatus* і *Candida spp.*, які формують перехресну резистентність до медичних препаратів похідних імідазолів та триазолів. Результати експериментальних досліджень свідчать про те, що застосування пестицидних фунгіцидів у сільському господарстві може сприяти формуванню стійкості у збудників грибкових інфекцій до основних груп антимікотиків, які застосовуються у медичній практиці, що підкреслює необхідність міждисциплінарного підходу для ефективного контролю та запобігання поширенню резистентних

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

З огляду на результати наших досліджень та існуючі виклики у сфері лікування грибкових інфекцій, пропонується комплекс практичних рекомендацій, спрямованих на підвищення ефективності антимікотичної терапії та в контексті впровадження національної програми Antifungal Stewardship (AFS) важливо розробити окремий нормативний акт, який регламентував би AFS як самостійну програму. Програма повинна включати створення міждисциплінарних команд, до складу яких мають входити інфекціоністи, мікробіологи та клінічні фармацевти. Основним завданням цих команд буде контроль призначення антимікотиків, аналіз ефективності лікування та формування локальних протоколів терапії.

Особливу увагу слід приділити регламентації використання фунгіцидів у сільському господарстві. Актуальним є внесення змін до нормативів, що обмежують застосування визначених нами груп азольних фунгіцидів, здатних формувати у грибів перехресну резистентність до медичних антимікотиків.

Результати наших досліджень вказують також на необхідність впровадження EUCAST-скринінгу для визначення чутливості клінічних ізолятів грибів до антимікотиків. Зокрема рекомендується застосовувати метод генотипування TRESPERG для виявлення мутацій у гені *sur51A*, які є маркерами резистентності. Такі заходи дозволять своєчасно виявляти резистентні штами та корегувати тактику лікування.

Для підвищення ефективності контролю над лікуванням грибкових інфекцій слід запровадити систему моніторингу та оцінки ефективності антибіотичної терапії. Рекомендується створити електронну базу даних призначень антимікотиків та випадків резистентності.

Окремо варто підкреслити необхідність розробки та впровадження локальних клінічних протоколів. Вони повинні бути побудовані на основі актуальних рекомендацій ESCMID, ECIL та BOOЗ і включати стандартизовані алгоритми діагностики та лікування грибкових інфекцій.

Таким чином, реалізація запропонованих практичних рекомендацій сприятиме покращенню якості лікування грибкових інфекцій, зниженню рівня

резистентності та наближенню системи охорони здоров'я України до міжнародних стандартів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tortorano, A.M., Peman, J., Bernhardt, H. et al. Epidemiology of Candidaemia in Europe: Results of 28-Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Hospital-Based Surveillance Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23, 317–322 (2004). <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1103-y>
2. European Centre for Disease Prevention and Control. One Health: EU agencies unite to tackle azole fungicide resistance in *Aspergillus* fungi [Internet]. Stockholm: ECDC; 2024 [cited 2025 Mar 10]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/one-health-eu-agencies-unite-tackle-azole-fungicide-resistance-aspergillus-fungi>.
3. Lee HJ, Cho SY, Lee DG, Park C, Chun HS, Park YJ. TR34/L98H mutation in *cyp51A* gene in *A. fumigatus* clinical isolates during posaconazole prophylaxis: first case in Korea. *Mycopathologia*. 2018 Aug;183(4):731–6. doi: 10.1007/s11046-018-0271-8. Epub 2018 Jun 1. PMID: 29858759; PMCID: PMC6096900.
4. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of azole-resistant *A. fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. *PLoS Pathog*. 2013 Oct;9(10):e1003633. doi: 10.1371/journal.ppat.1003633. Epub 2013 Oct 24. Erratum in: *PLoS Pathog*. 2013 Nov;9(11). doi: 10.1371/annotation/4ffcf1da-b180-4149-834c-9c723c5dbf9b. PMID: 24204249; PMCID: PMC3812019.
5. World Health Organization. The top 10 causes of death [Internet]. 2022 [cited 2025 Feb 21]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
6. Paget J, Spreeuwenberg P, Charu V, et al. Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: new burden estimates and predictors from the GLaMOR project. *J Glob Health*. 2019;9(2). doi: 10.7189/jogh.09.020421.
7. Prakash, H., & Chakrabarti, A. (2019). Global Epidemiology of Mucormycosis. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), 5(1), 26. <https://doi.org/10.3390/jof5010026>

8. Bongomin F, Gago S, Oladele R, Richardson MD. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *J Fungi*. 2017;3(4):57.
9. Rokas A. *aspergillus*. *Curr Biol*. 2013 Mar 4;23(5):R187–8. doi: 10.1016/j.cub.2013.01.021. PMID: 23473556.
10. Global Action Fund for Fungal Infections (GAFFI). GAFFI annual report 2020 [Internet]. 2020 [cited 2025 Feb 21]. Available from: <https://gaffidocuments.s3.eu-west-2.amazonaws.com/GAFFI+Annual+report+2020+final+2.pdf>
11. Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, et al. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother*. 2010;66(Suppl 1):i15–24.
12. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*. 2014;70(3):270–7.
13. Denning DW, Cadranel J, Beigelman-Aubry C, et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J*. 2015;47(1):45–68.
14. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of Aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;63(4):e1–60.
15. Kontoyiannis DP. Antifungal resistance: an emerging reality and a global challenge. *J Infect Dis*. 2017 Aug 15;216(Suppl 3):S431–5. doi: 10.1093/infdis/jix179.
16. Meis JF, Chowdhary A, Rhodes JL, Fisher MC, Verweij PE. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *A. fumigatus*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2016;371(1709):20150460. doi: 10.1098/rstb.2015.0460.
17. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Azole-resistant *Aspergillus* [Internet]. 2025 [cited 2025 Feb 21]. Available from: <https://www.cdc.gov/aspergillosis/php/guidance/azole-resistant-aspergillus.html>
18. Linden JW, Camps SM, Kampinga GA, Arends JP, Debets-Ossenkopp YJ, Haas PJ, et al. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *A. fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin Infect Dis*. 2013;57(4):513–20.

19. Buil JB, Snelders E, Denardi LB, Melchers WJG, Verweij PE. Trends in azole resistance in *A. fumigatus*, the Netherlands, 1994–2016. *Emerg Infect Dis*. 2019 Jan;25(1):176–8. doi: 10.3201/eid2501.171925. PMID: 30561296; PMCID: PMC6302600.
20. Wu PF, Liu WL, Hsieh MH, Hii IM, Lee YL, Lin YT, et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-albicans *Candida* species from cancer patients. *Emerg Microbes Infect*. 2017;6:e87.
21. Chatterjee S, Alampalli SV, Nageshan RK, Chettiar ST, Joshi S, Tatu US. Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug-resistant pathogen *Candida auris*. *BMC Genomics*. 2015;16:686.
22. Lamoth F, Lockhart SR, Berkow EL, Calandra T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(Suppl 1):i4–13.
23. Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146909.
24. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 2008 Jan 1;46(1):120–8. doi: 10.1086/524071.
25. Sharma M, Chakrabarti A. Candidiasis and other emerging yeasts. *Curr Fungal Infect Rep*. 2023;17:15–24. doi: 10.1007/s12281-023-00455-3.
26. Castanheira M, et al. Frequency of *C. glabrata* resistance among invasive infections. *PubMed*. 2020.
27. Pappas PG, et al. *C. glabrata* infections in the era of increasing antifungal resistance. *PubMed*. 2021.
28. Arendrup MC, et al. Epidemiology of *C. krusei*: A nationwide survey. *PubMed*. 2019.
29. Pfaller MA, et al. *C. krusei* resistance and mortality: A review. *PubMed*. 2020.
30. Kumamoto CA, Vences MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *C. albicans* virulence. *Cell Microbiol*. 2005;7(11):1546–54.

