

EDITORIAL BOARD

Chief Editor —

N.P. Yelinov — Ph.D., prof. (Russia)

Deputies Chief Editor —

N.V. Vasilyeva — Ph.D., prof. (Russia)

N.N.Klimko — M.D., prof. (Russia)

Responsible secretary —

T.S. Bogomolova — Ph.D. (Russia)

SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD

R.A. Araviyskiy — M.D., prof. (Russia), N.A. Belyakov — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), J. Bennett — M.D. (USA), S.A. Burova — M.D., prof. (Russia), B. Dupont — M.D. (France), O.G. Hurzilava — M.D. (Russia), V.I. Golubev — Ph.D. (Russia), K.P. Kashkin — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), V.G. Kubas' — M.D., prof. (Russia), V.M. Leschenko — M.D., prof. (Russia), A.V. Lipnizky — M.D., prof. (Russia), V.I. Mazurov — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), Iu.A. Medvedev — M.D., prof. (Russia), A.K. Mirzabalaeva — M.D., prof. (Russia), S.M. Ozerskaya — Ph.D. (Russia), I. Polachek — M.D. (Israel), A.G. Rakhmanova — M.D., prof. (Russia), K.I. Raznatovsky — M.D., prof. (Russia), F.P. Romanyuk — M.D., prof. (Russia), A.V. Samzov — M.D., prof. (Russia), N.V. Shabashova — M.D., prof. (Russia), M.A. Shevyakov — M.D., prof. (Russia), A.V. Sobolev — M.D., prof. (Russia), A.A. Stepanova — Ph.D. (Russia), H.J. Tietz — M.D. (Germany), T.N. Trofimova — M.D., prof. (Russia), M.A. Viviani — M.D. (Italy), V.A. Zinzerling — M.D., prof. (Russia)

PROBLEMS IN MEDICAL MYCOLOGY

Vol. 14, № 4, 2012

North-Western State Medical University
named after I.I. Mechnikov
Kashkin Research Institute
of Medical Mycology (KRI MM)

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 14, № 4, 2012

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)
Научно-исследовательский институт
медицинской микологии им. П.Н.Кашкина
(НИИ ММ)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор —

Н.П. Елинов — д.б.н., профессор (Россия)

Заместители главного редактора:

Н.В. Васильева — д.б.н., профессор (Россия),

Н.Н. Климко — д.м.н., профессор (Россия)

Ответственный секретарь —

Т.С. Богомолова — к.б.н. (Россия)

НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Р.А. Аравийский — д.м.н., профессор (Россия),
Н.А. Беляков — д.м.н., акад. РАМН, профессор (Россия),
Дж. Беннетт — доктор медицины (США), С.А. Бурова —
д.м.н., профессор (Россия), М.А. Вивиани — доктор
медицины (Италия), В.И. Голубев — д.б.н., вед.н.с.
(Россия), Б. Дюпон — доктор медицины (Франция),
К.П. Кашкин — д.м.н., академик РАМН, профессор
(Россия), В.Г. Кубась — д.м.н., профессор (Россия),
В.М. Лещенко — д.м.н., профессор (Россия),
А.В. Липницкий — д.м.н., профессор (Россия),
В.И. Мазуров — д.м.н., акад. РАМН, профессор
(Россия), Ю.А. Медведев — д.м.н., профессор (Россия),
А.К. Мирзабалаева — д.м.н., профессор (Россия),
С.М. Озерская — к.б.н. (Россия), И. Полачек —
доктор медицины (Израиль), К.И. Разнатовский —
д.м.н., профессор (Россия), А.Г. Рахманова — д.м.н.,
профессор (Россия), Ф.П. Романюк — д.м.н.,
профессор (Россия), А.В. Самцов — д.м.н., профессор
(Россия), А.В. Соболев — д.м.н., профессор (Россия),
А.А. Степанова — д.б.н. (Россия), Х.Й. Титц — доктор
медицины (Германия), Т.Н. Трофимова — д.м.н.,
профессор (Россия), О.Г. Хурцилава — д.м.н., (Россия),
В.А. Цинзерлинг — д.м.н., профессор (Россия),
Н.В. Шабашова — д.м.н., профессор (Россия),
М.А. Шевяков — д.м.н., профессор (Россия)

Проблематика журнала: Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской микробиологии — биология возбудителей, клиника, диагностика, эпидемиология, иммунитет, терапия и профилактика инфекций, микроорганизмы-контаминанты в лабораторных, клинических и других условиях.

Editorial policy: The Journal «Problems in Medical Mycology» specializes in original articles that describe innovative research on all aspects of Medical Mycology — biology of pathogens, clinic, diagnostic, epidemiology, immunity, therapy and prophylaxis of infections, microorganisms — contaminants in laboratory, clinical and other conditions.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ И ОБЗОРЫ

Нефротоксичность антимикотиков (обзор). <i>Шевяков М.А., Колмакова Е.В., Рахматуллина Л.Н.</i>	3
Иммунопатогенез атопического дерматита и роль грибов-комменсалов кожи (обзор). <i>Учеваткина А.Е., Котрехова Л.П., Разнатовский К.И., Гурбанова М.Г.</i>	11
Хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек и иммуногенетические механизмы врожденной чувствительности макроорганизмах <i>Candida</i> spp. <i>Шабашова Н.В.</i>	20

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

Сравнительное исследование эффективности тербинафина (Ламизила) и аморолфина (Лоцерил) в комбинации при онихомикозе стоп. <i>Котрехова Л.П.</i>	29
Острый диссеминированный фузариоз (обзор). Описание клинического случая. <i>Хостелиди С.Н., Мошнина С.М., Мясников А.А., Здоров А.Е., Богомолова Т.С., Клишко Н.Н.</i>	33
Случай успешного лечения инфильтративно-нагноительной трихофитии области лобка в сочетании с кандидозом кожи и слизистых оболочек у пациентки с сахарным диабетом I типа. <i>Иванова Ю.А., Евтропова Я.А.</i>	39
Клинические особенности атопического дерматита, осложненного микозами кожи. <i>Гурбанова М.Г., Гулордава М.Д., Чилина Г.А., Котрехова Л.П., Разнатовский К.И.</i>	43

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

Молекулярная идентификация представителей <i>Aspergillus</i> spp. из Российской коллекции патогенных грибов. <i>Михайлова Ю.В., Чилина Г.А., Полищук А.Г.</i>	46
Антимикотическая активность хитозана и его производных в отношении <i>Candida albicans</i> . <i>Куликов С.Н., Шакирова Д.Р., Тихонов В.Е., Безродных Е.А., Ильина А.В., Левов А.Н., Варламов В.П.</i>	50
Электронно-микроскопическое исследование <i>Lichtheimia</i> spp. in vivo и in vitro. <i>Степанова А.А., Хостелиди С.Н., Аравийский Р.А., Зюзгин И.С., Ружинская О.С., Криволапов Ю.А., Синицкая И.А., Клишко Н.Н.</i>	55
Активность некоторых метаболитов <i>Stachybotrys</i> spp. в отношении <i>Paramecium caudatum</i> . <i>Доршакова Е.В., Елинов Н.П.</i>	62

ХРОНИКА И ИНФОРМАЦИЯ

Проход Никифорович Киселев. 100 лет со дня рождения. <i>Киселева Е.П., Елинов Н.П.</i>	66
Памяти Роальда Александровича Аравийского	68
Конгрессы и конференции	69

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

Nephrotoxicity of antimycotics (review). <i>Shevyakov M.A., Kolmakova Ye.V., Rakhmatullina L.N.</i>	3
Immunopathogenesis of atopic dermatitis and role of skin fungi-commensals (review). <i>Uchevatkina A.E., Kotrekova L.P., Raznatovskij K.I., Gurbanova M.G.</i>	11
Chronic mucocutaneous candidosis and immunogenetic mechanisms of innate sensitivity of the macroorganism to <i>Candida</i> spp. (review). <i>Shabashova N.V.</i>	20

CLINICAL MYCOLOGY

Comparative study of combination therapy of terbinafine (Lamisil) and amorolfine (Loceryl) in patients with feet onychomycosis. <i>Kotrekova L.P.</i>	29
Acute disseminated fusariosis (review). Clinical case. <i>Khostelidi S.N., Moshnina S.M., Myasnikov A.A., Zdorov A.E., Bogomolova T.S., Klimko N.N.</i>	33
Case of successful treatment of infiltrative - purulent trichophytia of pubic area in combination with candidosis of skin and mucous membranes of patient with diabetes type I. <i>Ivanova Yu.A., Evtropova Ya.A.</i>	39
Clinical peculiarities of atopic dermatitis complicated by skin mycoses. <i>Gurbanova M.G., Gulordava M.D., Chilina G.A., Kotrekova L.P., Raznatovskij K.I.</i>	43

EXPERIMENTAL MYCOLOGY

Molecular identification of <i>Aspergillus</i> spp. from Russian collection of pathogenic fungi. <i>Mikhaylova Y.V., Chilina G.A., Polischouk A.G.</i>	46
Antimycotic activity of chitosan and its derivatives against <i>Candida albicans</i> . <i>Kulikov S.N., Shakirova D.R., Tikhonov V.E., Bezrodnykh Ye.A., Il'ina A.V., Levov A.N., Varlamov V.P.</i>	50
Electron-microscopic investigations of <i>Lichtheimia corymbifera</i> in vivo and in vitro. <i>Stepanova A.A., Khostelidi S.N., Araviyskiy R.A., Zuzgin I.S., Ruzjinskaiya O.S., Krivolapov Y.A., Sinitskaya I.A., Klimko N.N.</i>	55
The activity of some <i>Stachybotrys</i> spp. metabolites to <i>Paramecium caudatum</i> . <i>Dorshakova E.V., Yelinov N.P.</i>	62

CHRONICLE AND INFORMATION

Prochor Nikiforovich Kiselev. 100 years from the birth date. <i>Kiseleva Ye.P., Yelinov N.P.</i>	66
To the memory of Roald Aleksandrovich Araviyskiy	68
Congresses and conferences	69

НЕФРОТОКСИЧНОСТЬ АНТИМИКОТИКОВ (ОБЗОР)

**¹Шевяков М.А. (профессор кафедры)*,
²Колмакова Е.В. (доцент кафедры),
²Рахматуллина Л.Н. (аспирант)**

СЗГМУ им И.И.Мечникова: ¹кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии; ²кафедра внутренних болезней и нефрологии, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2012

В обзоре представлены данные по риску возникновения побочных эффектов в отношении функции и заболевания почек при применении современных антифунгальных средств. В качестве основного критерия нефротоксичности рассмотрено повышение уровня креатинина и цистатина С в сыворотке больных, получавших такие антимикотики, как амфотерицин В, каспифунгин, вориконазол. Указаны группы пациентов, для которых при применении антимикотиков возрастает риск нефротоксичности. Выбор антимикотика рекомендовано осуществлять индивидуально, с учетом потенциальной нефротоксичности. В целом, наименее нефротоксичным является флуконазол, наиболее потенциально нефротоксичным – амфотерицин В.

Ключевые слова: амфотерицин В, антимикотики, вориконазол, каспифунгин, креатинин, нефротоксичность, почки, сывороточный цистатин С

NEPHROTOXICITY OF ANTIMYCOTICS (REVIEW)

**¹Shevyakov M.A. (professor of the chair),
²Kolmakova Ye.V. (senior lecturer of the
chair), ²Rakhmatullina L.N. (postgraduate
student)**

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹Chair of Clinical Mycology, Allergology and Immunology; ²Chair of Internal Illnesses and Nephrology, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2012

Data on risk of occurrence of by-effects concerning function and disease of kidneys at application of modern antimycotics have been presented in the review. As the basic criterion of nephrotoxicity the increase of a creatinine level and cystatine C in the serum of patients receiving such antimycotics, as amphotericin B, caspofungin, voriconazole is considered. Groups of patients for which at antimycotics application the nephrotoxicity risk is raised are specified. The choice of antimycotic is recommended for carrying out individually, depending on potential nephrotoxicity. As a whole, least nephrotoxic is fluconazole, most potentially nephrotoxic – amphotericin B.

Key words: amphotericin B, antifungals, caspofungin, creatinine, kidneys, renal toxicity, serum cystatin C, voriconazole

* Контактное лицо: Шевяков Михаил Александрович, тел (812) 303-46-56

Нефротоксичность лекарственных препаратов – актуальный компонент клинической проблемы так называемого «сопутствующего ущерба» (англ. – collateral damage).

За последние десятилетия микозы стали важной клинической проблемой. Широкое распространение новых медицинских технологий (инвазивных диагностических и лечебных процедур, цитостатической и иммуносупрессивной терапии, трансплантации и пр.), пандемия ВИЧ-инфекции, а также успехи в лечении бактериальных инфекций привели к возрастанию популяции иммунокомпрометированных пациентов с высоким риском инвазивных (глубоких) микозов. Основными возбудителями инвазивных микозов являются *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Mucor* spp. и *Cryptococcus neoformans*. Инвазивный кандидоз, аспергиллез и криптококкоз отличаются тяжестью клинических проявлений и высокой летальностью [1]. Их частота у больных в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) неуклонно растет.

Диагностика грибковых инфекций является сложной проблемой. Клинические признаки микозов часто неспецифичны, особенно – у иммунокомпрометированных пациентов. Серологические методы диагностики разработаны лишь для немногих микозов. Нередко признаки заболевания выявляют слишком поздно, а многие микозы отличаются быстрым и агрессивным течением [2].

В связи с этим для эффективного лечения микозов врачи должны не только знать их клинические признаки, но и быть способными планировать диагностические мероприятия и правильно оценивать полученные результаты.

Важнейшим условием успешного лечения микозов является ранняя и интенсивная антифунгальная терапия. С появлением новых эффективных и безопасных антимикотиков в последние годы расширены возможности лечения микозов.

Противогрибковые средства (природные или синтетические) с фунгицидным и/или фунгистатическим действиями ныне применяют для профилактики и лечения микозов.

Выбор лекарственного средства зависит от вида возбудителя, его чувствительности к препарату – необходимо назначение лекарственного средства с соответствующим спектром действия, особенностей его фармакокинетики и токсичности, а также от клинического состояния пациента и пр.

В настоящее время некоторые авторы называют уже 5 поколений противогрибковых препаратов [3]. Системным антимикотиком первого поколения был амфотерицин В (АмВ), который и в настоящее время остается основой лечения многих глубоких микозов. Производные имидазола являются препаратами второго поколения, к ним относят миконазол для парентерального введения и кетоконазол. Антимикотики третьего поколения (флуконазол и итраконазол), представляющие собой триазолы, совершили

настоящую «революцию» в лечении микозов. Эти препараты обладают достаточно высокой эффективностью при хорошей переносимости их пациентами. Четвертое поколение составили новые триазолы (вориконазол, позаконазол, равуконазол и др.) и липидные формы АмВ. К пятому поколению относят препараты новых классов и механизмов действия, в том числе – эхинокандины (каспофунгин, микафунгин и др).

В середине 50-х годов были получены первые антимикотические средства – полиеновые антибиотики. Эти препараты активны в отношении ряда возбудителей системных микозов. Механизм их противогрибкового действия основан на взаимодействии с эргостерином цитоплазматической мембраны гриба, вызывающим ее повреждение, что приводит к нарушению жизнедеятельности грибов и их гибели. Однако возможно также перекрестное взаимодействие полиеновых антибиотиков с холестерином, входящим в состав цитоплазматических мембран животных клеток, в том числе и клеток человека. В результате возникает повреждение этих клеток, что и является причиной многочисленных побочных реакций.

Большим шагом в лечении микозов явилось создание в 1955 г. полиенового антибиотика АмВ) – это противогрибковый антибиотик из ряда полиеномакролидов, обладающий широким спектром антимикотического действия. В отличие от других лекарственных средств этой группы, АмВ применяют внутривенно, поэтому он эффективен при системных поражениях. АмВ является одним из основных препаратов, рекомендуемых для лечения системных микозов [4]. Препарат в сравнительно небольших концентрациях действует на многие условно-патогенные и патогенные грибы и эффективен при таких заболеваниях, как аспергиллез, бластомикоз, кандидоз, криптококкоз, кокцидиоидоз, гистоплазмоз, зиготомикоз и др. К этому антибиотику нечувствительны бактерии из родов *Actinomyces*, *Nocardia* и другие (простейшие и вирусы). АмВ в терапевтических концентрациях действует фунгистатически; *in vitro* фунгицидный эффект проявляется при продолжительном воздействии больших концентраций. АмВ необратимо связывается с эргостерином клеточной мембраны грибов, что приводит к нарушению ее проницаемости, а также вызывает реакции перекисного окисления в клеточной мембране. Назначаемый внутривенно АмВ до сих пор является препаратом выбора при большинстве глубоких микозов, особенно – угрожающих жизни микозов с окончательно невыясненной этиологией [5]. При внутривенном введении средних доз достаточная терапевтическая концентрация препарата в плазме сохраняется 6-8 часов, а затем в течение последующих 20 ч плавно снижается наполовину. Период полувыведения при медленном капельном введении составляет 24-48 ч. АмВ метаболизируется в печени и выводится с мочой. В первые 24 часа после введения выводится только 5% введенной дозы, а за 7 дней – 20-40%, поэтому возможно

кумулятивное действие препарата и усиление побочных реакций. При нарушении функции почек элиминация препарата еще больше задерживается. Поэтому прогнозировать фармакодинамику при многократном введении АмВ без мониторинга его концентрации в плазме крови очень сложно. Препарат обычно вводят внутривенно капельно в дозе 0,5-0,8-1,0-1,5 мг/кг/сут. Следует помнить, что АмВ практически не проходит через гематоэнцефалический барьер и обнаруживается в спинномозговой жидкости в минимальной концентрации, недостаточной для антифунгального действия, поэтому внутривенное введение препарата с целью лечения микотических поражений ЦНС практически неэффективно. АмВ можно назначать интратекально (в оболочки головного мозга), внутривентрикулярно, субконъюнктивально и внутрь стекловидного тела, также его можно вводить во время люмбальной, цистернальной или вентрикулярной пункции. В целом, желательнее достигать оптимальной концентрации препарата в крови путем постепенного наращивания дозы до целевого уровня. К сожалению, возможности эффективного лечения АмВ ограничиваются из-за его токсичности. К побочным эффектам препарата относят лихорадку, озноб, головную боль, тошноту и рвоту, тромбофлебит в месте введения, подавление эритропоэза, гепатотоксические и нейротоксические эффекты при интратекальном введении антибиотика, возможны нейротоксические реакции в виде парезов, тремора и судорог.