31. Whiteway M, Oberholzer U. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2004;7(4):350–7.
32. Desai J. *C. albicans* hyphae: from growth initiation to invasion. *J Fungi*. 2018;4(1):10.
33. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *C. albicans*. *Trends Microbiol*. 2004;12(7):317–24.
34. Slaughter BD, Smith SE, Li R. Symmetry breaking in the life cycle of the budding yeast. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(3):a003384.
35. Gale C, Gerami-Nejad M, McClellan M, Vandoninck S, Longtine MS, Berman J. *C. albicans* Int1p interacts with the septin ring in yeast and hyphal cells. *Mol Biol Cell*. 2001;12(11):3538–49.
36. Sudbery PE. Growth of *C. albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(10):737–48.
37. Veses V, Gow NAR. Pseudohypha budding patterns of *C. albicans*. *Med Mycol*. 2009;47(3):268–75.
38. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *C. albicans* during infection. *Eukaryot Cell*. 2003;2(5):1053–60.
39. Westman J, Moran G, Mogavero S, Hube B, Grinstein S. *C. albicans* hyphal expansion causes phagosomal membrane damage and luminal alkalinization. *MBio*. 2018;9(3):e01226-18.
40. Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, Mogavero S, Tang SX, Wernecke J, et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*. 2016;532(7597):64–8.
41. Miller NS, Dick JD, Merz WG. Phenotypic switching in *Candida lusitanae* on copper sulfate indicator agar: association with amphotericin B resistance and filamentation. *J Clin Microbiol*. 2006;44(5):1536–9.
42. Kumar A, Prakash A, Singh A, Kumar H, Hagen F, Meis JF, et al. *Candida haemulonii* species complex: an emerging species in India and its genetic diversity assessed with multilocus sequence and amplified fragment-length polymorphism analyses. *Emerg Microbes Infect*. 2016;5:e49.

43. Porman AM, Hirakawa MP, Jones SK, Wang N, Bennett RJ. MTL-independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for Wor1 in regulating switching and filamentation. PLoS Genet. 2013;9(3):e1003369.
44. Silva S, Rodrigues C, Araújo D, Rodrigues M, Henriques M. *Candida species* biofilms' antifungal resistance. J Fungi. 2017;3(1):8.
45. Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. J Antimicrob Chemother. 2000;46(3):397–403.
46. Ha KC, White TC. Effects of azole antifungal drugs on the transition from yeast cells to hyphae in susceptible and resistant isolates of the pathogenic yeast *C. albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(3):763–8.
47. Hornby JM, Nickerson KW. Enhanced production of farnesol by *C. albicans* treated with four azoles. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(7):2305–7.
48. Bandara HM, Lam OL, Jin LJ, Samaranayake L. Microbial chemical signaling: a current perspective. Crit Rev Microbiol. 2012;38(3):217–49.
49. Dumitru R, Hornby JM, Nickerson KW. Defined anaerobic growth medium for studying *C. albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(8):2350–4.
50. Ben-Ami R, Garcia-Effron G, Lewis RE, Gamarra S, Leventakos K, Perlin DS, et al. Fitness and virulence costs of *C. albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. J Infect Dis. 2011;204(4):626–35.
51. Munro C. *C. albicans* cell wall mediated virulence. In: Pathogenic Yeasts. Dordrecht: Springer; 2009. p. 69–95.
52. Canteri de Souza P, Custódio Caloni C, Wilson D, Sergio Almeida R. An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs. J Fungi (Basel). 2018;4(3):125.
53. Costa CR, Hasimoto e Souza LK, Ataídes FS, Ferri PH, da Costa MP, de Fátima Lisboa Fernandes O, et al. Molecular analysis and dimorphism of azole-susceptible and resistant *C. albicans* isolates. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44(6):740–4.

54. Nobile CJ, Johnson AD. *C. albicans* biofilms and the evolution of antifungal resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(11):758–68.
55. Hoselton S, Samarasinghe A, Seydel J, et al. An inhalation model of airway allergic response to inhalation of environmental *A. fumigatus* conidia in sensitized BALB/c mice. *Med Mycol*. 2010;48(8):1056–65.
56. Baltussen T, Zoll J, Verweij P, et al. Molecular mechanisms of conidial germination in *Aspergillus spp.* *Microbiol Mol Biol Rev*. 2020;84(1):e00049-19. doi: 10.1128/MMBR.00049-19.
57. Rosowski E, Raffa N, Knox B, et al. Macrophages inhibit *A. fumigatus* germination and neutrophil-mediated fungal killing. *PLoS Pathog*. 2018;14(8):e1007229.
58. Sephton-Clark P, Voelz K. Spore germination of pathogenic filamentous fungi. *Adv Appl Microbiol*. 2018;103:117–57. doi: 10.1016/bs.aambs.2017.10.002.
59. Kwon-Chung KJ, Sugui JA, Heitman J. *A. fumigatus*—what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathog*. 2013;9(12):e1003743.
60. Lamarre C, Sokol S, Debeaupuis J, et al. Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *A. fumigatus* conidia. *BMC Genomics*. 2008;9(1):417. doi: 10.1186/1471-2164-9-417.
61. Wang F, Sethiya P, Hu X, et al. Transcription in fungal conidia before dormancy produces phenotypically variable conidia that maximize survival in different environments. *Nat Microbiol*. 2021;6(8):1066–81.
62. Warrilow AGS, Melo N, Martel CM, Parker JE, Nes WD, Kelly SL, et al. Expression, purification, and characterization of *A. fumigatus* sterol 14- α demethylase (CYP51) isoenzymes A and B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4225–34.
63. Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ, Baldwin BC, Kelly DE. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;207(3):910–5.
64. Marichal P, Vanden Bossche H. Mechanisms of resistance to azole antifungals. *Acta Biochim Pol*. 1995;42(3):509–16.

65. Lestrade PPA, Meis JF, Melchers WJG, Verweij PE. Triazole resistance in *A. fumigatus*: recent insights and challenges for patient management. Clin Microbiol Infect. 2019;25(7):799–806.
66. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of azole-resistant *A. fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. PLoS Pathog. 2013;9(10):e1003633.
67. Steinmann J, Hamprecht A, Vehreschild MJ, Cornely OA, Buchheidt D, Spiess B, et al. Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany. J Antimicrob Chemother. 2015;70(6):1522–6.
68. Pelaez T, Monteiro MC, Garcia-Rubio R, Bouza E, Gomez-Lopez A, Mellado E. First detection of *A. fumigatus* azole-resistant strain due to Cyp51A TR46/Y121F/T289A in an azole-naïve patient in Spain. New Microbes New Infect. 2015;6(1):33–4.
69. Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJ, Meis JF. Azole resistance in *A. fumigatus*: can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? Clin Infect Dis. 2016;62(3):362–8.
70. Nywening AV, Rybak JM, Rogers PD, Fortwendel JR. Mechanisms of triazole resistance in *A. fumigatus*. Environ Microbiol. 2020;22(11):4934–52.
71. Chen Y, Li Z, Han X, Tian S, Zhao J, Chen F, et al. Elevated MIC values of imidazole drugs against *A. fumigatus* isolates with TR34/L98H/S297T/F495I mutation. Antimicrob Agents Chemother. 2018 Apr 26;62(5):e01549-17. doi: 10.1128/AAC.01549-17.
72. Risum M, Hare RK, Gertsen JB, Kristensen L, Johansen HK, Helweg-Larsen J, et al. Azole-resistant *A. fumigatus* among Danish cystic fibrosis patients: increasing prevalence and dominance of TR34/L98H. Front Microbiol. 2020 Aug 13;11:1850. doi: 10.3389/fmicb.2020.01850.
73. Hagiwara D, Arai T, Takahashi H, Kusuya Y, Watanabe A, Kamei K. Non-cyp51A azole-resistant *A. fumigatus* isolates with mutation in HMG-CoA reductase. Emerg Infect Dis. 2018;24(10):1889–97.

74. Gonzalez-Jimenez I, Lucio J, Roldan A, Alcazar-Fuoli L, Mellado E. Are point mutations in HMG-CoA reductases (Hmg1 and Hmg2) a step towards azole resistance in *A. fumigatus*? *Molecules*. 2021;26(19):5975.
75. Fraczek MG, Bromley M, Buied A, Moore CB, Rajendran R, Rautemaa R, et al. The *cdr1B* efflux transporter is associated with non-*cyp51A*-mediated itraconazole resistance in *A. fumigatus*. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(7):1486–96.
76. Theesfeld CL, Pourmand D, Davis T, Garza RM, Hampton RY. The sterol-sensing domain (SSD) directly mediates signal-regulated endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase isozyme Hmg2. *J Biol Chem*. 2011;286(29):26298–307.
77. Liang T, Yang X, Li R, Yang E, Wang Q, Oshero N, et al. Emergence of W272C substitution in Hmg1 in a triazole-resistant isolate of *A. fumigatus* from a Chinese patient with chronic cavitary pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(4):e00263-21.
78. Handelsman M, Morogovsky A, Liu W, Ben-Ami R, Oshero N. Triazole-resistant *A. fumigatus* in an Israeli patient with chronic cavitary pulmonary aspergillosis due to a novel E306K substitution in Hmg1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(7):e01089-21.
79. Rybak JM, Ge W, Wiederhold NP, Parker JE, Kelly SL, Rogers PD, et al. Mutations in *hmg1*, challenging the paradigm of clinical triazole resistance in *A. fumigatus*. *mBio*. 2019;10(3):e00437-19.
80. Gsaller F, Hortschansky P, Furukawa T, Carr PD, Rash B, Capilla J, et al. Sterol biosynthesis and azole tolerance is governed by the opposing actions of *SrbA* and the CCAAT binding complex. *PLoS Pathog*. 2016;12(6):e1005775.
81. Greeff SC, Mouton JW. NethMap 2017: consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands/MARAN 2017: monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2016. *RIVM Report*. 2017;2017-0056:149–54.
82. Curto MA, Butassi E, Ribas JC, Svetaz LA, Cortés JCG. Natural products targeting the synthesis of $\beta(1,3)$ -D-glucan and chitin of the fungal cell wall. Existing

drugs and recent findings. *Phytomedicine*. 2021 Jul 15;88:153556. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153556. PMID: 33958276.

83. Ibe C, Munro CA. Fungal cell wall: an underexploited target for antifungal therapies. *PLoS Pathog*. 2021 Apr 22;17(4):e1009470. doi: 10.1371/journal.ppat.1009470. PMID: 33886695; PMCID: PMC8061829.

84. Larwood DJ. Nikkomycin Z—ready to meet the promise? *J Fungi (Basel)*. 2020 Oct 30;6(4):261. doi: 10.3390/jof6040261. PMID: 33143248; PMCID: PMC7712250.

85. Jallow S, Govender NP. Ibrexafungerp: a first-in-class oral triterpenoid glucan synthase inhibitor. *J Fungi (Basel)*. 2021 Feb 25;7(3):163. doi: 10.3390/jof7030163. PMID: 33668824; PMCID: PMC7996284.

86. Mann PA, McLellan CA, Koseoglu S, Si Q, Kuzmin E, Flattery A, et al. Chemical genomics-based antifungal drug discovery: targeting glycosylphosphatidylinositol (GPI) precursor biosynthesis. *ACS Infect Dis*. 2015 Jan 9;1(1):59–72. doi: 10.1021/id5000212. PMID: 26878058; PMCID: PMC4739577.

87. Ivanov M, Kostic M, Stojkovic D, Sokovic M. Rosmarinic acid—modes of antimicrobial and antibiofilm activities of common plant polyphenol. *S Afr J Bot*. 2022;146:521–7.

88. Lv QZ, Yan L, Jiang YY. The synthesis, regulation, and functions of sterols in *C. albicans*: well-known but still lots to learn. *Virulence*. 2016 Aug 17;7(6):649–59. doi: 10.1080/21505594.2016.1188236. PMID: 27221657; PMCID: PMC4991322.

89. Flowers SA, Colón B, Whaley SG, Schuler MA, Rogers PD. Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in *C. albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Jan;59(1):450–60. doi: 10.1128/AAC.03470-14. PMID: 25385095; PMCID: PMC4291385.

90. Prasath KG, Tharani H, Kumar MS, Pandian SK. Palmitic acid inhibits the virulence factors of *Candida tropicalis*: biofilms, cell surface hydrophobicity, ergosterol biosynthesis, and enzymatic activity. *Front Microbiol*. 2020 May 8;11:864. doi: 10.3389/fmicb.2020.00864. PMID: 32457728; PMCID: PMC7226919.

91. Li D, Calderone R. Exploiting mitochondria as targets for the development of new antifungals. *Virulence*. 2017 Feb 17;8(2):159–68. doi: 10.1080/21505594.2016.1188235. PMID: 27191707; PMCID: PMC5354164.
92. Tong Y, Zhang J, Sun N, Wang XM, Wei Q, Zhang Y, et al. Berberine reverses multidrug resistance in *C. albicans* by hijacking the drug efflux pump Mdr1p. *Sci Bull (Beijing)*. 2021 Sep 30;66(18):1895–905. doi: 10.1016/j.scib.2020.12.035. PMID: 36654399.
93. Zhang T, Chen W. The *C. albicans* inhibitory activity of the extract from papaya (*Carica papaya* L.) seed relates to mitochondria dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 25;18(9):1858. doi: 10.3390/ijms18091858. PMID: 28841152; PMCID: PMC5618507.
94. Zheng S, Chang W, Zhang M, Shi H, Lou H. Chiloscypenol A derived from Chinese liverworts exerts fungicidal action by eliciting both mitochondrial dysfunction and plasma membrane destruction. *Sci Rep*. 2018 Jan 10;8(1):326. doi: 10.1038/s41598-017-18717-9. PMID: 29321629; PMCID: PMC5762906.
95. Li Y, Shan M, Zhu Y, Yao H, Li H, Gu B, et al. Kalopanaxsaponin A induces reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction and cell membrane destruction in *C. albicans*. *PLoS One*. 2020 Nov 30;15(11):e0243066. doi: 10.1371/journal.pone.0243066. PMID: 33253287; PMCID: PMC7703927.
96. Yan T, An L, Chen F. Recombinant phage displaying ToAP2D peptide with antifungal activity against *Sporothrix globosa*. *Front Pharmacol*. 2022 Oct 7;13:1022651. doi: 10.3389/fphar.2022.1022651. PMID: 36278206; PMCID: PMC9585229.
97. Holmes AR, Cardno TS, Strouse JJ, Ivnitski-Steele I, Keniya MV, Lackovic K, et al. Targeting efflux pumps to overcome antifungal drug resistance. *Future Med Chem*. 2016 Aug;8(12):1485–501. doi: 10.4155/fmc-2016-0050. PMID: 27463566; PMCID: PMC5827819.
98. Shao J, Zhang M, Wang T, Li Y, Wang C. The roles of *CDR1*, *CDR2*, and *MDR1* in kaempferol-induced suppression with fluconazole-resistant *C. albicans*. *Pharm Biol*. 2016;54(6):984–92. doi: 10.3109/13880209.2015.1091483. PMID: 26459663.