Наиболее тяжелое следствие применения препарата обусловлено его токсическим воздействием на почки, в качестве критерия которого одни исследователи рассматривают повышение уровня креатинина в сыворотке крови по сравнению с исходным на 100% (Wingard J.R., et al., 1999), другие – достижение этого показателя величины $\geq 0,12$ ммоль/л (Cannon J.P., et al., 2001). Наиболее серьезным осложнением, обусловленным применением АмВ, является острое почечное повреждение (ОПП). Препарат оказывает прямой токсический эффект, приводящий к острому тубулярному некрозу, вызывает выраженную вазоконстрикцию и снижение почечного кровотока. Эти повреждения являются причиной снижения клубочковой фильтрации и тубулярной дисфункции [4]. Поражение канальцев ведет к гипокалиемии, гипомagneмией, гипостенурии, снижению экскреции мочевой кислоты, поэтому необходим тщательный мониторинг азотемии и водно-электролитного баланса. Частота развития нарушений функции почек в ходе лечения АмВ высока и, по данным различных исследователей, составляет 49-65% [4]. По данным J. R. Wingard с соавторами (1999), удвоение уровня креатинина, по сравнению с исходным, отмечали более, чем у 50% пациентов в исследуемой группе, у 29% – зафиксировали превышение величины креатинина 0,25 ммоль/л со снижением почечной функции, по крайней мере, на 70%. Необходимость в проведении диализа возникла у 15% пациентов. При анализе ре-

зультатов лечения 707 пациентов, получавших АмВ парентерально, было установлено, что ОПП (пик повышения креатинина $\geq 0,2$ ммоль/л) развивалось у 212 больных (30%), причем у 89 (13%) – тяжелая форма (пик креатинина $\geq 0,3$ ммоль/л). Средняя длительность терапии в исследованной группе составила 14,8 дней, средняя доза АмВ – 1,2 г (Bates D.W., et al., 2001).

По данным из научной литературы, основными факторами риска нарушения функции почек вследствие применения амфотерицина В являются:

1. Ежедневная доза. Нефротоксичной считают дозу, превышающую 35 мг (Harbarth S., et al., 2001) или 0,5 мг/кг (Richardson M.D., et al., 1997). Увеличение ежедневной дозы на 0,1 мг/кг сопровождается возрастанием риска нефротоксичности в 1,8 раза (Fisher M.A., et al., 1989).

2. Дегидратация. Одновременный прием АмВ и мочегонного препарата существенно (в 12,5 раз) усиливает токсическое влияние АмВ на почки (Fisher M.A., et al., 1989).

3. Кумулятивная доза. Вероятность развития ОПП у пациентов, получающих АмВ, в значительной степени зависит от общей дозы препарата. Если она менее 0,5 г, то ОПП возникает у 23% больных, если доза АмВ находится в интервале от 0,5 г до 0,9 г, то ОПП развивается у 30%. При дозе препарата от 1,0 г до 1,4 г функция почек нарушается приблизительно у 37% пациентов. В группе больных, получавших АмВ от 1,5 г до 1,9 г, ОПП было отмечено у 40%, более 2 г – у 43% пациентов (Bates D.W., et al., 2001). При дозе препарата более 5 г развитие ОПП наблюдали практически у 100% пациентов. При кумулятивной дозе более 4 г нарушение функции почек может быть необратимым [4].

4. Исходное нарушение функции почек. ОПП возникает чаще у пациентов, имеющих до начала терапии АмВ повышенный уровень креатинина и/или снижение клубочковой фильтрации [6].

5. Сочетание АмВ с потенциально нефротоксичными препаратами (циклоспорин А, аминогликозиды, ванкомицин, препараты платины, ацикловир, нестероидные противовоспалительные средства, сердечных гликозидов (особенно – на фоне гипокалиемии) и курареподобных миорелаксантов. Наиболее агрессивным является сочетание АмВ с циклоспирином А [6, 7]. Вероятность развития осложнений, вызванных нефротоксическим воздействием АмВ, зависит от количества нефротоксичных препаратов, получаемых одновременно с ним (Walsh J.W., et al., 1999): при монотерапии АмВ (0,6 мг/кг) или в случае его сочетания с одним нефротоксичным препаратом осложнения развиваются у 15,2% больных; при проведении курса лечения, включающего, наряду с АмВ, более 2 нефротоксичных средств – у 40,5% пациентов; при одновременном приеме более 3 препаратов, оказывающих токсическое воздействие на почки, и АмВ – у 45,4%.

6. Характер сопутствующего заболевания (напри-

мер, вид трансплантации). К группе высокого риска развития ОПП, в результате лечения АмВ, относят, в первую очередь, пациентов после аутологичной и аллогенной трансплантации костного мозга (аутоТКМ и аллоТКМ). Нарушение функции почек, обусловленное нефротоксичностью АмВ, несколько реже возникает у больных с нейтропенией (без трансплантации) и после трансплантации органов. По данным J.R. Wingard с соавторами (1999), частота нарушения функции почек (увеличение в два раза по сравнению с исходным уровнем креатинина), обусловленного нефротоксичностью АмВ, в группе пациентов после аллоТКМ (I группа) достигает 61%, после аутоТКМ (II группа) – 80%, после трансплантации солидных органов (III группа) – 35%, при нейтропении без трансплантации (IV группа) – 54%. Также выявили превышение концентрации креатинина величины 0,25 ммоль/л в I группе – у 33% больных, во II – у 47%, в III – у 36%, в IV – у 40%. Авторы отмечают, что проведение заместительной почечной терапии (гемодиализ) потребовалось: в I группе – 20% больных, во II – 19%, в III – 18%, в IV – 7%. Немаловажно, что летальность в группах составила: после аллоТКМ – 71%, после аутоТКМ – 88%, после трансплантации солидных органов – 36%, при нейтропении без трансплантации – 62%.

7. Мужской пол. В качестве одного из факторов риска при лечении АмВ ряд авторов рассматривают мужской пол пациента (Bates D.W., et al., 2001; Harbarth S., et al., 2001).

8. Вес пациента ≥ 90 кг (Harbarth S., et al., 2001).

Harbarth S. и соавторы (2001) выявили зависимость нарушения функции почек от количества факторов риска и их сочетания (ежедневная доза ≥ 35 мг, вес ≥ 90 кг, хроническое заболевание почек, применение амикацина или циклоспорино А) на вероятность возникновения ОПП при исследованиях в группе, состоящей из 494 пациентов. Нарушение функции почек (увеличение уровня креатинина в сыворотке крови на 50% или 100%) при отсутствии изучаемых факторов риска возникло у 4% больных, при наличии одного фактора – у 8%, двух факторов – у 18%, при сочетании трех – у 29%. Пациентов, имеющих несколько факторов, следует также отнести к группе высокого риска, что требует особого подхода при выборе антимикотического препарата. Однако вероятность развития ОПП при использовании АмВ настолько часта, что группа экспертов KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) в Практических Клинических рекомендациях 2012 г. [8] не рекомендуют использовать стандартную форму этого препарата (Раздел 3: Предотвращение и лечение ОПП; 3.8.7).

При развитии ОПП значительно возрастает вероятность гибели пациента. Bates D.W. с коллегами (2001) в исследовании, включающем 707 пациентов, доказали, что при развитии ОПП увеличивается стоимость лечения и пребывание в стационаре на 8,2 дня. В группе больных с возникшим на фоне лече-

ния АмВ ОПП показатель смертности существенно выше, чем в группе пациентов без ОПП, и составляет 54,2% и 16,0% соответственно. Систематическая гидратация существенно сокращает негативное воздействие АмВ на почки [4]. Mayer J., et al. [9] сообщают о снижении нефротоксичности АмВ при объеме мочи ≥ 4000 мл/день. Вопрос о роли снижения скорости инфузии в обеспечении уменьшения токсического воздействия АмВ на почки остается нерешенным. При двух рандомизированных исследованиях (20 взрослых пациентов в одном и 22 ребенка – в другом) не выявили различий в токсичности при инфузии АмВ в течение 45-ти минут и на протяжении 4-х часов (Ellis M.E., et al., 1992; Davies H.D., et al., 1997). В то же время, в результате рандомизированного исследования 80 пациентов было обнаружено существенное снижение почечной токсичности препарата при его 24-часовой инфузии по сравнению с 4-часовой (Eriksson Urs, et al., 2001). Furrer K., et al. [10] установили снижение частоты поражения почек при сочетании АмВ с циклоспорином А (ЦсА) при условии 24-часовой инфузии первого препарата.

Таким образом, АмВ, активно используемый уже в течение многих лет, не утратил своего значения, и клиницисты назначают его при микозах. Однако широкое применение его в практике ограничивается сложностью введения препарата, многочисленными побочными действиями и относительно небольшой эффективностью при поражении ЦНС.

Широкий антимикотический спектр АмВ, с одной стороны, и многочисленные серьезные побочные реакции, с другой, заставили специалистов искать другие лекарственные формы препарата. На сегодняшний день существует несколько коммерческих препаратов липидной формы АмВ: липосомальный амбизом, амфоцил (коллоидная взвесь липидные пузырьки – амфотерицин В) и абелсет (амфотерицин В – липидный комплекс). Эти препараты различаются по размеру липосомных пузырьков, структуре, фармакокинетике, по клинической эффективности в отношении некоторых форм инвазивных микозов. В липидных формах: липосомальный (амбизом), липидный комплекс (абелсет) и коллоидная дисперсия (амфоцил, амфотек) токсичность АмВ снижена [4].

Чаще применяют амбизом, который представляет собой истинную липосомальную формулу. Именно эта форма указана в Практических Клинических Рекомендациях KDIGO 2012 г. (раздел 3.8.6.) как предпочтительная форма использования АмВ [8]. Липосомы – это цельные сферические везикулы, формирующиеся при диспергировании в воде некоторых полярных липидов, таких как фосфолипиды и холестерин. При гомогенизации в водном растворе фосфолипиды образуют единичные или множественные концентрические двуслойные мембраны. Наличие липофильных групп у АмВ позволяет этому соединению встраиваться в липидные слои липосом. Диаметр липосом в амбизома составляет 60 нм. Находясь в циркуляторном русле, препарат может оста-

ваться интактным в течение длительного времени, что, вероятно, объясняет его меньшую токсичность по сравнению с чистым АмВ. Препарат распределяется в виде интактных липосом в тканях, в которых имеются очаги микотической инфекции. При этом липосомы связываются с цитоплазматической мембраной гриба, а затем происходит высвобождение активного компонента. Считают, что после высвобождения АмВ переносится к богатой эргостеролами мембране клетки гриба. Спектр действия амбизома соответствует таковому АмВ. Взаимодействие с клетками грибов происходит как вне, так и внутри макрофагов, что очень важно, поскольку некоторые грибы относятся к внутриклеточным инфектам и могут персистировать в макрофагах. В отличие от АмВ, амбизом характеризуется меньшим объемом распределения, меньшей величиной почечного клиренса (поскольку липосомы слишком велики, чтобы выводиться из сосудистого русла в процессе гломерулярной фильтрации).

Показания к назначению амбизома практически такие же, как и для АмВ, но, учитывая меньшую токсичность, его рекомендуют и для профилактики инвазивных микозов у онкологических больных, а также при пересадке паренхиматозных органов и костного мозга. Как и АмВ, амбизом вводят внутривенно капельно в течение 30-60 мин. Препарат назначают ежедневно из расчета 1-3 мг на 1 кг массы тела в зависимости от тяжести заболевания. Специальных рекомендаций по дозировке препарата в раннем возрасте нет, и амбизом назначают в дозах, сопоставимых с дозами для взрослых, из расчета на 1 кг массы тела. Средний курс составляет 2-4 недели, но, при необходимости, может быть продлен. Из побочных реакций чаще отмечают тошноту, рвоту, умеренные головные боли, а также нарушение функции почек, повышение активности печеночных ферментов и гипокалиемию. Ни в одном случае применения амбизома не зарегистрировано развитие флебитов. Терапию амбизомом, как и АмВ, следует проводить при постоянном (не реже 1 раза в неделю) контроле функции почек, печени, гемопоеза и ионного состава крови. Особенно осторожно амбизом применяют в сочетании с препаратами, оказывающими нефротоксическое действие.

При сравнительном исследовании результатов лечения АмВ и амбизомом выявили меньшую нефротоксичность последнего при сохранении эффективности этого препарата (Walsh J.W., et al., 1999; Wingard J.R., et al., 2000). Снижение нефротоксичности позволяет использовать этот препарат в более высоких дозах, чем дезоксихолатный комплекс АмВ, в особенности – у реципиентов почечного трансплантата, которые относятся к группе наиболее высокого риска развития ОПП на фоне лечения полиновыми антибиотиками [11, 12].

Leenders A.C. с коллегами (1998) в многоцентровом исследовании показали, что при приеме Амбизома (5 мг/кг/сут.) и АмВ (1 мг/кг/сут.) у 66 пациентов

с инвазивными грибковыми инфекциями, изменение уровня креатинина, по сравнению с исходным, составило 86% в группе, получавших АмВ, и 1,4% – в группе, получавших Амбизом ($p < 0,001$). Также большее количество пациентов, получавших АмВ, имели 100% увеличение уровня креатинина, по сравнению с пациентами, получавшими Амбизом (40% против 12%, $p < 0,001$).

Walsh J.W. и соавторы (1999) провели рандомизированное двойное слепое многоцентровое исследование сравнения Амбизома (3 мг/кг/сут.) и АмВ как эмпирической терапии у пациентов с персистирующей лихорадкой и нейтропенией. Значительно меньше больных, получавших Амбизом, имели развитие нефротоксических эффектов, удвоение или утроение уровня креатинина сыворотки ($p < 0,001$).

Амфоцил представляет собой коллоидную взвесь АмВ, состоящую из эквимольных количеств антибиотика и сульфата холестерина. Частицы размером 122 нм имеют дископодобную форму. При внутривенном введении препарат быстро ассимилируется клетками печени.

В настоящее время не накоплено достаточно клинических данных для оценки его эффективности, хотя есть сообщения о положительных результатах использования при аспергиллезе легких у взрослых. Большинство авторов указывают, что при назначении амфоцила реже отмечают нефротоксическое действие, чем при использовании амбизома, а эффективность обоих одинакова.

Абелсет – липидный комплекс АмВ представляет собой сочетание АмВ с двумя липидами (димиристоилфосфатидилолином и димиристоилфосфатидилглицеролом) с соотношением лекарственного вещества и липидов 1:1. Объем клинических испытаний этого препарата на настоящий момент невелик, но его используют у взрослых при кандидозе, аспергиллезе, криптококкозе и других тяжелых грибковых заболеваниях. Абелсет был сравнен с АмВ в рандомизированном двойном слепом исследовании у пациентов с лихорадкой и нейтропенией (White M.H., et al., 1998). 213 пациентов были рандомизированы для получения Абелсета (4 мг/кг/сут.) или АмВ (0,8 мг/кг/сут.) менее 14 дней. У пациентов, получавших Абелсет, значительно реже развивалась нефротоксичность, чем у пациентов, принимавших АмВ. В исследовании ученые сравнивали частоту развития нефротоксичности при лечении Абелсетом и АмВ криптококкового менингита у больных СПИДом (Anderson C.M., et al., 1995). 55 пациентов были рандомизированы на шесть недель терапии Абелсетом (1,2 или 5 мг/кг/сут.) и АмВ (от 0,7 до 1,2 мг/кг/сут.). Развитие нефротоксичности с увеличением уровня креатинина наблюдали у 50% и 53% пациентов, получавших Абелсет и АмВ, соответственно (Luke R.G., Boyle J.A., 1998).

При проведенном двойном слепом рандомизированном исследовании с участием 244 пациентов в 18 центрах США сравнивали липидный комплекс АмВ и липосомальную форму АмВ у лихорадящих паци-

ентов с нейтропенией. Пациенты были разделены на группы: получавшие липидный комплекс АмВ в дозе 5 мг/кг в день ($n=78$), липосомальную форму АмВ в дозе 3 мг/кг в сутки ($n=85$) и в дозе 5 мг/кг в день ($n=81$). Проявление нефротоксичности было определено как повышение сывороточного креатинина более чем на 100% от базового. Wingard J.R., et al. (2000) наблюдали нефротоксичность значительно меньше среди пациентов, получавших липосомальную форму АмВ (3 мг/кг и 5 мг/кг), по сравнению с липидной формой АмВ, 14,1% и 14,8% против 42,3% соответственно ($p < 0,001$).

В ещё одном рандомизированном исследовании с участием 75 пациентов с лейкемией была проведена сравнительная оценка липидной и липосомальной формы АмВ. Пациенты с лихорадкой получали 3 мг/кг АмВ ежедневно, пациенты с пневмонией, синуситом – 4-5 мг/кг в день; ежедневная доза была повышена до 5 мг/кг у больных с доказанной грибковой инфекцией. Нефротоксичность была определена как повышение сывороточного креатинина на 50% и более от исходного уровня. Fleming R.V., et al. (2001) сообщили о более высоком уровне проявления нефротоксичности у пациентов, получавших липидную форму АмВ (16/40, 40%), по сравнению с получавшими липосомальную форму АмВ (10/36, 28%), но эта разница не была статистически достоверна ($p = 0,26$).

В Канадском мультицентровом ретро- и проспективном обсервационном исследовании также выявили большее количество проявлений нефротоксичности при применении липидного комплекса АмВ ($n=150$, 4 мг/кг/сут.) у 13,6% больных против липосомальной формы АмВ ($n=104$, 3,3 мг/кг/сут.) – у 12,7%, но статистически достоверных различий не было получено [13]. В другом ретроспективном исследовании [14] также отмечали большое число случаев нефротоксичности при лечении липидным комплексом АмВ у 45% пациентов ($n=31$, 4,5 мг/кг/сут.) против липосомальной формы – у 32% пациентов ($n=41$, 4 мг/кг/сут.) ($p=0,36$).

Saliba E. и соавторы [15] провели проспективное мультицентровое исследование, при котором нефротоксичность наблюдали у 23,3% пациентов, получавших липидный комплекс ($n=60$, 4,8 мг/кг в сутки), и у 7,1% – получавших лечение липосомальной формой ($n=28$, 3,3 мг/кг в день) ($p=0,067$).

В 2008 г. [16] опубликовали результаты ретроспективного, одноцентрового исследования у пациентов с гемобластозами и инвазивным аспергиллезом. Авторы выявили меньшее количество случаев нефротоксичности при лечении липосомальной формой АмВ – 2,8% ($n=106$, 5-10 мг/кг/сут.) против 21,2% ($n=52$, 5-10 мг/кг/сут.) – при лечении липидной формой АмВ ($p < 0,001$), а в группе больных, получавших паллиативную терапию ОПП липидной формой АмВ ($n=30$, 5-10 мг/кг/сут.), у 10% против группы пациентов, получавших липосомальную форму АмВ ($n=51$, 5-10 мг/кг/сут.) – у 5,9%, но статистически достоверных различий между препаратами не было ($p=0,67$).

Отметим, что менее токсическое действие липидных форм АмВ позволяет использовать эти препараты в более высоких дозах, чем дезоксиксололатный комплекс АмВ [4, 11, 12, 17, 18]. Согласно результатам вышеописанных исследований, оба препарата липидной формы АмВ приблизительно одинаково эффективны.

Каспофунгин, относящийся к группе эхинокандинов, ингибирует синтез важнейшего компонента клеточной стенки грибов – β -(1,3)-D-глюкана, которого нет в клетках млекопитающих. Каспофунгин обладает активностью против различных видов *Aspergillus* и *Candida*. В исследовании Walsh T., et al. [19] было показано, что каспофунгин был эффективным и лучше переносился, чем липосомальный АмВ, при назначении в качестве эмпирической антимикотической терапии у больных с нейтропенией и персистирующей лихорадкой. Препарат с успехом применяют у реципиентов почечного трансплантата, в том числе – и в сочетании с другими антимикотиками [20, 21]. Очень важным свойством каспофунгина является отсутствие взаимодействия с ферментами цитохрома P450 и повышения концентрации ЦсА в плазме. В то же время препарат снижает концентрацию такролимуса в крови, поэтому необходимо следить за этим показателем при его использовании.

При исследовании, проведенном на культурах клеток эпителия проксимальных и дистальных канальцев почки человека, выявили, что каспофунгин, по сравнению с АмВ, оказывает менее выраженное повреждающее действие на эпителий канальцев. Клетки дистальных канальцев несколько более чувствительны к антипролиферативному и цитотоксическому эффектам каспофунгина [22]. В целом, побочные эффекты каспофунгина, особенно – нефротоксичность, менее выражены, чем у АмВ.

В ряде клинических испытаний частота развития нефротоксического эффекта каспофунгина, определяемого как повышение сывороточного креатинина, составила от 0 до 1,4% [19, 23, 24]. Каспофунгин вводят путем медленной внутривенной инфузии: в первый день в суточной дозе 70 мг, а в последующие дни – 50 мг. При почечной недостаточности не следует проводить коррекцию дозы препарата. Walsh T. с соавторами было проведено крупное многоцентровое рандомизированное, двойное слепое исследование, целью которого было сравнение эффективности липосомального АмВ и каспофунгина для эмпирической противогрибковой терапии у больных с нейтропенической лихорадкой. В исследование было включено 1123 пациента из 26 стран мира (116 центров). В группу каспофунгина (70 мг в первый день, затем – по 50 мг внутривенно) включили 564 пациента, в группу липосомального АмВ (3 мг/мг/сут.) – 547 пациентов. При рандомизации учитывали группы риска (в группу высокого риска входили пациенты после аллогенной трансплантации или с рецидивами лейкоза) и предшествующую профилактическую терапию противогрибковыми препаратами. Первичной конечной

точкой была доля пациентов с положительным исходом после лечения, определяемая как: выживаемость в течение 7 дней после окончания терапии, положительный исход терапии системной грибковой инфекции, отсутствие последней в течение 7 дней после завершения терапии, отсутствие преждевременного прекращения лечения по причине его неэффективности или токсических проявлений, а также купирование лихорадки в период нейтропении. Средняя продолжительность лечения в группе липосомального АмВ составила 12,5 дней, в группе каспофунгина – 13 дней. Общий показатель эффективности в группе липосомального амфотерицина В был 33,7%, в группе каспофунгина – 33,9% (95,2% доверительного интервала /ДИ/, от – 5,6 до 6,0), что соответствует статистическим критериям non-inferiority («не хуже» препарата сравнения). По отдельным показателям данные в отношении каспофунгина и липосомального АмВ составили соответственно: выживаемость – 93 и 89%, эффективная терапия изначальной системной грибковой инфекции – 52% и 26%, отсутствие внезапных эпизодов системной грибковой инфекции – 95 и 96%, отсутствие преждевременного прекращения терапии – 90 и 86%, разрешение лихорадки – 41 и 41%. Нефротоксичность (3 vs 12%), инфузионные реакции (35 vs 52%, $p < 0,001$) и нежелательные лекарственные реакции (54 vs 69%, $p < 0,001$) были ниже в группе каспофунгина. Таким образом, использование каспофунгина для эмпирической терапии нейтропенической лихорадки является оправданным и сопровождается сопоставимым с липосомальным АмВ уровнем эффективности, при лучших показателях переносимости препарата.

Вориконазол метаболизируется печеночной системой цитохрома P450, при этом имеет место взаимодействие данного препарата с ингибиторами кальциейрина, приводящее к повышению их сывороточной концентрации и, в ряде случаев, – к развитию нефротоксичности [25, 26]. Совместное назначение ингибиторов кальциейрина и вориконазола возможно, однако необходимы снижение дозы иммуносупрессивного препарата и тщательное наблюдение за его концентрацией в крови, особенно – у пациентов с хроническими заболеваниями печени и холестазом [27]. Вориконазол хорошо зарекомендовал себя при системных микозах у больных с почечным трансплантатом [12, 28, 29].

В заключение отметим, что, несмотря на значительный прогресс в области противогрибковой терапии, проблема микозов остается весьма актуальной. На сегодняшний день врачи обладают достаточным по эффективности и спектру действия набором противогрибковых препаратов. Выбор их осуществляется индивидуально и зависит, в том числе, от потенциальной нефротоксичности. В целом, наименее нефротоксичным является флуконазол, наиболее потенциально нефротоксичным – амфотерицин В.

Риск нефротоксичности выше при назначении антимикотиков пациентам с заболеванием почек или

получающим другие потенциально нефротоксичные лекарства. К заболеваниям, имеющим повышенный риск почечной недостаточности, относят сахарный диабет, системную красную волчанку, множественную миелому, обширные травмы, цирроз печени, сердечную недостаточность, сепсис, метаболический ацидоз, гипокалиемию, гипомагниемию, гиперурикемию, наркоманию. К потенциально нефротоксичным лекарствам относят нестероидные противовоспалительные, ингибиторы ангиотензин – превращающего фермента, циклоsporин, такролимус, антибиотики (аминогликозиды, хинолоны, сульфаниламиды, тетрациклин, рифампицин, ванкомицин, триметоприм). Также риск нефротоксичности повышен у пациентов, получающих химиотерапию и иммунодепрессанты (метотрексат, цисплатин, митомицин, циклоsporин), статины, некоторые слабительные, фитопрепараты с аристоколовой кислотой, фенофибрат, метадон.

Диагностика лекарственной нефротоксичности основана на выявлении 50%-го повышения уровня креатинина по сравнению с исходным. Однако следует помнить, что в ряде случаев нарушения мочеобразования возникают задолго до явных биохимических отклонений.

При ОПП изменения уровня креатинина сыворотки крови, как известно, отстают по времени от момента почечного повреждения на 24-48 ч. В настоящее время признано, что лучше других способствуют раннему установлению диагноза ОПП-определение сывороточного цистатина С, липокалина – субстанция, ассоциированная с гидролазной активностью лейкоцитов (NGAL, Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin), ИЛ-18 в моче [30]. Сывороточный цистатин С является маркером функции почек, который через 6 ч начинает повышаться в крови при падении скорости клубочковой фильтрации («быстрый креатинин»), появление в моче липокалина, ИЛ-18 – продуктов патологических процессов, указывающих на фазу активного почечного повреждения («почечный тропонин») [31].

Таким образом, при назначении потенциально нефротоксичных антимикотиков в группах риска целесообразно исследование не только креатинина сыворотки до и в ходе лечения микоза, но и ранних маркеров почечного повреждения, в частности цистатина С. На сегодняшний день это доступно практически во всех современных лабораториях.

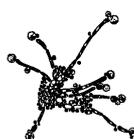
ЛИТЕРАТУРА

1. Борзова Ю.В., Десятник Е.А., Хостелиди С.Н., Попова М.О., Чернопятова Р.М., Богомоллова Т.С., Игнатьева С.М., Шурпицкая О.А., Колбин А.С., Зюзгин И.С., Зубаровская Н.И., Климович А.В., Васильева Н.В., Клишко Н.Н. Хронический инвазивный аспергиллез легких у больных в Санкт-Петербурге // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т.11, №3. – С. 20-25.
2. Васильева Н.В., Клишко Н.Н., Цинзерлинг В.А. Диагностика и лечение инвазивных микозов: современные рекомендации // Вестник СПб МАПО. – 2010. – Т.2, №4. – С. 5-18.
3. Сергеев А.Ю. Эволюция антимикотиков и революция в терапии микозов. Успехи медицинской микологии: Мат. I Всероссийского конгресса по медицинской микологии. – М., 2003. – Т. 2. – С. 111-112.
4. Deray G. Amphotericin B nephrotoxicity // J. Antimicrob. Chemoth. – 2002. – Vol. 49, Suppl. S1. – P. 37-41.
5. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции: Руководство для врачей. – М.: Бином-пресс, 2003. – 440 с.
6. Gubbins P.O., Penzak S.R., Polston S., et al. Characterizing and predicting amphotericin B – associated nephrotoxicity in bone marrow or peripheral blood stemcell transplant recipients // Pharmacotherapy. – 2002. – Vol. 22, №8. – P. 961-971.
7. Филатов Л.В. Стратегия и тактика минимизации риска развития острой почечной недостаточности в результате лечения амфотерицином В // Успехи медицинской микологии: Мат. I Всероссийского конгресса по медицинской микологии. – М., 2003. – Т. 2. – С. 230-233.
8. Практические клинические рекомендации KDIGO 2012. – СПб., 2012. – 166 с.
9. Mayer J., Doubek M., Doubek J., et al. Reduced nephrotoxicity of conventional amphotericin B therapy after minimal nephroprotective measures: animal experiments and clinical study // J. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 186, №3. – P. 379-388.
10. Furrer K., Schaffner A., Vavricka S.R., et al. Nephrotoxicity of cyclosporine A and amphotericin B – deoxycholate as continuous infusion in allogeneic stem cell transplantation // Swiss. Med. Wkly. – 2002. – Vol. 132. – P. 316-320.
11. Crompton J.A., Alexander D., Somerville T., Shihab F.S. Lipid-based amphotericin in pulmonary zygomycosis: safety and efficacy of high exposure in a renal allograft recipient // Transpl. Infect. Dis. – 2004 Vol. 6, №4. – P. 183-187.
12. Rocamora N., Tormo A.M., Franco A., et al. Fever and cavitary infiltrate in a renal transplant recipient // Nefrologia. – 2004. – Vol. 24, Suppl. 3. – P. 16-20.
13. McKechnie M., Rotstein C., McTaggart B. A multi-center, retrospective comparison of the nephrotoxicity effects of amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B. (Abstract P-048.) The 13th Focus on Fungal Infections. – Maui, Hawaii, 2003.
14. Malani P.N., Depestel D.D., Riddell J., et al. Experience with community-based amphotericin B infusion therapy // Pharmacotherapy. – 2005. – Vol. 25. – P. 690-697.
15. Saliba F., Cheron N., Ichai Ph., et al. A prospective French National Survey to assess renal safety of amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B. (Abstract 123.) // Int. J. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 10, Suppl. 1. – P. S68-S69.
16. Hachem R.Y., Boktour M.R., Hanna H.A., et al. Amphotericin B lipid complex versus liposomal amphotericin B monotherapy for invasive Aspergillosis in patients with hematologic malignancy // Cancer. – 2008. – Vol. 112. – P. 1282-1287.
17. Dupont B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B // J. Antimicrob. Chemother. – 2002. – Vol. 49, Suppl. 1. – P. 31-36.
18. Ostrosky-Zeichner L., Marr K.A., Rex J.H., Cohen S.H. Amphotericin B: time for a new «gold standard» // Clin. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 37. – P. 415-425.
19. Walsh T., Tepler H., Donowitz G.R., et al. Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in

- patients with persistent fever and neutropenia // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 351. – P. 1391-1402.
20. Anttila V.J., Piilonen A., Valtonen M., et al. Co-administration of caspofungin and cyclosporine to a kidney transplant patient with pulmonary *Aspergillus* infection // *Scand. J. Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 35, №11-12. – P. 893-894.
 21. Salvalaggio P.R., Bassetti M., Lorber M.I., et al. *Aspergillus* vertebral osteomyelitis after simultaneous kidney-pancreas transplantation // *Transpl. Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 5, №4. – P. 187-190.
 22. Wegner B., Baer P., Gauer S., et al. Caspofungin is less nephrotoxic than amphotericin B in vitro and predominantly damages distal renal tubular cells // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2005. – Vol. 20. – P. 2971-2079.
 23. Arathoon E.G., Gotuzzo E., Noriega L.M., et al. Randomized, double-blind, multicenter study of Caspofungin versus amphotericin B for treatment of oropharyngeal and esophageal candidiasis // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2002. – Vol. 46. – P. 451-457.
 24. Villanueva A., Arathoon E.G., Gotuzzo E., et al. A randomized double-blind study of Caspofungin versus fluconazole for treatment of esophageal candidiasis // *Am. J. Med.* – 2002. – Vol. 113. – P. 294-299.
 25. Pai M., Allen S. Voriconazole inhibition of tacrolimus metabolism // *Clin. Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 36. – P. 1089-1091.
 26. Venkataramanan R., Zang S., Gayowski T., Singh N. Voriconazole inhibition of the metabolism of tacrolimus in a liver transplant recipient and in liver microsomes // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2002. – Vol. 46. – P. 3091-3093.
 27. Tintillier V., Kirch L., Goffin E., et al. Interaction between voriconazole and tacrolimus in a kidney-transplanted patients // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2005. – Vol. 20. – P. 664-665.
 28. Ahmed J., Ditmars D.M., Sheppard T., et al. Recurrence of *Scedosporium apiospermum* infection following renal retransplantation // *Am. J. Transplant.* – 2004. – Vol. 4, №10. – P. 1720-1724.
 29. Schelenz S., Goldsmith D.J. *Aspergillus* endophthalmitis: an unusual complication of disseminated infection in renal transplant patients // *J. Infect.* – 2003. Vol. 47, №4. – P. 336-343.
 30. Ермоленко В.М., Николаев А.Ю. Острая почечная недостаточность: руководство. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 240 с.
 31. Safdar A., Ma J., Saliba F., et al. Drug-induced nephrotoxicity caused by Amphotericin B lipid complex and liposomal Amphotericin B. A Review and Meta-Analysis // *Medicine.* – 2010. – Vol. 89, №4. – P. 236-244.

Поступила в редакцию журнала 20.11.12

Рецензент: А.В. Соболев



ИММУНОПАТОГЕНЕЗ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА И РОЛЬ ГРИБОВ-КОММЕНСАЛОВ КОЖИ (ОБЗОР)

¹Учеваткина А.Е. (с.н.с.)*, ²Котрехова Л.П. (доцент кафедры), ²Разнатовский К.И. (зав. кафедрой), ²Гурбанова М.Г. (аспирант)

ГБОУ ВПО Северо-западный государственный университет им. И.И. Мечникова: ¹НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина, ²кафедра дерматовенерологии, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2012

В обзоре представлены основные звенья патогенеза atopического дерматита, такие как изменения барьерной функции кожи, участие антигенпрезентирующих клеток и различных субпопуляций Т-лимфоцитов, связанных взаимной регуляцией продукции про- и противовоспалительных цитокинов, а также рассмотрена роль грибов-комменсалов кожи в иммунореактивности при atopическом дерматите.

Ключевые слова: atopический дерматит, грибы, иммунопатогенез, Т-лимфоциты, цитокины

IMMUNOPATHOGENESIS OF ATOPIC DERMATITIS AND ROLE OF SKIN FUNGI- COMMENSALS (REVIEW)

¹Uchevatkina A.E. (senior scientific researcher), ²Kotrehova L.P. (associate professor of the chair), ²Raznatovskij K.I. (head of the chair), ²Gurbanova M.G. (post-graduate student)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹Kashkin Research Institute of Medical Mycology; ²chair of dermatoveneorology, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2012

Basic parts of pathogenesis of atopical dermatitis, such as changes of skin barrier function, participation of antigenpresentive cells and the various subpopulations of T-lymphocytes connected by mutual regulation of pro – and antiinflammatory cytokins production, and also the role of skin fungi-commensals in immunoreactivity at atopical dermatitis have been presented in this review.

Key words: atopical dermatitis, cytokins, immunopathogenesis, fungi, T-lymphocytes

* Контактное лицо: Учеваткина Александра Евгеньевна, Тел.: (812) 303-51-45

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы atopического дерматита (АД) определена значительным ростом частоты заболевания. За последние 20 лет распространенность аллергических заболеваний возросла в 3-4 раза и охватывает в разных странах около 10% взрослого и 25% детского населения [1-4].

Основными звеньями патогенеза АД считают генетическую предрасположенность, нарушение барьерной функции кожи, нейровегетативные расстройства, нарушения обмена веществ, сенсибилизацию к продуктам питания и аллергенам окружающей среды, а также бактериальную и микогенную сенсибилизацию [3, 5, 6].

Европейская академия аллергологии и клинической иммунологии и Американская академия аллергии, астмы и иммунологии в 2006 г. приняли согласованный документ, в котором сказано: «Атопический дерматит – хроническое воспалительное заболевание кожи, развитие которого связано с комплексным процессом, включающим взаимодействие генетических факторов, факторов окружающей среды, дефектов барьерной функции кожи и иммунологического ответа» [7]. Таким образом, АД имеет сложную многофакторную патогенетическую основу, обусловленную взаимодействием неиммунных (неспецифических) и иммунных (специфических) факторов.

В последнее время большое внимание обращают на дефекты эпителиального барьера кожи как исходное событие в возникновении АД. Однако считают, что ключевая роль в развитии АД принадлежит иммунологическому воспалению с вовлечением в процесс различных иммунокомпетентных клеток и ряда биологически активных веществ [5, 7, 8-10].

Как известно, иммунный ответ представляет собой комплекс эффекторных и супрессорных механизмов. Дисбаланс в данной системе приводит к различным иммунным нарушениям. В результате проводимых в последнее десятилетие клинических и экспериментальных исследований отметили значимую роль в развитии аллергической патологии разных компонентов клеточного и гуморального иммунитета и их взаимодействия. Так, при изучении особенностей иммунного ответа при АД выявили нарушение соотношения Т-хелперов 1 и 2 типа (Тх1, Тх2) [2, 8].

Наличие изменений врожденного и приобретенного иммунных ответов у пациентов с АД индуцирует повышенную чувствительность к бактериальной, грибковой и вирусной инфекциям [11]. В то же время, некоторые участники нормальной микробиоты кожи, например, дрожжевые грибы перхоти (*Malazessia* spp.), могут быть источниками аллергенов и причиной обострения и/или осложнений болезни. У больных АД уровень специфического IgE к *M. furfur* выше, чем у здоровых лиц [3, 8, 9, 12, 13].