99. Staniszevska M, Kuryk Ł, Gryciuk A, Kawalec J, Rogalska M, Baran J, et al. In vitro anti-*Candida* activity and action mode of benzoxazole derivatives. *Molecules*. 2021 Aug 18;26(16):5008. doi: 10.3390/molecules26165008. PMID: 34443595; PMCID: PMC8398596.
100. Wijnants S, Vreys J, Van Dijck P. Interesting antifungal drug targets in the central metabolism of *C. albicans*. *Trends Pharmacol Sci*. 2022 Jan;43(1):69–79. doi: 10.1016/j.tips.2021.10.003. PMID: 34756759.
101. Ivanov M, Ćirić A, Stojković D. Emerging antifungal targets and strategies. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 2;23(5):2756. doi: 10.3390/ijms23052756. PMID: 35269898; PMCID: PMC8911111.
102. Dell'Olmo E, Gaglione R, Cesaro A, Cafaro V, Teertstra WR, de Cock H, et al. Host defence peptides identified in human apolipoprotein B as promising antifungal agents. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021 Mar;105(5):1953–64. doi: 10.1007/s00253-021-11114-3. PMID: 33576886; PMCID: PMC7907042.
103. Güzel-Akdemir Ö, Carradori S, Grande R, Demir-Yazıcı K, Angeli A, Supuran CT, et al. Development of thiazolidinones as fungal carbonic anhydrase inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 22;21(8):2960. doi: 10.3390/ijms21082960. PMID: 32331447; PMCID: PMC7215574.
104. Kuplińska A, Rząd K. Molecular targets for antifungals in amino acid and protein biosynthetic pathways. *Amino Acids*. 2021 Jul;53(7):961–91. doi: 10.1007/s00726-021-03007-6. PMID: 34081205; PMCID: PMC8241756.
105. Kernien JF, Snarr BD, Sheppard DC, Nett JE. The interface between fungal biofilms and innate immunity. *Front Immunol*. 2018 Jan 10;8:1968. doi: 10.3389/fimmu.2017.01968. PMID: 29375581; PMCID: PMC5767580.
106. Li Z, Nielsen K. Morphology changes in human fungal pathogens upon interaction with the host. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(4):66. doi: 10.3390/jof3040066. PMID: 29333431; PMCID: PMC5753168.
107. Bar-Yosef H, Vivanco Gonzalez N, Ben-Aroya S, Kron SJ, Kornitzer D. Chemical inhibitors of *C. albicans* hyphal morphogenesis target endocytosis. *Sci Rep*. 2017 Jul 18;7(1):5692. doi: 10.1038/s41598-017-05741-y. PMID: 28720834; PMCID: PMC5515890.

108. Feldman M, Sionov RV, Mechoulam R, Steinberg D. Anti-biofilm activity of cannabidiol against *C. albicans*. *Microorganisms*. 2021 Feb 20;9(2):441. doi: 10.3390/microorganisms9020441. PMID: 33672633; PMCID: PMC7924206.
109. Ivanov M, Gašić U, Stojković D, Kostić M, Mišić D, Soković M. New evidence for *Artemisia absinthium* L. application in gastrointestinal ailments: ethnopharmacology, antimicrobial capacity, cytotoxicity, and phenolic profile. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021 Jul 22;2021:9961089. doi: 10.1155/2021/9961089. PMID: 34335850; PMCID: PMC8324356.
110. Ivanov M, Kannan A, Stojković DS, Glamočlija J, Calhelha RC, Ferreira ICFR, et al. Camphor and eucalyptol—anticandidal spectrum, antivirulence effect, efflux pumps interference and cytotoxicity. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 6;22(2):483. doi: 10.3390/ijms22020483. PMID: 33418931; PMCID: PMC7825113.
111. Yan Y, Tan F, Miao H, Wang H, Cao Y. Effect of shikonin against *C. albicans* biofilms. *Front Microbiol*. 2019 May 14;10:1085. doi: 10.3389/fmicb.2019.01085. PMID: 31156594; PMCID: PMC6527961.
112. Szerencsés B, Gácsér A, Endre G, Domonkos I, Tiricz H, Vágvölgyi C, et al. Symbiotic NCR peptide fragments affect the viability, morphology and biofilm formation of *Candida* species. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 1;22(7):3666. doi: 10.3390/ijms22073666. PMID: 33915930; PMCID: PMC8037406.
113. Folly MLC, Ferreira GF, Salvador MR, Sathler AA, da Silva GF, Santos JCB, et al. Evaluation of *in vitro* antifungal activity of *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. (Salicaceae) leaves against *Cryptococcus* spp. *Front Microbiol*. 2020 Feb 6;10:3114. doi: 10.3389/fmicb.2019.03114. PMID: 32117083; PMCID: PMC7015862.
114. Tso GHW, Reales-Calderon JA, Pavelka N. The elusive anti-*Candida* vaccine: lessons from the past and opportunities for the future. *Front Immunol*. 2018 Apr 27;9:897. doi: 10.3389/fimmu.2018.00897. PMID: 29755472; PMCID: PMC5934487.
115. Ambati S, Ellis EC, Pham T, Lewis ZA, Lin X, Meagher RB. Antifungal liposomes directed by Dectin-2 offer a promising therapeutic option for pulmonary aspergillosis. *mBio*. 2021 Feb 23;12(1):e00030-21. doi: 10.1128/mBio.00030-21. PMID: 33622715; PMCID: PMC8545082.

116. Ambati S, Ferarro AR, Kang SE, Lin J, Lin X, Momany M, et al. Erratum for Ambati et al., "Dectin-1-targeted antifungal liposomes exhibit enhanced efficacy". mSphere. 2019 Mar 6;4(2):e00121-19. doi: 10.1128/mSphere.00121-19. PMID: 30842270; PMCID: PMC6403456.

117. Ambati S, Ellis EC, Lin J, Lin X, Lewis ZA, Meagher RB. Dectin-2-targeted antifungal liposomes exhibit enhanced efficacy. mSphere. 2019 Oct 30;4(5):e00715-19. doi: 10.1128/mSphere.00715-19. PMID: 31666315; PMCID: PMC6821932.

118. Ambati S, Ferarro AR, Kang SE, Lin J, Lin X, Momany M, et al. Dectin-1-targeted antifungal liposomes exhibit enhanced efficacy. mSphere. 2019 Feb 13;4(1):e00025-19. doi: 10.1128/mSphere.00025-19. PMID: 30760610; PMCID: PMC6374590.

119. World Health Organization. 10 global health issues to track in 2021 [Internet]. Geneva: WHO; 2020 [cited 2025 Feb 21]. Available from: <https://www.who.int/news-room/spotlight/10-global-health-issues-to-track-in-2021>.