Однако, несмотря на достигнутый прогресс в понимании патогенеза АД, остаются без ответа вопросы, касающиеся условий возникновения и развития

иммунологических нарушений, особенностей регуляторных механизмов аллергического воспаления и степени участия в этих процессах грибов-комменсалов кожи.

Внешние факторы, предрасполагающие к развитию АД

К росту аллергических заболеваний в промышленно развитых странах, очевидно, причастны экологические факторы (увеличение загрязнения воздуха, воздействие антигенов домашней пыли, погрешности в диете). Важным фактором считают снижение частоты заболеваемости так называемыми «детскими инфекциями», частое использование антибиотиков, уменьшение размеров семьи (аллергическая сенсibilизация выше у первенцев, но реже – у детей из многодетных семей), а также улучшение качества жизни и гигиены [9]. Нарушение бактериальной колонизации кишечника у детей значительно повышает риск развития АД [14]. Рост распространенности и тяжести атопических заболеваний на протяжении последних десятилетий обусловлен снижением контаминации организма представителями нормальной микробиоты в раннем детском возрасте, что может привести к изменению баланса Тх-1/Тх-2 и/или нарушению Т-регуляторного звена клеточного иммунного ответа. Известно, что контакт иммунодоминантных лигандов нормальной микробиоты, заселяющей желудочно-кишечный тракт, с паттерн-распознающими рецепторами (PRR) эпителиоцитов, макрофагов и дендритных клеток, вызывает поляризацию иммунного ответа по типу Т-хелперов 1 (Тх1). Отсутствие переключения Т-клеточной дифференцировки под влиянием микробных антигенов от цитокинового профиля Тх2 типа, который преобладает при рождении, к Тх1 типу ответа, может объяснить развитие аллергических реакций. Кроме того, механизм перехода иммунного ответа на атопический фенотип может быть обусловлен дефектом стимуляции дендритных клеток непатогенными микроорганизмами в лимфоидной ткани кишечника, ведущий к снижению продукции регуляторных Т-клеток (Трег), синтезирующих интерлейкин-10 (ИЛ-10) [9].

Генетические предпосылки развития АД

В настоящее время выявили множество генных мутаций, которые могут стать причиной начала аллергического процесса. При АД обнаружили различные дефекты протеинов и липидов кожи, которые в норме обеспечивают ее барьерную функцию. Эти молекулы включают в себя филаггрин, инволкрин, холестерол, свободные жирные кислоты и керамиды [8, 15-17]. У больных АД установлена связь мутаций генов филаггрина с высоким уровнем общего IgE в сыворотке крови, ранним началом заболевания и хроническим, персистирующим течением. Возникновение АД может быть связано с мутациями таких генов как химотриптический энзим SP SC (Serine Protease Stratum Corneum), калликреин-связанная пептидаза

7 (Kallikrein-Related Peptidase 7 – KLK7) и SP (Serine Protease) ингибитор LEKTI (Lympho-Epithelial Kazal-Type-related Inhibitor), известный также как Serine Protease Inhibitor Kazal-type 5 (SPINK5), которые поддерживают баланс протеаз и антипротеаз в коже. Также у больных с АД выявили снижение активности гена Клаудина 1, который контролирует проницаемость эпителиальных клеток для воды и других растворимых компонентов [8].

Мутации генов толл-подобных рецепторов TLR2, внутриклеточных NOD-рецепторов (Nucleotide-binding Oligomerization Domein): CARD4/NOD1 (Caspase Recruitmen Domein 4 / Nucleotide-binding Oligomerization Domein 1), CARD15/NOD2, NALP12 (Nod-Like Receptor family, pyrin domain containing 12) и CD14, распознающих патоген-ассоциированные молекулярные паттерны микроорганизмов (PAMP), были описаны при тяжелых формах АД [16], чем, в свою очередь, объясняют повышенную бактериальную и микогенную контаминацию кожи. В то же время, есть данные о врожденных дефектах продукции антимикробных пептидов (кателицидина LL-37, дефензинов HBD-2 и HBD-3), являющихся факторами, поддерживающими антигенную сенсibilизацию и инфекционный процесс в коже [17].

В острой фазе АД на кератиноцитах появляются ST2(Signaling Transduction)-рецепторы к интерлейкину-33 (ИЛ-33). Была найдена взаимосвязь между тяжестью АД и полиморфизмом единичного нуклеотида в дистальной промоторной области гена ST2 [18]. Этот полиморфизм приводит к усилению транскрипционной деятельности гена ST2. ИЛ-33 связывается с рецептором ST2 клеток и вызывает продукцию ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13, поддерживающих высокую продукцию В-лимфоцитами IgE у больных АД. Нарушения и полиморфизм генов, ответственных за выработку фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), рецептора к ИЛ-4 (ИЛ-4R) и ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 описаны в работе Vakirlis E. и соавт., которые высказали мнение, что изменение поляризации иммунного ответа при АД может иметь генетические предпосылки [19].

Роль кожно-ассоциированной лимфоидной ткани в патогенезе АД

Функции кожи заключаются не только в поддержании гомеостаза, физического барьера организма, терморегуляции, но и в реализации механизмов иммунного ответа. Это обусловлено наличием иммунокомпетентных клеток в эпидермисе и дерме, их способности к презентации антигенов и активации иммунных механизмов с последующим развертыванием каскада воспалительных реакций, обусловленных механизмами гиперчувствительности I и IV типов [18]. Основным источником иммунокомпетентных клеток является кожно-ассоциированная лимфоидная ткань, в состав которой входят кератиноциты, антигенпрезентирующие дендритные клетки, различные популяции Т-лимфоцитов [16, 18] (Рис.1).

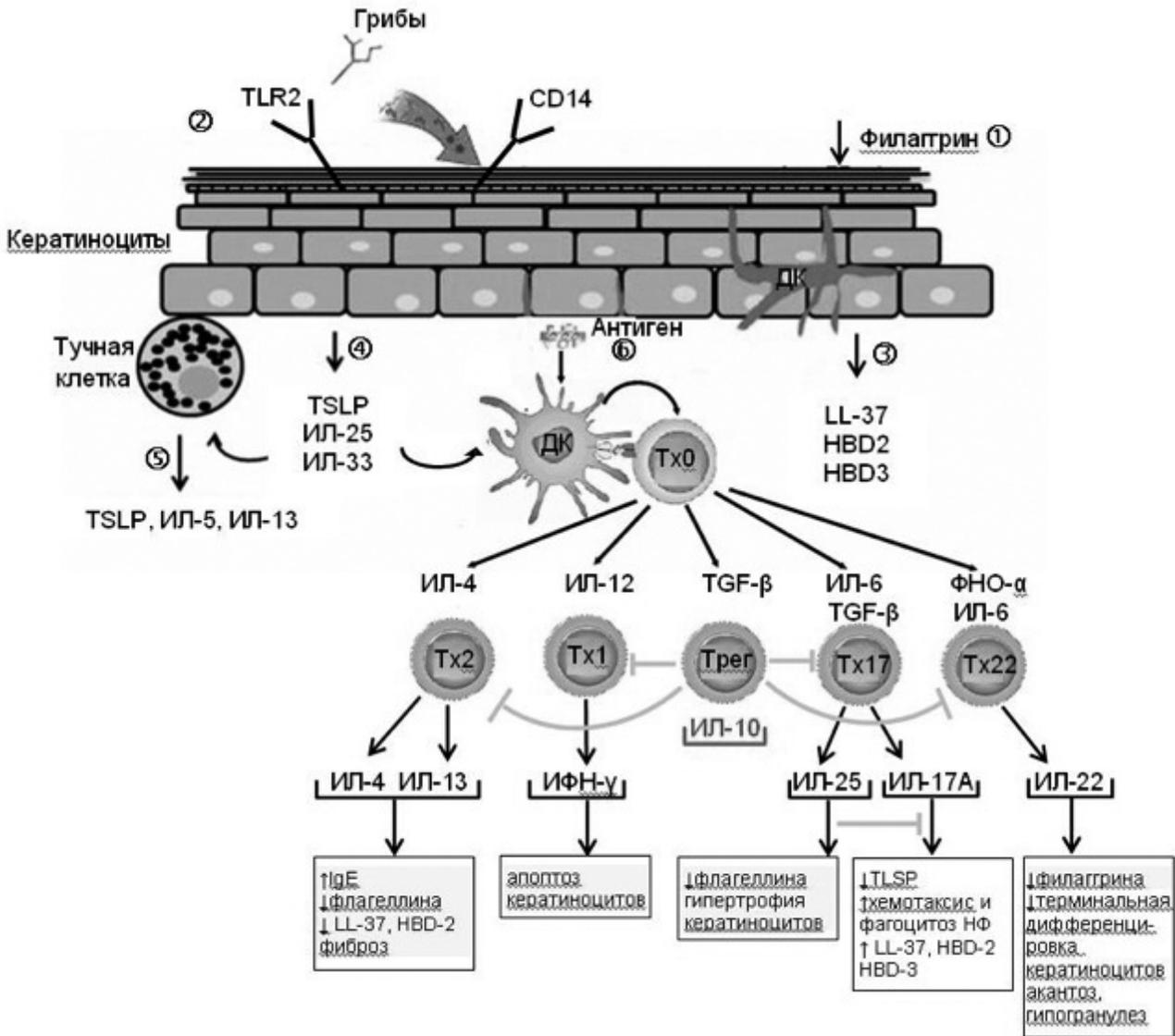


Рис.1. Дефекты иммунного ответа у больных АД.

Нарушения барьерной функции кожи у больных АД создают возможность для проникновения грибов и аллергенов: нарушение кератинизации кожи, вызванной дисфункцией филаггрина (1); нарушение ответа на PAMPs грибов за счет частичного полиморфизма генов TLR2 и CD14(2); снижение выработки антимикробных факторов (LL-37, HBD-2, HBD-3) (3). Кератиноциты активируются при воздействии с грибами и аллергенами и продуцируют TSLP, ИЛ-25 и ИЛ-33, которые действуют на тучные клетки и антиген-представляющие клетки (дендритные клетки) (4). Активированные тучные клетки продуцируют цитокины Тх2 типа (5). Дендритные клетки, в зависимости от типа антигена и цитокинового окружения, вырабатывают цитокины, определяющие дифференцировку наивных Тх0 в Т-хелперы (Тх1, Тх2, Тх17, Тх22, Трег (6), которые, в свою очередь, продуцируют эффекторные цитокины, способствующие развитию различных типов воспалительных реакций при АД (7)

Степень дисфункции кожного барьера у больных АД коррелирует с тяжестью заболевания [8, 16]. Кератиноциты способны отвечать на стимуляцию цитокинов, вырабатываемых Тх1 и Тх2. Установлено, что интерферон-γ (ИФН-γ), основной цитокин Тх1, индуцирует апоптоз кератиноцитов при АД, стимулирует экспрессию на кератиноцитах поверхностных молекул (ICAM-1, класс I и II, CD40 MHC, и Fas), продукцию ими хемокинов (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL18, CCL22, и CXCL10) и цитокинов (например, ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-18 и трансформирующего фактора роста-β (ТФР-β)), участвующих в поддержании воспалительного процесса. ИЛ-4 или ИЛ-13, в свою очередь, индуцируют появление на челове-

ских кератиноцитах таких молекул, как CD54, CCL2, CCL5, и CXCL10 [8, 16, 20, 21]. При механическом воздействии на кожу (расчесывании) повреждение кератиноцитов, тучных клеток приводит к высвобождению ИЛ-1, ФНО-α, фактора активации тромбоцитов, лейкотриенов и других медиаторов, усиливающих воспалительную реакцию.

Особое значение в патогенезе АД имеет тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP), источником которого являются кератиноциты [22]. Этот белок не выявлен у здоровых людей или в неповрежденной коже больных АД, но он высоко экспрессируется в очагах повреждений при остром и хроническом АД [8, 16]. Установлено, что TSLP участвует в поляриза-

ции иммунного ответа, вызывая экспрессию рецепторов OX40L на дендритных клетках (ДК) миелоидного типа, которые, связываясь с OX40-лигандом на наивных Т-лимфоцитах, обуславливают их дифференцировку в алерген-специфические Тх2, продуцирующие ИЛ-4, ИЛ-13, ФНО- α [23].

Изменение цитокинового баланса, которое происходит при смещении дифференцировки лимфоцитов в Тх2, влияет на функциональное состояние кератиноцитов. Установлено, что при АД ИЛ-4, ИЛ-13 подавляют экспрессию филаггрина и продукцию антимикробных полипептидов кератиноцитами [16, 18]. В частности, это происходит за счет супрессии продукции ИФН- γ , который является индуктором синтеза дефензинов HBD-2, HBD-3 и кателицидина LL-37 [17].

В отличие от кератиноцитов, ДК относят к «профессиональным» антиген-представляющим клеткам. Выделяют две группы ДК: миелоидные ДК и плазмацитоидные ДК, которые также влияют на дифференцировку Т-лимфоцитов посредством секреции различных цитокинов [18].

Две популяции миелоидных ДК, присутствующие в воспаленных участках кожи при АД, являются классическими клетками Лангерганса и воспалительными эпидермальными дендритными клетками. Обе популяции экспрессируют высокоаффинный рецептор для IgE (Fc ϵ RI), но они играют разную роль в патогенезе АД. Агрегация Fc ϵ RI на поверхности клеток Лангерганса облегчает представление алергена Т-клеткам и вызывает выброс хемотаксических факторов. Таким образом, клетки Лангерганса обеспечивают IgE-опосредованное накопление алергенов в коже и играют ведущую роль в иницировании аллергического иммунного ответа при участии TSLP, направляя дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в (Тх2) [24].

Эпидермальные ДК, находясь исключительно в очагах воспаления, вовлекаются в IgE-опосредованную презентацию антигенов Т-клеткам. Известно, что IgE-несущие Fc ϵ RI+ эпидермальные ДК являются преобладающими в хронической фазе АД. Однако эти клетки способствуют поляризации Т-лимфоцитов в Тх1 за счет продукции ИЛ-12 и ИЛ-18. Таким образом, эпидермальные ДК определяют переключение от начальной иммунной реакции по Тх2-типу при остром АД к Тх1-типу ответа в хронической фазе [24] и, соответственно, преобладающей продукцией ИФН- γ , ИЛ-2 и ИЛ-12.

Плазмацитоидные ДК подавляют способность миелоидных ДК стимулировать образование эффекторных Т-лимфоцитов за счет поляризации дифференцировки Т-лимфоцитов в развитие Т-регуляторных (Трег) при участии индуцибельной костимуляторной молекулы (ICOS) [10]. Есть данные о способности плазмацитоидных ДК экспрессировать Fc ϵ RI и стимулировать Тх2, что ведет к выбросу ИЛ-10 и усилению апоптоза через индукцию ИЛ-4 по принципу отрицательной обратной связи [25]. Ко-

личество плазмацитоидных ДК при АД снижается в коже и увеличивается в периферической крови, что подтверждает их участие в патогенезе этого заболевания [5, 16, 17]. Таким образом, роль клеток кожно-ассоциированной лимфоидной ткани в поддержании аллергического воспалительного процесса при АД противоречива и поэтому необходимы дальнейшие исследования.

Роль различных субпопуляций Т-лимфоцитов в патогенезе АД

Дифференцировка наивных Т-лимфоцитов в различные Т-клеточные эффекторные популяции является критическим событием в регуляции иммунных реакций и обеспечении баланса между различными типами иммунного ответа. Этот процесс зависит от типа антигена, цитокинового окружения, костимулирующих молекул, воздействия на клетки различных гуморальных факторов. Первоначально ДК, высвобождая определенные цитокины, обеспечивают дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в Т-хелперы Тх1, Тх2, Тх17 и Тх22 [10]. Характерное для острой фазы АД развитие иммунного ответа по Тх2-типу сопровождается высокой продукцией ИЛ-4, ИЛ-13, которые подавляют функциональную активность Тх1, что проявляется в снижении синтеза ИЛ-15, ИФН- γ , ИЛ-2. Это определяет переключение В-лимфоцитов к продукции IgE и формирование гиперчувствительности немедленного I типа. Связывание IgE с высокоаффинным рецептором (Fc ϵ RI) на тучных клетках и базофилах приводит к высвобождению вазоактивных аминов, липидных медиаторов (простагландина D, фактора, активирующего тромбоциты, лейкотриенов); хемокинов (СХС – CXCL8, CXCL10; СС – CCL2, CCL4 и CCL5) [16]. В свою очередь, медиаторы аллергического воспаления обуславливают развитие ранней фазы аллергического ответа, клиническими признаками которой являются интенсивный зуд, гиперемия, высыпания на коже. Таким образом, дисбаланс Тх1/Тх2-иммунного ответа с вовлечением иммунокомпетентных клеток кожи (кератиноцитов, ДК, лимфоцитов, тучных клеток, тканевых эозинофилов и макрофагов) является ключевым звеном в патогенезе АД [6].

Привлекаемые в эпидермис под действием медиаторов острой фазы воспаления эпидермальные ДК, как отмечено выше, иницируют формирование хронической фазы АД, которая характеризуется гиперчувствительностью замедленного типа, смещением дифференцировки лимфоцитов в сторону Тх1 и повышением продукции ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-12. Однако образующиеся при взаимодействии эффекторных клеток цитокины ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8 и некоторые хемокины так же, как и в острой фазе, усиливают миграцию эозинофилов и макрофагов в очаг воспаления [16, 21, 24]. Эти данные объясняют тот факт, что хроническая фаза АД, несмотря на переключение на Тх1-тип иммунного ответа, также сопровождается аллергическим воспалением кожи.

Дифференцировка другой эффекторной субпопуляции лимфоцитов – Тх17 определяется ИЛ-6, ИЛ-1, ИЛ-23 и ТФР- β [10, 26]. Известно, что Тх17-клетки участвуют в защите организма от внеклеточных патогенов, но, в то же время, поддерживают тканевое воспаление при аутоиммунных процессах [26].

При АД некоторые факторы могут способствовать снижению числа Тх17 в коже:

1) при отсутствии привлекающих хемокинов (например, более низкие уровни CCL20 в коже при АД) либо при отсутствии Тх17-поляризирующих ДК;

2) при отсутствии активации присутствующих в коже Тх17, в результате чего заметно снижается продукция ИЛ-17;

3) при активном подавлении продукции ИЛ-17 антагонистическими цитокинами [27].

К настоящему времени известно шесть изоформ ИЛ-17, образующих семейство, из которых ИЛ-17А и ИЛ-17Е (известен также как ИЛ-25) считают лидирующими по участию в различных иммунных реакциях в норме и при патологии. ИЛ-25 (ИЛ-17Е) стимулирует продукцию ТЛSP ДК, что определяет развитие Тх2 иммунного ответа. В свою очередь, Тх2-клетки памяти под действием ТЛSP начинают активно экспрессировать ИЛ-25R. ИЛ-25 поддерживает активность Тх2 клеток посредством регуляции продукции ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13 и, как следствие, индуцирует эозинофилию, повышает в сыворотке крови уровень IgE и IgG1 [10, 26]. Также ИЛ-25 индуцирует гипертрофию эпителиальных клеток и усиливает распознавание аллергенов антиген-презентирующими клетками [8]. Повышенная экспрессия рецептора к ИЛ-25 на клетках в поврежденных участках кожи больных АД сопровождается нарушением синтеза филагрина кератиноцитами, в результате чего они становятся проницаемыми для аллергенов. Таким образом, ИЛ-25 (ИЛ-17Е) поддерживает нарушение кожного барьера и повышенную продукцию цитокинов Тх2 в острой фазе АД [8, 28].

ИЛ-17А, напротив, ингибирует продукцию ТЛSP, проявляя оппозиционное действие к ИЛ-25. Активация ИЛ-17А может усиливать индукцию провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ФНО- α , ИЛ-6) и развитие Тх1-ответа [28]. При исследовании клеток кожи больных АД обнаружили, что кератиноциты как в нормальных участках, так и в очагах воспаления, в ответ на стимуляцию ИЛ-17А, способны усиливать выработку антимикробных пептидов LL-37, HBD-2 и HBD-3. Однако повышение активности Тх2 при АД подавляет продукцию ИЛ-17А, что приводит к сниженной выработке кератиноцитами дефензинов. Среди инфильтрирующих кожу Т-лимфоцитов 10% были определены как ИЛ-17-продуцирующие, однако среди них 33% авторы [29] характеризовали как Тх2/ ИЛ-17 – подтип (вероятно, продуцирующих ИЛ-17Е).

Таким образом, роль Тх17 в патогенезе АД оказывается неоднозначной. Количество этих клеток в очагах поражения повышается в остром периоде

аллергического воспаления (на начальном этапе патогенеза, однако усиленная продукция ТЛSP и цитокинов Тх2 ведет к подавлению активности Тх17 и смещению баланса между изоформами ИЛ-17А и ИЛ-17Е в сторону последнего. При этом снижается участие Тх17 в воспалительном процессе как фактора антибактериальной и фунгицидной защиты.

Тх22 – еще одна оригинальная Т-клеточная субпопуляция (ИЛ22+CD8+). Существуют противоречивые данные о роли ИЛ-22 в иммунопатогенезе АД. Установлено, что у больных АД повышены уровни продукции ИЛ-22 при низкой выработке ИЛ-17 и количество Тх22 в кожных биоптатах коррелирует с тяжестью АД [27]. Было показано подавляющее действие ИЛ-22 на синтез филагрина в кератиноцитах [30]. Кроме того, Тх22 могут влиять на различные пути развития эпидермальной патологии при воспалительных заболеваниях кожи, в том числе – на индукцию антиген-презентирующих клеток, эпидермальную гиперплазию и дифференцировку кератиноцитов [31]. ИЛ-22 индуцирует акантоз, гипогранулез и супрессирует терминальную дифференцировку эпителиоцитов и, следовательно, может способствовать повышению активности условно-патогенных бактерий и грибов [27].

Однако на сегодняшний день имеется новая информация о способности ИЛ-22 регулировать тканевое воспаление. ИЛ-22 может проявлять свойства противовоспалительного цитокина подобно ИЛ-10, в противовес данным многих исследователей о провоспалительных свойствах ИЛ-22, полученных на экспериментальных моделях кожного воспаления [32]. Таким образом, вопрос о роли Т-22-лимфоцитов и ИЛ-22 в патогенезе АД остается открытым и поэтому необходимы дальнейшие исследования.

Регуляторные клетки (Т-reg) играют центральную роль в поддержании периферического гомеостаза, основанного на контроле иммунного ответа, в частности, ингибиции аллерген-специфических эффекторных клеток [5,10,33, 34].

Известны различные по фенотипу и регуляторным эффектам субпопуляции Тreg. К ним относят образующиеся в тимусе естественные Тreg (CD4+CD25+FoxP3+) и индуцибельные Тreg 1 типа, секретирующие ИЛ-10 и TGF- β [35]. Естественные Тreg экспрессируют цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4 (CTLA-4), который связывает CD80/CD86 и ингибирует Т-клеточную активацию. Доказано, что мутация гена FoxP3+ у человека ассоциирована с исчезновением фенотипа CD4+CD25+ Т-лимфоцитов и их супрессорной активности [5]. Дефицит CD4+CD25+ Т-лимфоцитов приводит к достоверному усилению воспаления, активации ДК, гиперпродукции Тх2 ассоциированных цитокинов, повышению уровня IgE. При этом повышается синтез ИЛ-4, ИФН- γ , а также ИЛ-17 [36]. Более того, в присутствии активированных ИЛ-6 ДК естественные Тreg клетки могут становиться Тх17. В свою очередь, субпопуляция Тх17 может влиять

на управляемую Трег клетками иммуносупрессию. В отличие от IFN- γ , T α 17-ассоциированный ИЛ-6 ингибирует, а не усиливает катаболизм триптофана, что является процессом, связанным с индукцией Трег [37].

Снижение количества и (или) функциональной активности Трег ассоциировано с возникновением аллергической патологии. Так, было показано, что CD4+CD25+ Трег, полученные от здоровых доноров, подавляли пролиферацию и продукцию ИЛ-5 аллерген-стимулированными эффекторными CD4+CD25-T α 2. Таким образом, одним из механизмов возникновения аллергических заболеваний является дисбаланс между Т-регуляторными и эффекторными Т-лимфоцитами [33].

Механизм индукции периферической толерантности к аллергенам обеспечивается индуцибельными Трег 1 типа через продукцию супрессорных цитокинов ИЛ-10 и TФР- β [26]. В периферических тканях ИЛ-10 регулирует пролиферацию тучных клеток и снижает высвобождение из них провоспалительных цитокинов, а также ингибирует эозинофильную активность [8]. При этом он способствует переключению синтеза IgE на IgG4. Количество других ИЛ-10-продуцирующих клеток, например моноцитов, значительно возрастает у пациентов с atopическими заболеваниями. Такие моноциты преимущественно дифференцируются в так называемые «альтернативно активированные макрофаги», которые поддерживают поляризацию иммунного ответа по T α 2-типу [10].

Участие другого ключевого цитокина – TФР- β в поддержании иммунной толерантности показано на примере индукции толерантности к пищевым антигенам в интестинальной слизистой оболочке. Так, оральное введение мышам TФР- β приводит к снижению уровней специфических IgE – и IgG $_1$ -антител, Т-клеточной реактивности и кожной реакции немедленного типа [10]. TФР- β является промотором продукции индуцированной популяции Трег, что сопровождается повышенной экспрессией FoxP3 [38].

Дисфункция Трег лежит в основе воспалительных заболеваний кожи, однако получены разноречивые данные при определении их количества и функциональной активности при АД. Увеличение числа Трег 1 типа в периферической крови у больных АД совпадало с повышением содержания в пораженной коже CD4+CD25+-клеток, но они не экспрессировали FoxP3. По данным других авторов, количество Трег повышалось в биопсийных образцах кожи, но не изменялось в периферической крови. Лечение низкими дозами циклоспорина больных АД приводило к супрессии эффекторных Т-клеток и увеличению экспрессии поверхностного маркера Трег CD4+CD25+CD127^{low}, что подтверждает их супрессорное влияние на иммунный ответ [5].

Таким образом, Т-регуляторные клетки принимают непосредственное участие в механизмах клеточного иммунного ответа при АД. Естественные Трег

блокируют передачу сигнала от дендритных клеток на Т-эффекторы, а индуцибельные Трег подавляют пролиферацию и активацию иммунокомпетентных клеток, опосредованных продукцией супрессорных цитокинов ИЛ-10 и TФР- β . При этом количественная характеристика и функциональная активность Трег может быть неоднородной в различных субстратах организма (в периферической крови и в кожных очагах поражения) и зависит от фазы и характера воспаления.

Участие грибов-комменсалов кожи в патогенезе АД.

Изменения реакций врожденного и адаптивно-иммунитета, описанные при АД и возникающие на фоне генетически обусловленных нарушений функций кожного барьера, приводят к нарушению микробиоценоза кожи с развитием бактериальной, вирусной и микотической суперинфекций, которые, в свою очередь, могут провоцировать обострение и ухудшает течение этого заболевания.

У больных АД чаще, чем у здоровых лиц, выявляют дерматомикозы, вызванные *Trichophyton rubrum* [9]. Существуют данные о том, что *Penicillium* spp. и *Cladosporium* spp. могут потенцировать аллергическое воспаление при АД [13, 39, 40]. Связь между atopией и микозами кожи подтверждена тем, что высокий процент больных с персистирующей инфекцией имеет гиперчувствительность немедленного типа и повышенные уровни общего IgE [8]. Среди больных АД микозами кожи, 79% проявляли чувствительность немедленного типа к *Trichophyton* spp., а также к *Penicillium* spp. и *Cladosporium* spp. Однако аллергические реакции на эти три экстракта отсутствовали у пациентов с микозами кожи, но без atopии, и у здоровых людей [39]. Из этого следует, что гиперчувствительность немедленного типа к *Trichophyton* spp. и другим дерматомицетам не признак контакта, а форма реактивности при АД. Также было обнаружено, что антигены дерматомицетов, включая те, которые содержат остатки маннозы, могут обратимо подавлять пролиферацию лимфоцитов [39]. На этом основании можно предположить о значимости изменения локальной (в коже) или системной активности Т-лимфоцитов. Возможные механизмы включения активации Th2-пути определяют спектр антител в иммунном ответе.

В последнее время появляется все больше доказательств тому факту, что оппортунистические дрожжеподобные грибы родов *Malassezia* и *Candida* spp. принимают участие в поддержании воспалительного процесса при АД [12, 13, 41].

Колонизация кожи *Malassezia* spp. характерна и для здоровых людей, и для пациентов с АД (100% и 78% соответственно). Особенностью 14 из 15 видов *Malassezia* spp. является их способность вырабатывать липолитические ферменты (липазы), фосфолипазу, способствующую высвобождению арахидоновой кислоты, азелаиновую кислоту [13, 42]. Последняя обладает фунгицидными и бактерио-

статическими свойствами и, в то же время, снижает кислород-зависимую киллерную функцию нейтрофилов, что позволяет грибам пребывать в качестве комменсалов кожи многие годы [42]. Активность липаз зависит от pH кожи и изменяется при возникновении воспаления [9], что позволяет дрожжевым клеткам и их аллергенам проникать в глубокие слои кожи, где они взаимодействуют с рецепторами антиген-презентирующих клеток, в частности, клеток Лангерганса и тучных клеток, TLR2-зависимым и TLR2-независимым путями. Это способствует созреванию клеток Лангерганса и продукции ими провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-18, но не ИЛ-12, что ведет к усилению поляризации иммунного ответа по Th-2 типу. Кроме того, взаимодействие *Malassezia* spp. с кератиноцитами индуцирует последние к выработке провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α), что способствует развитию и поддержанию воспалительного процесса [9].

В экспериментальных работах *in vitro* показано [41], что стимуляция периферических мононуклеарных клеток больных АД экстрактом, полученным из *Malassezia* spp., вызывала повышенную продукцию ИЛ-4 и снижение синтеза IFN- γ . Эти результаты совпадают с данными других авторов [39], подтвердивших повышенную активность Th2 (увеличение синтеза ИЛ-4 и ИЛ-10) в ответ на стимуляцию лимфоцитов больных АД антигенами *Malassezia* spp. при снижении выработки ИЛ-2 и IFN- γ . Такой же профиль цитокинов у больных АД выявили в очагах кожи, пораженных грибами, в отличие от неповрежденных участков.

Переключение направленности иммунного ответа по Th2-му типу подтверждается тем, что около 50% взрослых больных АД имеют аллерген-специфические IgE к *Malassezia* spp. [6].

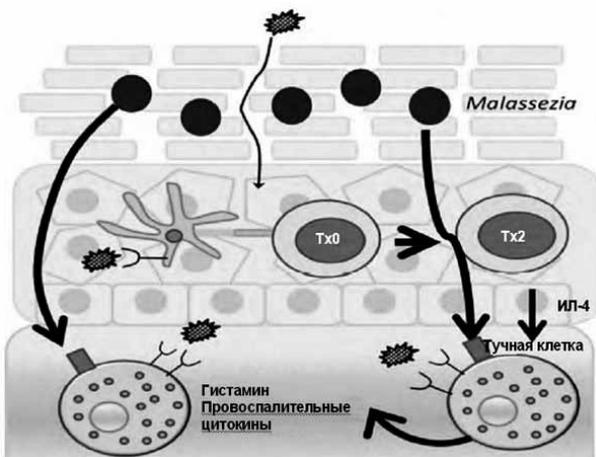


Рис. 2. Из-за дисфункции кожного барьера при АД *Malassezia* spp. и/или её продукты входят в контакт с тучными клетками, имеющими на поверхности большое разнообразие рецепторов, которые взаимодействуют непосредственно с микроорганизмами, включая толл-подобные рецепторы (TLRs). Синергичная активация между TLR и рецептором IgE (Fc ϵ RI) может происходить в тучных клетках, приводя к увеличенной продукции провоспалительных цитокинов [13]

Установлено, что степень IgE-сенсibilизации к *Malassezia* spp. у больных АД зависит от возраста больного (выше у взрослых больных), тяжести заболевания, локализации – наиболее высокие уровни *Malassezia*-специфических IgE обнаружили у больных с локализацией дерматита на голове и шее [9, 43]. По данным других авторов [44], IgE-антитела к *Malassezia* spp. выявляли у 37% больных АД, при этом тяжесть заболевания не зависела от концентрации антител. В то же время, отмечено [41], что специфические IgE-антитела к *Malassezia* spp. редко имеют место у больных АД с неизменной кожей, а также у больных себорейным дерматитом и у здоровых лиц.

Большинство здоровых людей вырабатывают IgG антитела к *Malassezia* spp., но у 30-80% пациентов с АД присутствует IgE и/или Т-клеточная реактивность. Тестами освобождения гистамина выявлена биологическая активность циркулирующих специфических IgE антител *Malassezia* spp. приблизительно у 70% пациентов с АД, подтверждая роль этих антител в процессе заболевания [9, 13]. Дефекты барьера кожи позволяют всем дрожжевым клеткам *Malassezia* spp. и их аллергенам проникнуть в кожу и подвергнуться обработке клетками Лангерганса. При лабораторных исследованиях обнаружили, что процесс интернализации *Malassezia* spp. способствует созреванию дендритных клеток и продукции провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов, но не ИЛ-12, т.е. в пользу индукции Th-2 типа ответа [45]. Также было установлено повышение Th-2 типа ответов на *Malassezia* spp. лимфоцитов, полученных из крови и кожи при АД, по сравнению с контрольной группой [9]. Кроме того, положительный patch-тест к *Malassezia* spp. *in vivo* коррелировал с Th-2 типом ответа мононуклеаров периферической крови у пациентов с АД *in vitro*. *Malassezia* также оказывает другие провоспалительные эффекты, такие как активация альтернативного пути комплемента, а также стимулирует кератиноциты к синтезу провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α), участвующих в патогенезе АД [9].

Таким образом, *Malassezia* spp. могут поддерживать воспалительный процесс посредством переключения иммунного ответа на Th2-тип. Этим фактом, наряду с высокой частотой выявления аллерген-специфических IgE к *Malassezia* spp., по сравнению с другими грибами-комменсалами кожи, можно объяснить патогенетическую значимость *Malassezia*-специфических антител в течении АД [46].

Участие *Candida* spp. в патогенезе АД в настоящее время доказано не только в качестве патогенов, но и классических аллергенов, инициирующих иммунный ответ по IgE-зависимому типу. Частота выявления сенсibilизации к *Candida* варьирует от 16 до 85% и, в целом, выше у взрослых, чем у детей. Тяжесть течения АД коррелирует с выявлением аллерген-специфических IgE к *C. albicans*, особенно – у пациентов с колонизацией *C. albicans* в пищеварительном тракте [41]. Многие антигены *C. albicans* имеют структуру,

сходную с антигенами *Malassezia* spp., и обладают перекрестной сенсибилизирующей активностью. Отмечена связь IgE-антител к *S. albicans* и *Malassezia* spp.: у 70% больных с выявленными IgE-антителами к *Malassezia* spp. также были определены IgE-антитела к *S. albicans* [13]. Однако при оценке гиперчувствительности замедленного типа, положительные patch-тесты с экстрактом *S. albicans*, в отличие от *Malassezia* spp., наблюдали чаще у здоровых лиц, чем у больных АД. Авторы предположили, что персистенция *S. albicans* у больных АД приводит к развитию аллергической реакции по немедленному типу, характерной для Th2-го типа иммунного ответа. Аналогичные результаты были получены при постановке patch-тестов с дерматомицетами [39]. И хотя при обследовании больных АД продукция ИФН- γ была выше, а ИЛ-4 – ниже при стимуляции экстрактом *S. albicans*, в отличие от *Malassezia* spp., способность к синтезу ИФН- γ в ответ на антиген *S. albicans* при АД все же

определялась ниже, чем у здоровых людей, что указывает на аллергическую перестройку иммунного ответа [41].