120. One Health Initiative. One Health Initiative об'єднає людську та ветеринарну медицину [Internet] [cited 2025 Feb 21]. Available from: <http://www.onehealthinitiative.com>.

121. Trinh P, Zaneveld JR, Safranek S, Rabinowitz PM. One Health relationships between human, animal, and environmental microbiomes: a mini-review. Front Public Health. 2018;6:235.

122. MOZ Ukrayiny. Metodychni rekomendatsiyi «Vyvchennya spetsyfichnoyi aktyvnosti antyfunhal'nykh likars'kykh zasobiv». Kyiv: Ministerstvo okhorony zdorov'ya Ukrayiny, DP «Derzhavnyy ekspertnyy tsentr MOZ Ukrayiny»; 2016. 60 p. Ukrainian.

123. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. 3rd ed. CLSI guideline M44. Wayne: CLSI; 2018.

124. Tang CM, Cohen J, Holden DW. An *A. fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity. Mol

- Microbiol [Internet]. 1992 [cited 2021 Feb 18];6(12):1663–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1495393/>
125. Dykstra MJ, Reuss LE. Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003. p. 535.
126. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot Cell [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2020 Sep 28];4(3):625–32. Available from: www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1
127. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, Pemán J, Zapico S, Alvarez M, et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP study). Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2013 [cited 2020 Sep 3];57(7):3380–7. Available from: www.eucast.org/clinical_breakpoints/
128. National Center for Biotechnology Information (NCBI). GenBank [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>
129. Guinea J, Verweij PE, Meletiadis J, Mouton JW, Barchiesi F, Arendrup MC, et al. How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *A. fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates. Clin Microbiol Infect. 2019;25(6):681–7.
130. Lucio J, Gonzalez-Jimenez I, Garcia-Rubio R, Cuetara MS, Mellado E. An expanded agar-based screening method for azole-resistant *A. fumigatus*. Mycoses. 2022;65(2):118–25.
131. Guinea J, Meletiadis J, Arikan-Akdagli S, Muehlethaler K. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming molds. EUCAST E.Def 9.4. 2022 Feb.
132. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents v10 [Internet]. 2020 [cited 2025 Feb 21]. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf

133. Garcia-Rubio R, Gil H, Monteiro MC, Pelaez T, Mellado E. A new *A. fumigatus* typing method based on hypervariable tandem repeats located within exons of surface protein coding genes (TRESP). PLoS One. 2016;11(10):e0163862.
134. Garcia-Rubio R, Escribano P, Gomez A, Guinea J, Mellado E. Comparison of two highly discriminatory typing methods to analyze *A. fumigatus* azole resistance. Front Microbiol. 2018;9:1565.
135. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcázar-Fuoli L, Melchers WJG, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, et al. A new *A. fumigatus* resistance mechanism conferring *in vitro* cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(6):1897–904.
136. Wang X, Bing J, Zheng Q, Zhang F, Liu J, Yue H, et al. The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects. Emerg Microbes Infect. 2018;7(1):93.
137. Kim SH, Iyer KR, Pardeshi L, Muñoz JF, Robbins N, Cuomo CA, et al. Genetic analysis of *Candida auris* implicates Hsp90 in morphogenesis and azole tolerance and Cdr1 in azole resistance. mBio. 2019;10(3):e02529-18.
138. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. Microbiol Mol Biol Rev. 2011;75(2):213–67.
139. Murad AM, Leng P, Straffon M, Wishart J, Macaskill S, MacCallum D, et al. *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *C. albicans*. EMBO J. 2001;20(17):4742–52.
140. Mahmoud DE, Hérivaux A, Morio F, Briard B, Vigneau C, Desoubeaux G, et al. The epidemiology of invasive fungal infections in transplant recipients. Biomed J. 2024 Jun;47(3):100719. doi: 10.1016/j.bj.2024.100719.
141. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, et al. Frequency and evolution of azole resistance in *A. fumigatus* associated with treatment failure. Emerg Infect Dis. 2009;15(7):1068–76. doi: 10.3201/eid1507.090043.

142. Bosetti D, Neofytos D. Invasive aspergillosis and the impact of azole resistance. *Curr Fungal Infect Rep.* 2023;18(1):1–10. doi: 10.1007/s12281-023-00467-9.
143. van der Linden JW, Arendrup MC, Warris A, Lagrou K, Pelloux H, Hauser PM, Chrysanthou E, Mellado E, Kidd SE, Tortorano AM, Dannaoui E, Gaustad P, Baddley JW, Uekötter A, Lass-Flörl C, Klimko N, Moore CB, Denning DW, Pasqualotto AC, Kibbler C, Arikan-Akdogli S, Andes D, Meletiadis J, Naumiuk L, Nucci M, Melchers WJ, Verweij PE. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis.* 2015 Jun;21(6):1041-4. doi: 10.3201/eid2106.140717. PMID: 25988348; PMCID: PMC4451897.
144. Escribano P, Rodríguez-Sánchez B, Díaz-García J, Martín-Gómez MT, Ibáñez-Martínez E, Rodríguez-Mayo M, et al. Azole resistance survey on clinical *Aspergillus fumigatus* isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(8):1107.e1-1107.e7.
145. Thompson GR 3rd, Young JH. *Aspergillus* infections. *N Engl J Med.* 2021;385(16):1496–509. doi: 10.1056/NEJMra2027424.
146. Snelders E, Huis in 't Veld RA, Rijs AJ, Kema GH, Melchers WJ, Verweij PE. Possible environmental origin of resistance of *A. fumigatus* to medical triazoles in a patient with aspergillosis. *PLoS Med.* 2008;5(11):e219. doi: 10.1371/journal.pmed.0050219.
147. Prigitano A, Esposto MC, Romanò L, Lo Cascio G, De Carolis E, Torelli R, et al. Azole resistance in *A. fumigatus* clinical isolates from an Italian culture collection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Dec;59(12):7588–92. doi: 10.1128/AAC.02234-15.
148. Garcia-Rubio R, Escribano P, Gomez A, Guinea J, Mellado E. Comparison of two highly discriminatory typing methods to analyze *A. fumigatus* azole resistance. *Front Microbiol.* 2018;9:1626. doi: 10.3389/fmicb.2018.01626.
149. Ogawa M, Niki M, Imoto W, Dobashi A, Imai M, Takayama N, et al. Characterization of *Aspergillus* spp. isolated from patients with coronavirus disease

2019. J Infect Chemother. 2023 Jun;29(6):580–5. doi: 10.1016/j.jiac.2023.02.001. PMID: 36758677; PMCID: PMC9904853.

150. Lucio J, Alcazar-Fuoli L, Gil H, Cano-Pascual S, Hernandez-Egido S, Cuetara MS, et al. Distribution of *Aspergillus* species and prevalence of azole resistance in clinical and environmental samples from a Spanish hospital during a three-year study period. Mycoses. 2024 Apr;67(4):e13719. doi: 10.1111/myc.13719. PMID: 38551063.

151. Smith EL, Jones MR. The environmental impact of fungicide use in modern agriculture: challenges and solutions. Environ Sci Policy. 2020;45:123–36.

152. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. Eukaryot Cell. 2011;10(9):1173–82.

153. Frej-Mądrzak M, Golec S, Włodarczyk K, Choroszy-Król I, Nawrot U. Susceptibility to clotrimazole of *Candida* spp. isolated from the genitourinary system—a single-center study. Pathogens. 2021 Sep 4;10(9):1142. doi: 10.3390/pathogens10091142. PMID: 34578174; PMCID: PMC8467132.

154. Perlin DS, et al. Parallel rise in azole and echinocandin resistance in *C. glabrata* bloodstream isolates over a 10-year period, showing emergence of multidrug-resistant strains. Lancet Infect Dis. 2017;17(12):e383–92.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор закладу вищої освіти
з науково - педагогічної та
навчальної роботи Вінницького
національного медичного
університету ім. М. І. Пирогова
МОЗ України, професор



Інна АНДРУШКО
02 2025 р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів наукових досліджень

1. Назва наукової розробки, яка впроваджується: Набуття лікарської стійкості патогенних грибів під впливом фунгіцидних пестицидів.
2. Установа-розробник: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, бульвар Шевченка, 13, м. Київ, 01601, Україна
Розробник: Гринзовська Анастасія Анатоліївна.

Джерела інформації:

1. Hrynzovska A.A., Bobir V.V., Shirobokov V.P., Vovk I.M., Poniatovsky V.A., Nazarchuk O.A. (2025) ANTIFUNGAL THERAPY AND PESTICIDES: IS THERE A CONNECTION? Clinical and Preventive Medicine, №2(2025). Available from: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.2.2025.17>
2. Hrynzovska A., & Bobyr, V. (2024). NEW STRATEGIES IN COMBATING FUNGAL PATHOGENS. Medical Science of Ukraine (MSU), 20(2), 115-125. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.2.2024.14>
3. Hrynzovska A, Bobyr V. Formation of resistance of *Candida* fungi to fungicidal drugs. USMYJ [Internet]. 2024Jun.27 [cited 2024Jul.4];146(2):60-7. Available from: <https://mmj.nmuofficial.com/index.php/journal/article/view/398>
4. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2024) STUDY OF THE SENSITIVITY OF *CANDIDA* ADAPTED TO FUNGICIDES TO MEDICAL ANTIFUNGAL DRUGS «Bulletin of problems biology and medicine», 2024 Issue 2, 173, 348-357 pages, index UDC 615.282.015.8:579.61. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2024-2-173-348-357>
5. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2023) Формування механізмів перехресної резистентності *A. fumigatus* за рахунок хімічної подібності азольних антимікотиків та фунгіцидів. Україна. Здоров'я нації, № 3, 27-33. <https://doi.org/10.32782/2077-6594/2023.3/04>
6. Гринзовська А.А., Бобир В.В., Вовк І.М., Назарчук О.А. (2023) Структурно-морфологічні зміни грибів роду *Candida* в процесі штучного формування у них резистентності до азолів. Перспективи та інновації науки, №14(32), 941-955. [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14\(32\)-941-955](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14(32)-941-955)
7. Гринзовська, А., & Бобир, В. (2023). Сучасні погляди на проблему антимікотикорезистентності штамів грибів родів *Fusarium* та *Aspergillus* в розрізі концепції One Health. Український науково-медичний молодіжний журнал, 141(3), 103-111. [https://doi.org/10.32345/USMYJ.3\(141\).2023.103-111](https://doi.org/10.32345/USMYJ.3(141).2023.103-111)

3. Базова установа, яка проводить впровадження: Заклад вищої освіти Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України, кафедра мікробіології (протокол засідання № 8 від 20 лютого 2025 р.).
4. Термін впровадження: 2025 р.
5. Форма впровадження: у навчальний процес кафедри мікробіології в матеріали лекцій та практичних занять, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. Ефективність впровадження: Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі забезпечують поглиблення знань здобувачів вищої освіти щодо механізмів формування протигрибкової резистентності, впливу аграрних азольних пестицидів на поширення резистентних штамів грибів та значення цих процесів для ефективності лікування грибкових інфекцій, зокрема у пацієнтів з імунodefіцитом.

Відповідальний за впровадження: к.мед.н., доцент ЗВО

Ірина ВОВК

Завідувач кафедри мікробіології ЗВО
Вінницький національний медичний
університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України,
д.мед.н., професор

Валентин КОВАЛЬЧУК

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з наукової роботи та
інновацій **Національного**
медичного університету імені
О.О.Богомольця МОЗ України,
професор
Земсков С.В.
«17»  2025 р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
Результатів наукових досліджень

1. **Назва наукової розробки, яка впроваджується:** Набуття лікарської стійкості патогенних грибів під впливом фунгіцидних пестицидів.
2. **Установа-розробник:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, вул. Бульвар Тараса Шевченка, 13, м. Київ, 01601, Україна

Розробник: Гринзовська Анастасія Анатоліївна.

Джерела інформації:

1. Hrynzovska A.A., Bobir V.V., Shirobokov V.P., Vovk I.M., Poniatovsky V.A., Nazarchuk O.A. (2025) ANTIFUNGAL THERAPY AND PESTICIDES: IS THERE A CONNECTION? Clinical and Preventive Medicine, №2(2025). Available from: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.2.2025.17>

2. Hrynzovska A., & Bobyr, V. (2024). NEW STRATEGIES IN COMBATING FUNGAL PATHOGENS. Medical Science of Ukraine (MSU), 20(2), 115-125. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.2.2024.14>

3. Hrynzovska A, Bobyr V. Formation of resistance of *Candida* fungi to fungicidal drugs. USMYJ [Internet]. 2024Jun.27 [cited 2024Jul.4];146(2):60-7. Available from: <https://mmj.nmuofficial.com/index.php/journal/article/view/398>

4. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2024) STUDY OF THE SENSITIVITY OF *CANDIDA* ADAPTED TO FUNGICIDES TO MEDICAL ANTIFUNGAL DRUGS «Bulletin of problems biology and medicine», 2024 Issue 2, 173, 348-357 pages, index UDC 615.282.015.8:579.61. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2024-2-173-348-357>

5. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2023) Формування механізмів перехресної резистентності *A. fumigatus* за рахунок хімічної подібності азольних антимікотиків та фунгіцидів. Україна. Здоров'я нації, № 3, 27-33. <https://doi.org/10.32782/2077-6594/2023.3/04>

6. Гринзовська А.А., Бобир В.В., Вовк І.М., Назарчук О.А. (2023) Структурно-морфологічні зміни грибів роду *Candida* в процесі штучного формування у них резистентності до азолів. Перспективи та інновації науки, №14(32), 941-955. [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14\(32\)-941-955](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14(32)-941-955)

7. Гринзовська, А., & Бобир, В. (2023). Сучасні погляди на проблему антимікотикорезистентності штамів грибів родів *Fusarium* та *Aspergillus* в розрізі концепції One Health. Український науково-медичний молодіжний журнал, 141(3), 103-111. [https://doi.org/10.32345/USMYJ.3\(141\).2023.103-111](https://doi.org/10.32345/USMYJ.3(141).2023.103-111)

3. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Заклад вищої освіти Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, кафедра мікробіології та паразитології з основами імунології.
4. **Термін впровадження:** 2025 р.
5. **Форма впровадження:** у навчальний процес кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології, в матеріали лекцій та практичних занять, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. **Ефективність впровадження:** Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі забезпечують поглиблення знань здобувачів вищої освіти щодо механізмів формування протигрибкової резистентності, впливу аграрних азолових пестицидів на поширення резистентних штамів грибів та значення цих процесів для ефективності лікування грибкових інфекцій, зокрема у пацієнтів з імунодефіцитом.