Таким образом, формируется замкнутый круг поддержания аллергического воспаления, в котором грибы принимают непосредственное участие: перестройка Т-клеточной регуляции в аллергическую сторону снижает толерантность кожи к грибам-комменсалам, а последние становятся новым источником аллергенов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные исследователи выделяют два основных механизма развития АД: 1 – нарушение функции кожного барьера; 2 – иммунорегуляторные нарушения. При этом присоединение грибковой инфекции не только осложняет клиническую картину АД, но и поддерживает аллергическое воспаление кожи, нарушая баланс Т-клеточного взаимодействия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Генкина Н.И. Распространенность, факторы риска и течение атопического дерматита у детей: Автореф. дис... докт.мед.наук. – М., 2006. – 23 с.
2. Гевазиева В.Б., Самойликов П.В., Сверановская В.В. Современные аспекты иммунопатогенеза атопического дерматита // Росс. аллергологический журнал. – 2006. – №3. – С. 5-12.
3. Tao Z., Jinho Y., Min H.O., et al. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma // Allergy Asthma Immunol. Res. – 2011. – Vol. 3, №2. – P. 67-73.
4. Hanifin J.M. Evolving concepts of pathogenesis in atopic dermatitis and other eczemas // J. of Investigative Dermatology. – 2009. – Vol. 129. – P. 320-322.
5. Akdis C., et al. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Astma and Immunology/PRACTALL Consensus Report // J. Allergy Clin. Immunol. – 2006. – Vol. 118, №1. – P. 152-169.
6. Гонсорунова Д.С., Огородова Л.М., Фёдорова О.С. и др. Участие Т-регуляторных клеток в иммунном ответе при атопическом дерматите // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – №4. – С. 82-88.
7. Ong P.Y., Leung D.Y.M. The infectious aspects of atopic dermatitis // Immunol. Allergy Clin. North. Am. – 2010. – Vol.30, №3. – P. 309-321.
8. Khosravi, M. T. Hedayati, P. Mansouri, et al. Immediate hypersensitivity to *Malassezia furfur* in patients with atopic dermatitis // Mycoses. – 2007. – Vol. 50. – P. 297-301.
9. Brandt E.B., Sivaprasad U. Th2 cytokines and atopic dermatitis // J. Clin. Cell. Immunol. – 2011. – Vol. 2, №3. – P. 143-152.
10. Baker B.S. The role of microorganisms in atopic dermatitis // British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology. – 2006. – Vol. 144. – P. 1-9.
11. Jutel M., Akdis C.M. T-cell subset regulation in atopy // Curr. Allergy Astma Rep. – 2011. – Vol. 11. – P. 139-145.
12. Forte W.C.N., Guardian V.C., Mantovani P.A., et al. Evaluation of phagocytes in atopic dermatitis // Allergol. Immunopathol. (Madr). – 2009. – Vol. 37, №6. – P. 302-308.
13. Takuji N., Yoshimi N. Fungus as an exacerbating factor of atopic dermatitis, and control of fungi for the remission of the disease, atopic dermatitis – disease etiology and clinical management. – InTech, 2012. – 414 p.
14. Flohr C., Pascoe D., Williams H.C. Atopic dermatitis and the 'hygiene hypothesis': too clean to be true? // Br. J. Dermatol. – 2005. – Vol. 152. – P. 202-216.
15. Elias P.M., Hatano Y., Williams M.L. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms // J. Allergy Clin. Immunol. – 2008. – Vol. 121, №6. – P. 1337-1343.
16. Maintz L., Novak N. Modification of the innate immune system in atopic dermatitis // J. Innate Immunol. – 2011. – Vol. 3. – P.131-141.
17. Hata T.R., Gallo R.L. Antimicrobial Peptides, Skin Infections, and Atopic Dermatitis // Semin. Cutan. MedSurg. – 2008. – Vol. 27. – P. 144-150.
18. Werfel T. The role of leukocytes and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis // J. Invest. Dermatol. – 2009. – Vol. 129. – P. 1878-1891.
19. Vakirlis E., Lazaridou E., Tzello T.G., et al. Investigation of cytokine levels and their association with SCORAD index in adults with acute atopic dermatitis // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. – 2011. – Vol. 25. – P. 409-416.
20. Purwar R., Werfel T., Wittmann M. IL-13-stimulated human keratinocytes preferentially attract CD4+CCR4+ T-cells: possible role in atopic dermatitis // J. Invest. Dermatol. – 2006. – Vol. 126. – P. 1043-1051
21. Johnson-Huang L.M., McNutt N.S., Krueger J.G. et al. Cytokine-producing dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory skin diseases // J. Clin. Immunol. – 2009. – Vol. 29, №3. – P. 247-256.
22. Soumelis V., Liu Y.J. Human thymic stromal lymphopoietin: a novel epithelial cell-derived cytokine and a potential key player in the induction of allergic inflammation // Springer Semin. Immunopathol. – 2004. – Vol. 25. – P. 325-333.

23. Ito T, Wang Y.H., Duramad O., et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand // J. Exp. Med. – 2005. – Vol. 202. – P. 1213-1223.
24. Novak N., Valenta R., Bohle B., et al. Fc epsilon RI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro // J. Allergy Clin. Immunol. – 2003. – Vol. 113. – P. 949-957.
25. Ito T, Yang M., Wang Y.H. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand // Exp. Med. – 2007. – Vol. 204, №1. – P. 105-115.
26. Schmidt-Weber C.B., Akdis M., Akdis C.A. TH17 cells in the big picture of immunology // J. Allergy Clin. Immunol. – 2007. – Vol. 120. – P. 247-254.
27. Nograles K.E., Zaba L.C., Shemer A., et al. IL-22-producing «T22» T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells // J. Allergy Clin. Immunol. – 2009. – Vol. 123. – P. 1244-1252.
28. Бережная Н.М., Сениаишвили Р.И. Семейство интерлейкинов-17 // Аллергология и иммунология. – 2010. – Т.11, №3. – С. 213-223.
29. Eyerich K., Pennino D., Scarponi C., et al. IL-17 in atopic eczema: linking allergen-specific adaptive and microbial-triggered innate immune response // J. Allergy Clin. Immunol. – 2009. – Vol. 123. – P. 59-66.
30. Gutowska-Owsiak D., Schaupp A.L., Salimi M., et al. Interleukin-22 downregulates filaggrin expression and affects expression of profilaggrin processing enzymes // Br. J. Dermatol. – 2011. – Vol. 165, №3. – P. 492-498.
31. Cavani A., Pennino D., Eyerich K. Th17 and Th22 in skin allergy // Chem. Immunol. Allergy – 2012. – Vol. 96. – P. 39-44.
32. Кайдашев И.П. Цитокиновый сигнальный модуль при воспалительном ответе // Инфектология – 2012. – № 3. – С. 26-32.
33. Akdis M., Akdis C.A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy // J. Clin. Immunol. – 2007. – Vol. 119. – P. 780-789.
34. Ozdemir C., Akdis M., Akdis C.A. T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation // Clin. Exp. Allergy. – 2009. – Vol. 39. – P. 626-639.
35. Shimizu J., Moriizumy E. CD4+ CD25+T-cells in aged mice are hyporesponsive and exhibit suppressive activity // J. Immunol. – 2003. – Vol. 170, № 5. – P. 1675-1682.
36. Wan Y.Y., Flavell R.A. How diverse – CD4 effector T cells and their functions // J. Molecular. Cell. Biology. – 2009. – Vol. 1 – P. 20-36.
37. Bush K.A., Farmer K.M., Walker J.S., et al. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein // Arthritis Rheum. – 2002. – Vol. 46. – P. 802-805.
38. Wan Y.Y., Flavell R.A. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression // Nature. – 2007. – Vol. 445. – P. 766-770.
39. Faergemann J. Atopic Dermatitis and Fungi // Clinical Microbiology Reviews. – 2002. – Vol. 15, №4. – P. 545-563.
40. Tateishi Y., Sato H., Akiyama M., et al. Severe generalized deep dermatophytosis due to *Trichophyton rubrum* (trichophytic granuloma) in a patient with atopic dermatitis // Arch. Dermatol. – 2004. – Vol. 140, №5. – P. 624-625.
41. Феденко Е.С., Елисютина О.Г. Роль грибковой инфекции в развитии атопического дерматита и целесообразность противогрибковой терапии // Российский аллергологический журнал. – 2006. – №5. – С.4-13.
42. Мокроносова М.А. Грибы рода *Malassezia* и атопический дерматит // Российский аллергологический журнал. – 2008. – №1. – С.12-18.
43. Takahata Y., Sugita T., Kato H., et al. Cutaneous *Malassezia* flora in atopic dermatitis differs between adults and children // Br. J. Dermatol. – 2007. – Vol. 157, №6. – P. 1178-1182.
44. Мокроносова М.А., Глушакова А.М., Смольникова Е.В. Гиперчувствительность к грибам рода *Malassezia* у больных атопическим дерматитом // Российский аллергологический журнал. – 2008. – №2. – С.28-31.
45. Buentke E, Scheunius A. Dendritic cells and fungi // APMIS. – 2003. – Vol. 111. – P. 789-796.
46. Пиотровская И.В., Котрехова Л.П., Васильева Н.В., и др. Клинико-лабораторные предикторы и терапия микозов кожи, обусловленных *Malassezia* spp. // Клиническая дерматология и венерология. – 2011. – №4. – С. 79-83.

Поступила в редакцию журнала 10.12.2012

Рецензент: К.Н. Монахов



ХРОНИЧЕСКИЙ КАНДИДОЗ КОЖИ И СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК И ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВРОЖДЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МАКРООРГАНИЗМА К *CANDIDA* SPP.

Шабашова Н.В. (профессор кафедры)*

Кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

© Шабашова Н.В., 2012

В течение ряда десятилетий известно, что хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек – достаточно редкое грибковое заболевание, которое характеризуется повышенной чувствительностью организма больных к Candida spp., весьма разнообразными дополнительными клиническими симптомами и практически всегда сочетается с дефектами клеточных механизмов иммунной системы. Однако конкретные причины и взаимосвязь подобной восприимчивости с иммунными дефектами долгое время оставались неизвестными. И только в последние годы появились данные о мутациях у больных этим заболеванием, позволяющие совершенно по-новому оценивать результаты предыдущих исследований причин иммунных расстройств и, в целом, переосмысливать патогенез хронического кандидоза кожи и слизистых оболочек. В настоящей работе дан обзор молекулярно-генетических находок, их возможной связи с нарушениями иммунных механизмов, которые, в свою очередь, определяют повышенную чувствительность человека к Candida-инфекции. По-видимому, спектр мутаций может быть чрезвычайно разнообразным. Но всегда конечным проявлением их является нарушение в цепи последовательной передачи информации о поверхностных структурах Candida spp., постоянно или периодически проявляющихся на барьерных тканях.

Ключевые слова: иммуногенетические расстройства, патогенез, хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек

CHRONIC MUCOCUTANEOUS CANDIDOSIS AND IMMUNOGENETIC MECHANISMS OF INNATE SENSITIVITY OF THE MACROORGANISM TO *CANDIDA* SPP. (REVIEW)

* Контактное лицо: Шабашова Надежда Венедиктовна
Тел.: (812) 303-51-46

Shabashova N.V. (professor of the chair)

Chair of Clinical Mycology, Allergology and Immunology of North-western State Medical University after Il Mechnikov, St. Petersburg, Russia

© Shabashova N.V., 2012

For a series of decades, it is known that the chronic mucocutaneous candidosis (CMC) – quite a rare fungal infection which characterized by high sensitivity of the patients organism to Candida spp., a wide variety of complementary clinical symptoms and almost always combined with the defects of the cellular mechanisms of the immune system. However, the specific reasons for and the relationship of such susceptibility to immune defects is unknown. And only in recent years, there is evidence of mutations in patients with the disease, allowing completely to re-estimate the results of the previous studies of the immune disorders causes and as a whole to rethink the pathogenesis of chronic mucocutaneous candidosis. In the present paper provides an overview of molecular-genetic findings, their possible connection with violations of the immune mechanisms, which in turn, define the increased sensitivity of the person to the infection with Candida. Apparently, the spectrum of mutations can be extremely diverse. But always the ultimate manifestation of them is a violation of the in-circuit serial transmission of information about the surface structures Candida which constantly or periodically are showed on the barrier tissues.

Key words: chronic mucocutaneous candidosis, immune-genetic disorders, pathogenesis

Хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек, или по международной номенклатуре Chronic Mucocutaneous Candidiasis (CMC), впервые был описан в 1929 году Thorpe and Handley, а в последующем – в работах 50-х годов (Hung W., et al., 1963). Но впервые заболевание так названо в 1967 году Chilgren R.A. и соавт. Позже другие авторы (Kirkpatrick C.H., et al, 1971 and 2001; Higgs and Wells, 1972) определяли это заболевание как персистирующую селективную *Candida*-инфекцию с неустановленной изначальной причиной первичной чувствительности слизистых оболочек и кожи к *Candida* spp. Lilic D. and Ken Haunes [1] добавили к этому определению принципиально интересную подробность, что это – гетерогенная группа больных, объединяемых общей проблемой – наличием первичной, необъяснимой (невывященной) чувствительности к персистирующим, рецидивирующим, изнурительным и мучительным инфекциям кожи и слизистых оболочек, вызванных грибами рода *Candida*. Таким образом, основным клиническим признаком заболевания является CMC.

Синдром CMC считают редким, однако есть популяции, где его частота выше, например, в Финляндии, Норвегии, Иране и на Сардинии, как полагают, из-за высокой закрытости регионов и потому высокой вероятности родственных браков [2, 3], хотя это относится только к одной из форм – аутоиммунному полиэндокринному кандидо-эктодермальному дистрофическому синдрому (APCED). Следует учитывать, что к CMC не относят случаи *Candida*-инфекции слизистых оболочек и кожи при наличии предрасполагающих факторов или предшествующих болезней, например, орофарингеальный кандидоз при ВИЧ/СПИД, при гематоонкологических болезнях, лечении кортикостероидами и т.д.

Поскольку причина СМС была неизвестна, классификации долгое время основывали на сроках начала заболевания, семейной истории, возможных наследственных путях передачи свойства повышенной чувствительности к инфекции и присутствия или отсутствия аутоиммунных эндокринопатий или других дополнительных клинических симптомов. Принципиально эти же особенности учтены и в последней, признанной по международному согласию классификации СМС [4]. Заболевание было отнесено к первичным иммунодефицитам (ПИД) в реестре редких «легко выявляемых иммунодефицитных синдромов» с невыясненной причиной, так как у большинства больных изначально обнаруживают различные нарушения, преимущественно клеточно-опосредованного иммунитета. Заболевание СМС с APESCED относят к болезням иммунной дисрегуляции, поскольку уже открыты мутации гена-иммунорегулятора, ответственного за развитие этого синдрома [4, 5].

Таким образом, в 2006 году были выделены следующие варианты СМС (по OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man) [4]:

1. OMIM *240300 Autoimmune Polyendocrinopathy Syndrome Type 1 (APS1) – аутоиммунный полиэндокринный синдром 1-го типа, который также обозначают как Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy Syndrome (APESCED) – синдром полиэндокринной *Candida*-эктодермальной дистрофии. Ген, ответственный за этот синдром, назвали **аутоиммунным регулятором** – AIRE. Тип наследования – классический аутосомно-рецессивный, но может быть и аутосомно-доминантный. У классических больных при этой форме СМС с детства всегда присутствуют аутоиммунные поражения эндокринных (паращитовидных желез, надпочечников и гонад, сахарный диабет) и других органов (гепатит, кератоконъюнктивиты, кишечные дисфункции, витилиго, алопеция и т.д.). Недавно выявили, что синдром встречается и среди взрослых. Идентифицировали аутоантигены (АУАГ), которые считают ключевыми, потому что к ним найдены аутоантитела (АУАТ) в эндокринных железах и других поврежденных органах. Это АУАТ против двух групп энзимов: цитохрома P450, который участвует в синтезе стероидов, и против энзимов (гидроксилазы, декарбоксилазы), вовлекаемых в синтез нейротрансмиттеров, но могут быть и другие, например, при алопеции – это антитела к кальций-чувствительному рецептору в паращитовидной железе. Найдены также АТ к цитокинам Th17 – IL17A, IL17E, IL22 [5].

2. OMIM *606415 – семейный СМС с заболеванием щитовидной железы как отдельный от APESCED синдром, с аутосомно-доминантным типом наследования, без повреждения других эндокринных органов. Возможной причиной повреждения считали регион хромосомы 2p [4].

3. OMIM * 11458 – семейный СМС с аутосомно-доминантным типом наследования без повреждения эндокринных органов. Такие пациенты страдают ре-

цидивирующими инфекциями и утратой зубов [4].

4. OMIM *212050 – семейный СМС с аутосомно-рецессивной наследственностью и без поражения эндокринных органов, который может иметь позднее начало и ассоциироваться с дефицитом железа у некоторых пациентов [4].

На момент утверждения классификации были описаны другие варианты СМС: спорадический, ассоциированные с дефицитом субклассов IgG, селективным дефицитом антител и ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule-1). Но, поскольку это были единичные больные, то подгруппы не были сформированы [4].

Из представленной классификации следует, что СМС является наследственным заболеванием с разными путями передачи основного признака – хронической рецидивирующей *Candida*-инфекции кожи и слизистых оболочек. Но в данной классификации, кроме того, что заболевание включено в реестр ПИД, никак не отражены иммунологические особенности и то, как они взаимосвязаны с особенностями наследования этой инфекции. Даже при APESCED остается непонятно, как мутации в гене – **аутоиммунном регуляторе** (AIRE) приводят к развитию *Candida*-инфекции [3, 5].

Между тем, начиная с 60-х годов прошлого века, развитие СМС связывали с дефектами клеточной защиты. Около 50 лет существовало общепризнанное мнение, что дефект Т-клеточной защиты приводит к повышенной чувствительности к *Candida*, так как пациенты с тяжелой комбинированной иммунологической недостаточностью (ТКИН) часто болеют СМС (International Union of Immunological Societies – IUIS, 1999) [1, 2], а в первых докладах об иммунных аномалиях (Chilgren, et al., 1967; Kirkpatrick, et al., 1971; Valdimarsson et al., 1973) [2] четко показана корреляция между дефектными ответами *in vivo* и *in vitro* на антигены (АГ) *S. albicans*. Однако при ТКИН у больных бывают и другие инфекции, например, микобактериальные.