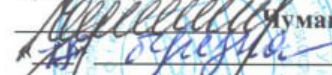
Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри мікробіології
та паразитології з основами імунології
Національного медичного університету
імені О.О. Богомольця МОЗ України,
академік НАН та НАМН України,
д.мед.н., професор



Володимир ШИРОБОКОВ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний державний санітарний лікар міста Києва, генеральний директор ДУ «Київський міський ЦКПХ МОЗ»


Чумак С.П. 2025 р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів наукових досліджень

1. **Назва наукової розробки, яка впроваджується:** Набуття лікарської стійкості патогенних грибів під впливом фунгіцидних пестицидів.
2. **Установа-розробник:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, бульвар Т.Шевченка, 13, м. Київ, 01601, Україна
Розробник: Гринзовська Анастасія Анатоліївна.

Джерела інформації:

1. Hrynzovska A.A., Bobir V.V., Shirobokov V.P., Vovk I.M., Poniatovsky V.A., Nazarchuk O.A. (2025) ANTIFUNGAL THERAPY AND PESTICIDES: IS THERE A CONNECTION? Clinical and Preventive Medicine, №2(2025). Available from: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.2.2025.17>
2. Hrynzovska A., & Bobyr, V. (2024). NEW STRATEGIES IN COMBATING FUNGAL PATHOGENS. Medical Science of Ukraine (MSU), 20(2), 115-125. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.2.2024.14>
3. Hrynzovska A, Bobyr V. Formation of resistance of *Candida* fungi to fungicidal drugs. USMYJ [Internet]. 2024Jun.27 [cited 2024Jul.4];146(2):60-7. Available from: <https://mmj.nmuofficial.com/index.php/journal/article/view/398>
4. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2024) STUDY OF THE SENSITIVITY OF *CANDIDA* ADAPTED TO FUNGICIDES TO MEDICAL ANTIFUNGAL DRUGS «Bulletin of problems biology and medicine», 2024 Issue 2, 173, 348-357 pages, index UDC 615.282.015.8:579.61. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2024-2-173-348-357>
5. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2023) Формування механізмів перехресної резистентності *A. fumigatus* за рахунок хімічної подібності азольних антимікотиків та фунгіцидів. Україна. Здоров'я нації, № 3, 27-33. <https://doi.org/10.32782/2077-6594/2023.3/04>
6. Гринзовська А.А., Бобир В.В., Вовк І.М., Назарчук О.А. (2023) Структурно-морфологічні зміни грибів роду *Candida* в процесі штучного формування у них резистентності до азолів. Перспективи та інновації науки, №14(32), 941-955. [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14\(32\)-941-955](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14(32)-941-955)
7. Гринзовська, А., & Бобир, В. (2023). Сучасні погляди на проблему антимікотикорезистентності штамів грибів родів *Fusarium* та *Aspergillus* в розрізі концепції One Health. Український науково-медичний молодіжний журнал, 141(3), 103-111. [https://doi.org/10.32345/USMYJ.3\(141\).2023.103-111](https://doi.org/10.32345/USMYJ.3(141).2023.103-111)
3. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Державна установа "Київський міський центр контролю та профілактики хвороб Міністерства охорони здоров'я України", відділення антимікробної резистентності та інфекційного контролю.
4. **Термін впровадження:** 2024-2025 р.
5. **Форма впровадження:** у навчальний процес кафедри мікробіології, вірусології та імунології, в матеріали лекцій та практичних занять, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. **Ефективність впровадження:** Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі забезпечують поглиблення знань здобувачів вищої освіти щодо механізмів формування протигрибкової резистентності, впливу аграрних азолових пестицидів на поширення резистентних штамів грибів та значення цих процесів для ефективності лікування грибкових інфекцій, зокрема у пацієнтів з імунodefіцитом.

Відповідальна за впровадження:

Завідувачка відділення антимікробної резистентності та інфекційного контролю ДУ «Київський міський ЦКПХ МОЗ»



Наталія ТУРІ



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів наукових досліджень

1. Назва наукової розробки, яка впроваджується: Визначення впливу азольних фунгіцидів на розвиток антибіотикорезистентності в умовно-патогенних для людини мікроскопічних грибів.

2. Установа-розробник: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, бульвар Т.Шевченка, 13, м. Київ, 01601, Україна.

3. Розробник: Гринзовська Анастасія Анатоліївна.

4. Джерела інформації:

• Hrynzovska A.A., Bobir V.V., Shirobokov V.P., Vovk I.M., Poniatovsky V.A., Nazarchuk O.A. (2025) Antifungal therapy and pesticides: is there a connection?. Clinical and Preventive Medicine. 2025;2 doi:10.31612/2616-4868.2.2025.17.

• Hrynzovska A.A., Bobyr V.V. New strategies in combating fungal pathogens. Medical Science of Ukraine (MSU). 2024 Jun 30;20(2):115–25. doi:10.32345/2664-4738.2.2024.14.

• Hrynzovska A., Bobyr V. Formation of resistance of candida fungi to fungicidal drugs. The Ukrainian Scientific Medical Youth Journal. 2024 Jun 27;146(2):60–7. doi:10.32345/usmyj.2(146).2024.60-67.

• Hrynzovska A.A., Bobyr V.V. Study of the sensitivity of candida adapted to fungicides to Medical Antifungal Drugs. Bulletin of Problems Biology and Medicine. 2024;1(1):348. doi:10.29254/2077-4214-2024-2-173-348-357.

• Гринзовська А.А., Бобир В.В. Формування механізмів перехресної резистентності *A. fumigatus* за рахунок хімічної подібності азольних антимікотиків та фунгіцидів. Україна. Здоров'я нації. 2023; 3: 27-33. doi:10.32782/2077-6594/2023.3/04.

• Гринзовська А.А., Бобир В.В., Вовк І.М., Назарчук О.А. Структурно-морфологічні зміни грибів роду *Candida* в процесі штучного формування у них резистентності до азолів. Перспективи та інновації науки. 2023;14(32): 941-955. doi:10.52058/2786-4952-2023-14(32)-941-955.

• Гринзовська, А., Бобир, В. Сучасні погляди на проблему антимікотикорезистентності штамів грибів родів *Fusarium* та *Aspergillus* в розрізі концепції One Health. Український науково-медичний молодіжний журнал. 2023;141(3): 103-111. doi:10.32345/USMYJ.3(141).2023.103-111.

5. Базова установа, яка проводить впровадження: Заклад вищої освіти Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, Інститут гігієни та екології.

6. Термін впровадження: 2024 – 2025 р.

7. Форма впровадження: у науково-дослідну роботу Інституту гігієни та екології НМУ імені О.О. Богомольця при токсиколого-гігієнічній оцінці пестицидів в рамках проведення їх випробовувань з метою державної реєстрації засобів захисту рослин.

8. Ефективність впровадження: Отримані результати аналізу впливу азольних фунгіцидів на умовно-патогенні для людини мікроскопічні гриби дозволяють не лише оцінити в повній мірі безпеку застосування певних фунгіцидів у сільському господарстві, але й сприятимуть розробці національних та міжнародних рекомендацій щодо обмеження або контролю їх використання. Результати такого аналізу підвищать науковий авторитет Інституту в міжгалузевих проектах, що стосуються аграрної сфери та охорони здоров'я, і сприятимуть налагодженню співпраці з медичними установами, лабораторіями мікробіологічного профілю та міжнародними організаціями, які опікуються проблемою антимікробної резистентності.

Відповідальний за впровадження:
Директор ІГЕ НМУ,
член-кореспондент НАНМ України,
д.мед.н., професор

Сергій ОМЕЛЬЧУК

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково-педагогічної роботи

Полтавський державний медичний університет МОЗ України,

професор

Валентин ДВОРНИК

2025 р



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів наукових досліджень

1. **Назва наукової розробки, яка впроваджується:** Набуття лікарської стійкості патогенних грибів під впливом фунгіцидних пестицидів.
2. **Установа-розробник:** Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця МОЗ України, б. Тараса Шевченка, 13, м. Київ, 01601, Україна
Розробник: Гринзовська Анастасія Анатоліївна.
Джерела інформації:
 1. Hrynzovska A.A., Bobir V.V., Shirobokov V.P., Vovk I.M., Poniatovsky V.A., Nazarchuk O.A. (2025) ANTIFUNGAL THERAPY AND PESTICIDES: IS THERE A CONNECTION? Clinical and Preventive Medicine. №2(2025). Available from: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.2.2025.17>
 2. Hrynzovska A., & Bobyr, V. (2024). NEW STRATEGIES IN COMBATING FUNGAL PATHOGENS. Medical Science of Ukraine (MSU), 20(2), 115-125. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.2.2024.14>
 3. Hrynzovska A., Bobyr V. Formation of resistance of *Candida* fungi to fungicidal drugs. USMYJ [Internet]. 2024Jun.27 [cited 2024Jul.4];146(2):60-7. Available from: <https://mmj.nmuofficial.com/index.php/journal/article/view/398>
 4. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2024) STUDY OF THE SENSITIVITY OF *CANDIDA* ADAPTED TO FUNGICIDES TO MEDICAL ANTIFUNGAL DRUGS «Bulletin of problems biology and medicine», 2024 Issue 2, 173-348-357 pages, index UDC 615.282.015.8:579.61. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2024-2-173-348-357>
 5. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2023) Формування механізмів перехресної резистентності *A. fumigatus* за рахунок хімічної подібності азольних антимікотиків та фунгіцидів. Україна. Здоров'я нації, № 3, 27-33. <https://doi.org/10.32782/2077-6594/2023.3.04>
 6. Гринзовська А.А., Бобир В.В., Вовк І.М., Назарчук О.А. (2023) Структурно-морфологічні зміни грибів роду *Candida* в процесі штучного формування у них резистентності до азолів. Перспективи та інновації науки. №14(32), 941-955. [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14\(32\)-941-955](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14(32)-941-955)
 7. Гринзовська, А., & Бобир, В. (2023). Сучасні погляди на проблему антимікотикорезистентності штамів грибів родів *Fusarium* та *Aspergillus* в розрізі концепції One Health. Український науково-медичний молодіжний журнал, 141(3), 103-111. [https://doi.org/10.32345/USMYJ.3\(141\).2023.103-111](https://doi.org/10.32345/USMYJ.3(141).2023.103-111)
3. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Заклад вищої освіти Полтавський державний медичний університет МОЗ України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології.
4. **Термін впровадження:** 2025 р.
5. **Форма впровадження:** у навчальний процес кафедри мікробіології, вірусології та імунології, в матеріали лекцій та практичних занять, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. **Ефективність впровадження:** Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі забезпечують поглиблення знань здобувачів вищої освіти щодо механізмів формування протигрибкової резистентності, впливу аграрних азолових пестицидів на поширення резистентних штамів грибів та значення цих процесів для ефективності лікування грибкових інфекцій, зокрема у пацієнтів з імунодефіцитом.
7. **Обговорено та затверджено** на засіданні кафедри мікробіології, вірусології та імунології ПДМУ №13 від 19.02. 2025 р.

Відповідальна за впровадження:

завідувач кафедри мікробіології,
вірусології та імунології

Полтавський державний медичний університет,
д.мед.н., професор

Галина ЛОБАНЬ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з науково-педагогічної
роботи
Одеський національний медичний
університет МОЗ України,
професор
С. І. Котюжинська
« 4 » березня 2025 р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів наукових досліджень

1. Назва наукової розробки, яка впроваджується: Набуття лікарської стійкості патогенних грибів під впливом фунгіцидних пестицидів.
2. Установа-розробник: Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Бульвар Тараса Шевченка, 13, м. Київ, 01601, Україна
Розробник: Гринзовська Анастасія Анатоліївна.
Джерела інформації:
 1. Hrynzovska A.A., Bobir V.V., Shirobokov V.P., Vovk I.M., Poniatovsky V.A., Nazarchuk O.A. (2025) ANTIFUNGAL THERAPY AND PESTICIDES: IS THERE A CONNECTION? Clinical and Preventive Medicine, №2(2025). Available from: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.2.2025.17>
 2. Hrynzovska A., & Bobyr, V. (2024). NEW STRATEGIES IN COMBATING FUNGAL PATHOGENS. Medical Science of Ukraine (MSU), 20(2), 115-125. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.2.2024.14>
 3. Hrynzovska A., Bobyr V. Formation of resistance of *Candida* fungi to fungicidal drugs. USMYJ [Internet]. 2024Jun.27 [cited 2024Jul.4];146(2):60-7. Available from: <https://mmj.nmuofficial.com/index.php/journal/article/view/398>
 4. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2024) STUDY OF THE SENSITIVITY OF *CANDIDA* ADAPTED TO FUNGICIDES TO MEDICAL ANTIFUNGAL DRUGS «Bulletin of problems biology and medicine», 2024 Issue 2, 173, 348-357 pages, index UDC 615.282.015.8:579.61. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2024-2-173-348-357>
 5. Гринзовська А.А., Бобир В.В. (2023) Формування механізмів перехресної резистентності *A. fumigatus* за рахунок хімічної подібності азольних антимікотиків та фунгіцидів. Україна. Здоров'я нації, № 3, 27-33. <https://doi.org/10.32782/2077-6594/2023.3/04>
 6. Гринзовська А.А., Бобир В.В., Вовк І.М., Назарчук О.А. (2023) Структурно-морфологічні зміни грибів роду *Candida* в процесі штучного формування у них резистентності до азолів. Перспективи та інновації науки, №14(32), 941-955. [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14\(32\)-941-955](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14(32)-941-955)
 7. Гринзовська, А., & Бобир, В. (2023). Сучасні погляди на проблему антимікотикорезистентності штамів грибів родів *Fusarium* та *Aspergillus* в розрізі концепції One Health. Український науково-медичний молодіжний журнал, 141(3), 103-111. [https://doi.org/10.32345/USMYJ.3\(141\).2023.103-111](https://doi.org/10.32345/USMYJ.3(141).2023.103-111)
3. Базова установа, яка проводить впровадження: Заклад вищої освіти Одеський національний медичний університет МОЗ України, кафедра гігієни, медичної екології та громадського здоров'я.
4. Термін впровадження: 2024-2025 н.р.
5. Форма впровадження: у навчальний процес кафедри гігієни, медичної екології та громадського здоров'я, в матеріали лекцій та практичних занять, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. Ефективність впровадження: Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі забезпечують поглиблення знань здобувачів вищої освіти щодо механізмів формування впливу аграрних азолових пестицидів на поширення резистентних штамів грибів та значення цих процесів для ефективності профілактики грибкових інфекцій, зокрема у пацієнтів з імунodefіцитом.

Відповідальна за впровадження:

завідувачка кафедри гігієни,
медичної екології та громадського здоров'я
Одеський національний медичний університет,
д.мед.н., професор

Володимир БАБІСНКО