В целом, дефекты в клеточно-опосредованном иммунитете в те годы рассматривали, в основном, как **расстройства эффекторной Т-клеточной функции**. Это подтверждено исследованиями многих зарубежных авторов [2], в том числе – результатами нашей работы (Сардыко Н.В. /Шабашова Н.В./, 1991, 1992). Постоянно наблюдали отрицательную или слабо выраженную кожную реакцию по типу гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) только на АГ гриба и/или на другие облигатные АГ и митогены, снижение или отсутствие *in vitro* пролиферативного ответа Т-ЛФ в ответ только на АГ *Candida* и/или также на другие АГ (например, туберкулин) и ФГА, снижение образования лимфокинов (миграционно-ингибирующий фактор /МИФ/ и др.), снижение числа Т-ЛФ, Т-хелперов (Th), снижение содержания Т-цитотоксических (Тс). Кроме того, нами показано в 1986-1991 гг. [10, 11] снижение содержания натуральных киллерных клеток (НК) и их

функциональной активности, нарушение экспрессии разнообразных рецепторов на Т-ЛФ и **баланса синтеза ими растворимых факторов** в условиях *in vitro* при стимуляции АГ гриба, ФГА, КонА, гистамином, изменение соотношения цАМФ в иммунных клетках и плазме, нарушение синтеза IL2 и его рецепции, увеличение выработки IgE и появление кожной реакции по типу гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ) к АГ гриба. Также в те годы нами были обнаружены у больных СМС нарушения функций фагоцитирующих клеток, в частности, нейтрофильных гранулоцитов (НГ) (Сардыко Н.В. /Шабашова Н.В./, 1991), хотя в большинстве работ зарубежных авторов не отмечено дефектов фагоцитирующих клеток, комплемента или NK. Тем не менее, были единичные публикации, свидетельствующие о «едва уловимых дефектах макрофагальной функции» (Bertolucci R., et al., 1981). Fisher A., et al. (1982) показали прямое иммуносупрессивное действие маннана и опосредованную этим АГ индукцию *Candida*-специфических супрессорных клеток [13]. Когда позже установили, что удаление грибов антифунгальным лечением не приводило к исчезновению дефектов ответа *in vivo* и *in vitro* на АГ гриба, посчитали неправомерными аргументы, что маннан был ответственным за иммунные дефекты и вызывал повышение чувствительности к *Candida* у больных СМС [1]. Но нами тоже было показано, что антигены *S. albicans* обладают иммуномодулирующей активностью и, в том числе, могут индуцировать образование *in vitro* лимфоидными клетками растворимых факторов, различных по эффекту на клеточный и/или гуморальный иммунные ответы, в зависимости от примененного стимула, а у больных СМС эта ситуация бывает наиболее выражена (Сардыко Н.В. /Шабашова Н.В./, 1991, 1992). И только позже, с появлением многочисленных данных о роли цитокинов в генерации иммунного ответа (ИО), было показано, что при стимуляции мононуклеаров периферической крови (ПК) здоровых людей маннопротеином *S. albicans* продуцируются цитокины, включая IL1 β , TNF α , IL6, GM-CSF, IFN γ [1, 6-8], т.е. активирующие ИО провоспалительные цитокины. Также с современных позиций вполне могут быть объяснены факты, полученные Fisher et al. и нами, об индукции супрессирующих факторов под влиянием АГ гриба: они могут стимулировать Т-регуляторные клетки, которые выделяют при этом противовоспалительные трансформирующий фактор роста β (TGF β) и IL10 [1, 7, 8], супрессирующие клеточные типы ответа, в том числе – функции фагоцитов и NK, что также было показано раньше нами у больных СМС (Сардыко Н.В. /Шабашова Н.В./, 1991).

Тем не менее, по результатам всех тех почти 30-летних исследований показано, что иммунные расстройства у больных СМС были, во-первых, различной степени выраженности, а, во-вторых, на самом деле проявлялись **дефектами эффекторных функций Т-клеток**. Хотя существовало предположение, что пациенты лишены *Candida*-

специфических Т-клеток, которые были устранены в ходе тимической селекции в результате наличия «hole in the repertoire» (дыр в репертуаре) для АГ *Candida* (Kirkpatrick, 1971; Odds, 1988; Bodey, 1993).

С развитием иммунологии, позже, с 1996 года многие исследователи обратили внимание на изменение соотношения Th1/Th2 в сторону Th2 и синтезируемых ими цитокинов и дружно подтверждали и обсуждали мнение Mencacci et al. (2001) о том, что **именно повреждение Th-1-ответа** сопровождается тяжелыми *Candida*-инфекциями [1, 2, 6-10]. При этом была выявлена дисрегуляция продукции цитокинов в ответ на АГ *Candida*. На этом основании пришли к выводу, что иммунный дефект у больных СМС скорее может быть на уровне **регуляции цитокиновых ответов**, чем на уровне эффекторных Т-клеток самих по себе [1, 2, 6-10], но и признаки дисрегуляции цитокинов также не были однозначны [1, 2, 6, 10]. Потому вопрос о причинных механизмах патогенеза СМС все еще оставался спорным.

Известно, что у больных СМС не бывает диссеминированного или инвазивного кандидоза. Следовательно, дефект защиты хозяина при СМС способствует развитию только поверхностной инфекции. В основном, на уровне кожи и слизистых оболочек, защитными признаны такие механизмы, как микроокружение эпителио- и эпидермоцитов: макрофаги (МФ), дендритные клетки (ДК), цитотоксические ЛФ и NK. Основными медиаторами для активации этих клеток являются провоспалительные цитокины IFN γ , TNF α , в то время как IL4 и IL10 рассматривают как антагонистов клеточной антикандидозной защиты [1, 2, 7, 8, 10]. Как ныне стало известно, продукция всех этих цитокинов инициируется распознаванием микроорганизмов, в том числе – грибов, «паттерн-распознающими рецепторами» (PRR) [7, 10-13], в частности, толл-лайк-рецепторами (TLR) на поверхности клеток, относящихся к врожденному иммунитету, среди которых различают и антиген-распознающие (АПК). Каждый PRR или TLR взаимодействует – распознает только определенные АГ гриба или их наборы – паттерны (образцы).

Так, в экспериментах на мышах было показано, что маннан взаимодействует с маннозным R и стимулирует образование IL12 с последующим развитием Th1-ответа и соответствующих цитокинов IL2 и IFN γ [1,10,14]. Опсонизированные дрожжеподобные клетки гриба, наоборот, активируют через TLR дифференцировку Th2 с их цитокинами и образование антител. Для эффективной защиты от инвазии гриба должен преобладать синтез Th1-цитокинов, так как сложилось мнение, что Th1-тип ответа ассоциируется с устойчивостью к кандидозу, а Th2-ответ – с чувствительностью к инфекции [1, 7, 10]. Поэтому с открытием PRR и различий в последствиях распознавания ими диморфных грибов появились новые представления о возможных причинах, приводящих к СМС [7, 10]: дефектный Th1-ответ может быть результатом нарушений распознавания, что и приво-

дит к персистенции и размножению *Candida* spp. у больных СМС. Поэтому уже исследовали не только продукцию про- и противовоспалительных цитокинов клеточными культурами из периферической крови (ПК) больных СМС в ответ на стимуляцию как АГ *C. albicans*, так и митогенами (ЛПС и ФГА), но дополнительно попытались установить связь между полиморфизмом генов TLR2 и TLR4, который ассоциируется с повреждениями продукции цитокинов и развитием этой *Candida*-инфекции [1, 7, 8, 15].

Полиморфизм TLR4 выявили у 21 здорового (11%) и 2 больных из 7 с СМС (отца с сыном), которые были гетерозиготны по этому признаку. У обоих пациентов с мутацией был очень низкий (по сравнению с другими) уровень синтеза IFN γ после стимуляции *C. albicans*: у одного из них уровень был ниже чувствительности, у другого – слегка выше чувствительности метода (28 пг/мл), в то время как у других больных содержание IFN γ было 340 \pm 155 пг/мл, а у здоровых – 2279 \pm 609 пг/мл. Полиморфизма TLR2 не наблюдали ни у здоровых, ни у больных СМС. По результатам исследования, полиморфизм гена TLR4 имеет место и у здоровых людей, т.е. не приводит к повышенной чувствительности к *Candida*-инфекции и нарушению баланса синтеза цитокинов. Очень низкий уровень синтеза IFN γ при наличии полиморфизма TLR4, конечно, может свидетельствовать о вероятном влиянии этой мутации на развитие дефектного ответа на АГ гриба, но, скорее всего, это далеко не основная причина иммунологических дефектов у больных СМС. Так, кроме TLR, в распознавании поверхностных АГ гриба участвуют другие PRR, например, лектиновые С-типа [15]. Потому у пациентов с СМС чувствительность и нарушение клиренса грибов может быть в результате дефекта получения и передачи информации через эти или другие PRR и даже в ответ на определенную фракцию АГ *C. albicans* и последующего затем неадекватного синтеза цитокинов, в частности, Th1 типа. Однако в более поздней работе не нашли нарушений экспрессии разных молекул, вовлекаемых в ответы на *Candida*: TLR1, 2, 4, 6, Dectin-1, spleen tyrosine kinase (Syk), CARD9 [16].

Изучили широкий профиль про- и противовоспалительных цитокинов 1 и 2 типов (IL 1, 2, 3, 5, 6, 10, 12 и IFN γ) в ответ на 5 АГ *C. albicans*, в том числе – чистый маннан, карбогидратную и обогащенную белком, а также на столбнячный токсин и пневмококковый полисахарид [1, 7, 9]. Показано, что, во-первых, у больных СМС существенно нарушена продукция IL12, более заметная на очищенный полисахарид *C. albicans* (C-PS), хотя изменена и в ответ на другие АГ, а также и митогены. Продукция IL10 и IL6 была значительно увеличена на те же самые фракции *C. albicans* (C-PS) и не отличалась от здоровых в ответ на все другие стимулы. Уровни IFN γ были низкими или нормальными в ответ на различные тестированные АГ, в то время как экспрессия рецепторов к этому цитокину и IL12 была нормальной у всех больных СМС. Продукция TNF была не изменена, а уровни IL4 и 5

были низкими, сравнимыми с контролем на все тестируемые АГ. Из этого следует, что больные СМС имеют значительную дисрегуляцию продукции цитокинов в ответе на маннан, глюкан, хитин *C. albicans*, а выраженное снижение продукции IL12 подтверждает тот факт, что должна быть нарушена индукция Th1-ответа, хотя дефектными могут быть клетки врожденного иммунитета, который «управляет» Т-клеточными ответами. В качестве таких клеток в эксперименте на мышах рассматривали дендритные клетки (DC), несущие на своей поверхности как TLR, так и лектиновые R С-типа (маннозный, дектиновые) (CLR), выполняющие за счет них функции антигенного распознавания, представления и определяющие своими цитокинами дальнейший ход Т-клеточного адаптивного ответа на те или иные АГ грибов [1, 7]. Однако, в отличие от экспериментальных мышей, у пациентов с врожденными нарушениями IL12/IFN γ пути не обнаружили повышенной чувствительности к *Candida*-инфекции и к другим грибковым инфекциям [7], что вновь поставило вопрос о механизмах, вовлекаемых в защиту против грибов у человека.

Когда был идентифицирован Th17-путь с соответствующей субпопуляцией Т-клеток, сложилось мнение, что эти клетки через свои цитокины обязательно участвуют у человека и мышей в ответе на *C. albicans* и защищают от инвазии грибами [1, 2, 17]. Показано, что при попадании грибов на барьерную ткань ее клетки, кроме выделения антимикробных пептидов в раннюю инициативную фазу ответа, синтезируют IL1 β и IL6, который обязательно индуцирует дифференцировку Th17 из наивных CD4 $^{+}$ клеток человека. Параллельно DC, которые избирательно активируются при связывании поверхностных АГ грибов с PRR дектином 1, вырабатывают IL23. Именно IL23 определяет образование IL17-продуцирующих Th17 и требуется для дальнейшей экспансии этих клеток. И при взаимодействии IL23 с его рецептором (RIL23) на человеческих клетках через цепочку ферментов активируется ген трансдуктора и активатора транскрипции 3 (STAT3), результатом чего является синтез цитокинов Th17. Механизм, хотя и не идентичный, есть у человека и мышей. В ряде работ было показано, что снижение или полное отсутствие выработки цитокинов Th17 (IL17 и IL22) является наиболее существенным дефектом у больных СМС [1-3, 7, 17]. Также установлено [2, 3], что при низкой исходной продукции IL12 клетки больных СМС вырабатывали заметно меньше IL23 и значительно больше IL6 в ответе специфически только на *C. albicans* по сравнению с контролем. Было показано, что у людей *Candida*-специфические Т-клетки памяти имеют фенотип Th17 и экспрессируют хемокиновый рецептор, определяющий их хоминг в слизистые оболочки [2, 3, 7, 8]. В свете этих данных, низкие уровни IL23, продуцируемые клетками больных СМС в ответ на стимуляцию *C. albicans*, могут определять неспособность организма устанавливать и поддерживать антифунгальный Th17-ответ и приводить к нарушению клиренса грибов. Дефект Th17-ответа

посчитали *Candida*-специфическим, зависимым от распознавания АГ грибов, в которое, как было выше сказано, одновременно вовлекается множество рецепторов (TLR, Д1 и 2R, маннозный R, рецепторы к компонентам комплемента и т.д.) и сигнальных путей, активирующихся исключительно *C. albicans*.

Выявление повышенных уровней IL6 у этих больных исключительно важно, так как цитокин при этом может отменять супрессивные эффекты Т-регуляторных клеток и этим способствовать развитию повреждения тканей и облегчению инвазии гриба в условиях низкой выработки Th17-цитокинов и IL12 и последующей за этим недостаточности адаптивного защитного Th1-ответа, тем более, что в других исследованиях авторами показана высокая продукция IL10 ДК в *Candida*-стимулированных культурах клеток крови [2, 3]. В конечном итоге, цитокиновая дисрегуляция может определять неэффективность иммунного ответа, необходимого для очищения от грибов.

Но на современном этапе знаний, несмотря на концентрацию внимания исследователей иммунопатогенеза СМС на нарушении синтеза цитокинов пути IL6/IL23/IL17 как основного иммунного дефекта, следует признать, что экспрессия R и синтез цитокинов зависит от множества молекулярных участников (Рис. 1).

Поэтому открытие PRR, а затем **многоэтапных путей внутриклеточных передач информации**, полученной при взаимодействии микроорганизмов с этими R, внутри антиген-представляющих клеток

(АПК) внесло новые представления о возможных причинах, приводящих к СМС [7], и дефектный Th1-ответ может быть результатом нарушений распознавания, что и приводит к персистенции и размножению *Candida* spp. у больных СМС.

Принципиально можно представить [12-14], что ответ начинается с распознавания грибов на барьерной ткани, причем, первыми включаются антимикробные пептиды, хемокины и происходит взаимодействие указанных выше рецепторов с грибами, рецепторов с цитокинами. Эти взаимодействия, через ряд ферментных систем, активируют выработку цитокинов разными антиген-презентирующими клетками, клетками воспаления, переработку антигенного материала и передачу информации для организации адаптивного иммунного ответа, а также активации клеток памяти, которые, возможно, несут признаки Th17. При этом одновременно могут идти разные ответы через разные рецепторы и цитокины.

Потому было высказано предположение о том, что различные группы больных СМС или даже отдельные больные могут иметь разные дефекты иммунного пути и, следовательно, разный иммунопатогенез (Рис. 2), и только целостность этого пути ведет к защите от *Candida* [1, 2, 8].

В свою очередь, образование рецепторов, синтез ферментов, адапторных молекул, транскрипционных факторов и других транзиттеров первичного сигналинга, а также цитокинов кодируют гены, от полноценности и функции которых зависит, в конеч-

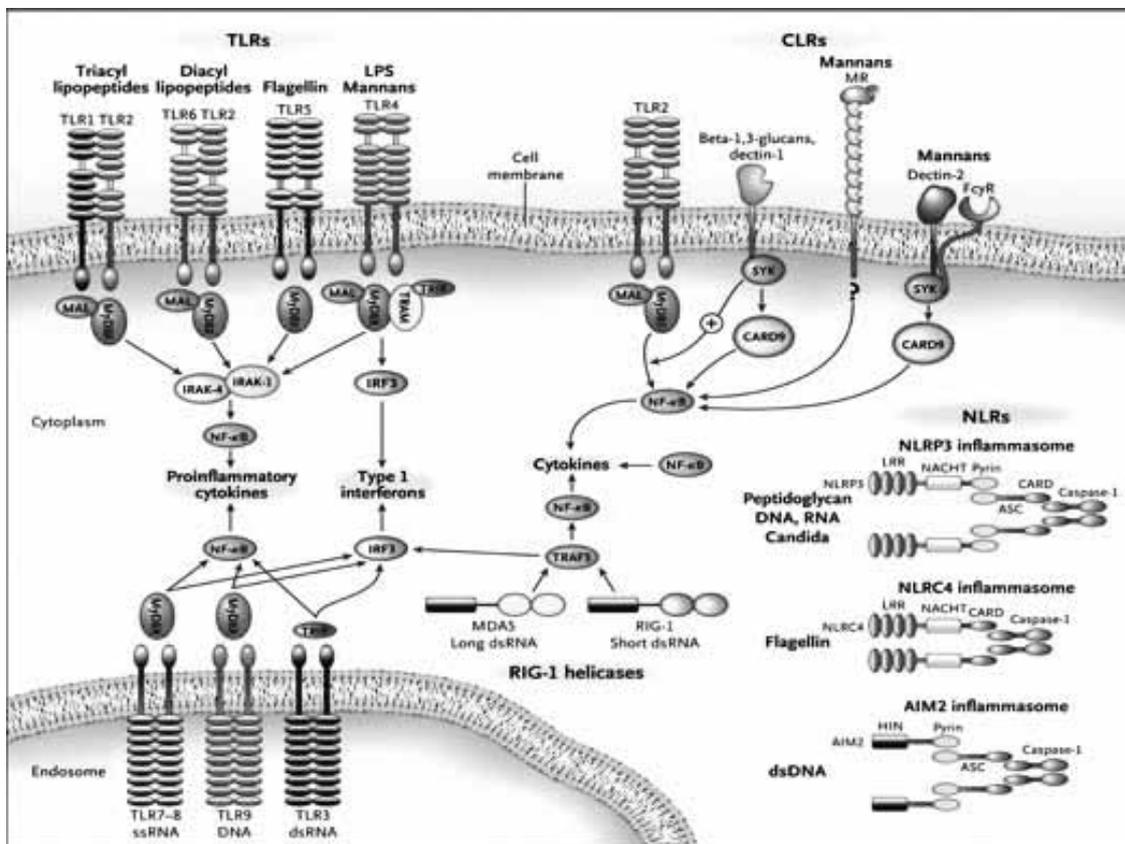


Рис. 1. Множественные пути передачи информации после контакта патогена с PRR (по M. G. Netea and J.W.M. van der Meer.) [14]

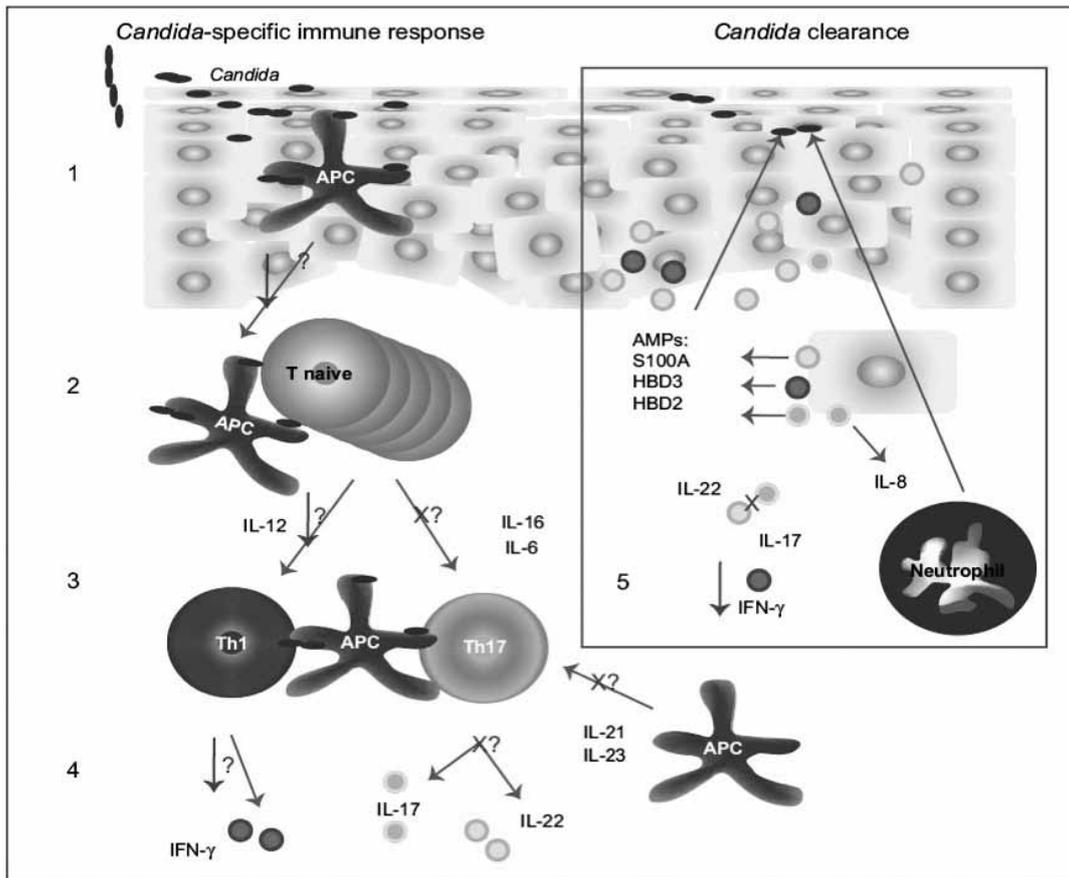


Рис. 2. Иммунопатогенез СМС (Eyerich K., et al.) [2]

ном итоге, весь ход иммунного ответа на грибы. На самом деле, уже известны генетические поломки при многих других первичных иммунодефицитах (ПИД). Обнаружено, что фенотипически похожие заболевания могут быть при дефектах генов, отвечающих за разные участки иммунного пути. Но при этом, конечно, нарушается полноценность всего ответа, несмотря на разные уровни повреждения. Это случай дефицита $IFN\gamma$, зависящего от IL12, когда различные дефекты повреждения IL12p40 или рецепторных цепей IL12/23R β , или $IFN\gamma R1$, или R2 приводят к похожему фенотипу в виде высокой чувствительности пациентов к микобактериальной и сальмонеллезной инфекциям [1]. Эти новые представления о причинах других ПИД, открытие генетических мутаций в гене-регуляторе при APESCED заставили исследователей обратить внимание на **возможные генетические причины нарушений в иммунных путях и повышенной чувствительности исключительно к Candida-инфекции** в других группах больных СМС. Поиском ответа на этот вопрос заняты многие зарубежные ученые. Обсуждают и изучают гены, кодирующие образование рецепторов, цитокинов, ферментов в путях внутриклеточной передачи информации в разных клетках – участницах иммунного ответа, включая клетки врожденной защиты и лимфоциты. Эти поиски принесли свои результаты.

Установлено, что Dectin-1 (D1) – основной трансмембранный PRR на АПК, который специфично связывается – распознает, соответственно, бета-

1,3-глюкан клеточной стенки грибов (Рис. 1, 3).

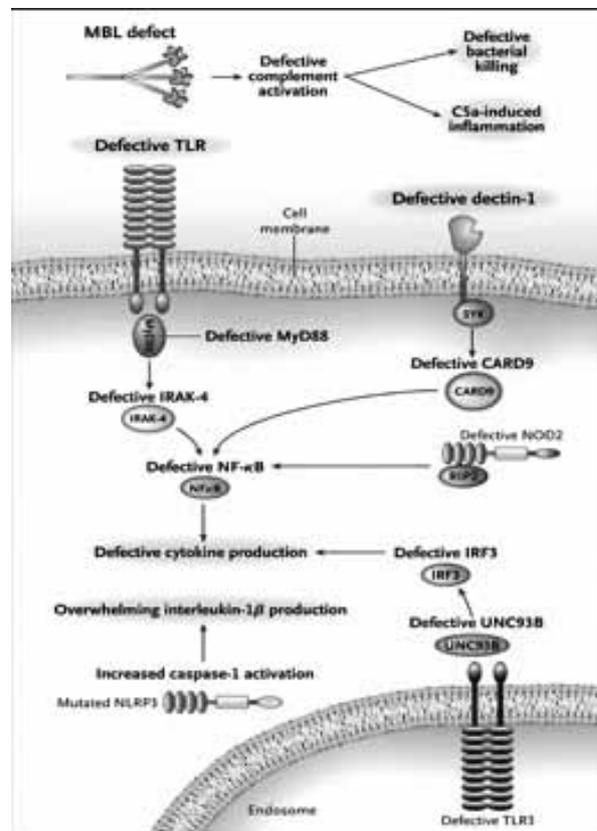


Рис. 3. Молекулярные дефекты защиты против *C. albicans* как причина СМС (по M. G. Netea and J. W.M. van der Meer.) [14]

При этом индуцируется сигнал через ITAM (Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif), который начинает фосфорилирование семьи тирозинкиназ (Src), что приводит к прикреплению и активации спленической тирозинкиназы (Syk). Комплекс D1-Syk включает ген соответствующего белка CARD9, который, вместе с генами и белками BCL10 и MALT 1 (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue 1), формирует сигнальный комплекс в АПК. В свою очередь, этот комплекс активирует транскрипционный нуклеарный фактор NFκB и митоген-ассоциированные белковые киназы в миелоидных клетках. Конечным результатом этого сигнального пути является продукция ключевых провоспалительных цитокинов IL1β, IL6 и IL23, которые требуются для развития эффективных антигрибковых иммунных ответов, в том числе – путь IL6/IL23/ Th17 [14].

Когда провели генетический анализ членов семьи, страдающих рецидивирующим кандидозным вульвовагинитом и онихомикозом, то обнаружили раннюю остановку кодирования в *CLEC7A*- гене, кодирующем D1, вызывающую потерю 10 аминокислотных остатков (АК) в экстрацеллюлярном карбогидрат-распознающем домене протеина. В результате АПК, в частности, макрофаги не могут связывать – распознавать бета-глюканы грибов. Соответственно, этот дефект приводит к отсутствию синтеза IL6, TNF и, особенно, IL17, хотя нейтрофильные гранулоциты больных могли поглощать и убивать *C. albicans*. Это означает, что D1 нужен только для распознавания и синтеза цитокинов, опосредующих выработку антимикробных пептидов (АМП) и активацию клетки, в том числе – для организации адаптивного ответа, и не участвует в фагоцитозе и киллинге дрожжей. Но фагоцитоз, опосредованный только нейтрофильными гранулоцитами, недостаточен для адекватной иррадикации грибов. Тем более, что дефект сигналинга через D1 касается, по-видимому, не только МФ и ДК, поскольку его также экспрессируют эпителиоциты и внутриэпителиальные Тγδ-клетки, которые при активации через этот сигнальный путь продуцируют цитокины и АМП [7, 14].

В другом исследовании [26], в семье с родственными браками, где у 4-х человек диагностировали СМС, была выявлена гомозиготная точечная мутация Q295X в терминальном кодоне на хромосоме 9q, включающем ген CARD9. Эта мутация приводила к несвоевременному развитию кодирования и низкой функции участника этого пути адаптерного протеина CARD9, что совпадало со значительно сниженными уровнями количества Th17 клеток. При функциональных исследованиях на основе генетической реконструкции миелоидных клеток Card9+ мышей показано, что мутация Q295X повреждает врожденный сигнальный путь от «паттерн-распознающего» рецептора D1 [18].

Кроме D1, есть другие рецепторы, связывающие лектины С-типа, D2 и MINCLE (макрофаги-индуцирующий лектиновый Р С-типа), которые тоже

используют CARD9 (Рис. 3), что может дополнительно быть причиной снижения потенциала противогрибковой защиты [14]. Врожденные дефекты распознавания паттернов, выявленные не только при *Candida*-инфекции, но и при других инфекциях, считают сейчас причиной иммунных нарушений, способствующих этим заболеваниям [14].

Таблица 1.

Пути врожденной передачи, клинические варианты СМС и выявленные мутации

Пути передачи СМС + клинические особенности	Мутации
АРЕСЕД- СМС + дисфункции эндокринных желез, АУР или АУД	Мутация в гене-регуляторе AIRE
АУР СМС с эндокринопатиями и дефицитом АТ	Мутация в гене RTPPN22
АУР СМС	Мутация CARD9-гена
АУР СМС	Неизвестная мутация гена IL17RA
АУД СМС	Мутация во 2-й хр.
АУД СМС	Неизвестная мутация гена синтеза IL-17F
АУД гипер-IgE-синдром +СМС+атопический дерматит, истощение, нарушение развития, диарея, другие инфекции	Мутация в STAT3 гене
АУД СМС с эндокринопатиями и без них	Разные мутации в гене STAT1

Примечание: АРЕСЕД — аутоиммунный полиэндокринный кандидоз-эктодермальный дистрофический синдром, АУР — ауторецессивный путь передачи, АУД — аутодоминантный путь передачи

Генетические дефекты уже выявили и на других участках путей передачи сигнала о грибах [14]. Так, показано, что у пациентов с аутосомно-доминантным (АУД) СМС причиной заболевания могут быть дефекты генов ферментов и транскрипционных факторов – участников начальных ответов на грибы через такие цитокины, как IL6, IL12, IL23 (Рис. 4) [19].

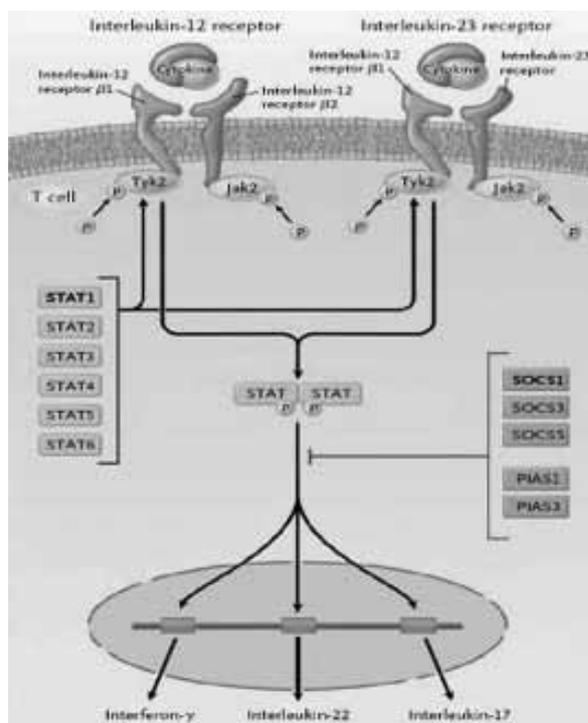


Рис. 4. Молекулярные участники пути IL12 – IL23 [19]

Уже выше было сказано, что немедленно при контакте структур гриба с R на АПК, последние начинают вырабатываться IL6 (его уровень достигает максимума уже через 2-3 часа), который взаимодействует с IL6R. Его IL6Ra экспрессируется преимущественно на НФ, МФ, гепатоцитах и некоторых ЛФ, а IL6R β – на всех клетках. Взаимодействие IL6 с IL6Ra приводит к активации Jak-киназы, которая, в свою очередь, фосфорилирует транскрипционный фактор STAT3. Он в результате поступает в ядро, где активирует гены АМП и цитокинов для иммунного ответа и воспаления. Одновременно активируется сигнальный путь, способствующий выживанию, активации и пролиферации клетки. Дефект STAT3 может ингибировать как воспалительные, так и противовоспалительные реакции, регулируемые IL6 и IL10, может снижаться содержание в коже АМП β -дефензинов, что может стать причиной абсцессов стафилококковой природы. В гене, ответственном за образование STAT3, могут быть точковые мутации, и тогда количество этого белка не будет меняться. Но фосфорилироваться он не будет, следовательно, не сможет выполнять свои функции. При гипер-IgE-синдроме, который нередко сопровождается распространенной *Candida*-инфекцией кожи и слизистых оболочек, обнаружили полное отсутствие фосфорилирования этих транскрипционных факторов, но причиной оказалась рецессивная гомозиготная мутация в гене тирозинкиназы Tyk2 [2, 14, 19].

В суперсемейство IL6R входят R для IL12 и IL23 [12, 13]. После взаимодействия IL12 или IL23 с их R, в передаче информации внутри клетки тоже участвуют адапторные молекулы Tyk2 и Jak2, активирующие гены транскрипционных факторов STAT, SOCS и PIAS и образование белков, ответственных за дальнейшую активацию генов синтеза цитокинов. Если имеется дефект одного из генов адапторных молекул, транскрипционных факторов, даже при нормальном синтезе этих цитокинов *in vitro* и нормальной экспрессии R к этим цитокинам, у человека нарушается адекватный ответ клеток пути IL23/IL17/и одновременно IL12/IFN γ [19]. При взаимодействии IL12 с IL12R киназы Tyk2 и Jak2 фосфорилируют тирозины в цепях рецептора, что приводит к созданию участка для связывания другого транскрипционного фактора STAT4. Он фосфорилируется этими же киназами, транслоцируется в ядро и активирует гены в клетках, способных интенсивно продуцировать IFN γ (NK, NKT, позже CD8+, CD4+, значительно слабее – в МФ и ДК), но в МФ при этом индуцируется образование мощного фунгицидного фактора оксида азота [7, 12]. Все эти пути определяют защиту, прежде всего, от внутриклеточных патогенов, а также грибов. При взаимодействии IL23 с IL23R используется такой же сигнальный, но транскрипционным фактором является STAT3, и активируется путь через IL17-продуцирующие клетки, но меньше образуется IFN γ [7, 13, 14, 18, 19]. Отметим, что все пути действуют одновременно, развиваются и ранний воспа-

лительный ответ, и поздний адаптивный.

Дефекты иммунных функций у больных СМС могут быть связаны и с мутациями в гене STAT1. Так, в этом гене обнаружили мутацию Phe172Ser, повреждающую СС-домен сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 1 (STAT1) у больных 1-й семьи, что приводит к снижению экспрессии STAT1-протеина и исключительно повреждает Th1- и Th17-ответы, возможно, модифицируя связь STAT1 с их связывающими структурами STAT3 и STAT4. У членов этой семьи, больных СМС, была дефектная продукция IL17, IL22 и IFN γ , но нормальные моноцит-зависимые цитокиновые ответы [19]. У больных членов в двух других семьях выявили мутацию Arg274Trp, низкий синтез IL17, гипотиреозидизм, причем у троих из них (СМС и гипотиреозидизмом) отмечали разные мутации (у 2 – с.800С→Т, у 1 – с.820→Т), которые могли нарушить взаимосвязи тиреотропин – продукция супрессора цитокинового сигналинга 1 (SOCS1). Это может повредить фосфорилирование STAT1. В свою очередь, мутантный STAT1 может препятствовать освобождению тиреотропина тиреоцитами и приводить к гипотиреозидизму. Другой причиной гипотиреозидизма может быть сниженное потребление йода, как описано у Stat1-дефектных мышей [19]. У двух наших больных СМС с гипотиреозом (клинически наблюдаются в клинике НИИ медицинской микологии СЗГМУ в течение многих лет заведующей 2 отделением к.м.н. Р.М.Чернопятовой и врачом Е.Г. Малеевой) также обнаружили 2 разные мутации в гене STAT1 – гетерозиготное выпадение участка гена, которое, в свою очередь, приводит к выпадениям аминокислотных остатков в этом транскрипционном факторе, что может быть причиной изменения его функции (неопубликованные данные, получены благодаря любезной помощи профессора Laslo Marodi в Department of Infectious and Pediatric Immunology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary).

Таким образом, STAT1, STAT2, STAT3 – транскрипционные факторы, которые, вместе с Jak 1, участвуют в передаче сигнала от R для IL12, IL23, ИФН α/β , а также R – для IL6 и IL10. Функциональная активность STAT1, STAT2, STAT3 и Jak 1 зависит от процесса фосфорилирования, который происходит при участии тирозинкиназы Tyk2 (Рис. 1, 4). И в то же время функциональная активность любого участника обеспечивается только соответствующим полноценным геном.

Признается, что, хотя для больных с дефектами сигнальных путей также, как и для классических ПИД, характерна повышенная восприимчивость к инфекциям, например, к СМС, но имеются и существенные отличия [19]. Так, их клиническая выраженность может быть исключительно варибельной: от тяжелых (в случае дефицитов MyD88 и IRAK-4) до мягких (в случаях дефицитов mannose-binding lectin R). К тому же клиническая тяжесть выше в детстве, но впоследствии уменьшается, возможно, потому,

что развившиеся адаптивные ответы компенсируют неэффективность врожденного иммунитета, в то время как тяжесть течения клинической картины классических ПИД сохраняется до конца жизни пациента. При наблюдении за больными СМС, на самом деле, бывают случаи стабилизации состояния больных с возрастом. В 2007 году Casanova and Abel [19] предсказали, что поиск редких семейных дефектов адаптивного иммунитета и их причин переместится к исследованию спорадических и селективных расстройств врожденной защиты, которые более распространены, чем классические. По-видимому, дефекты PRR и сигналингов являются примером

такого перемещения [19].

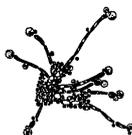
Из последних открытий в иммунологии и иммуногенетике следует, что неспособность очищаться от *Candida* spp. базируется на комплексном гетерогенном иммунном дефекте(ах). Разные группы больных или отдельные больные имеют различные клинические симптомы и различные дефекты в одном и том же пути иммунного ответа, необходимого исключительно для защиты от *Candida*, известные или еще неизвестные генетические дефекты, но у них **всегда есть селективная чувствительность к кожно-слизистому кандидозу – СМС.**

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lilic D.* Candida. Chapter 16.- P.361-382 in Brown G.D. and Netea M.G.(eds.) Immunology of Fungal infections. – London, 2007. – 481 p.
2. *Eyerich K., Eyerich S., Hiller J., et al.* Chronic mucocutaneous candidiasis from bench to bedside // Eur. J. Dermatol. – 2010. – №20. – Т.3. – P. 260-265.
3. *Ryan K. R., Hong M., Arkwright P.D., et al.* Impaired dendritic cell maturation and cytokine production in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without APECED// Clin. and Exp. Immunol. – 2008. – №154. – P. 406-414.
4. *Notarangelo L., Casanueva J.-L., Conole M.E., et al.* For the international union of immunological societies (IUIS) primary immunodeficiency diseases classification committee // J. Allergy Clin. Immunol. – 2006. – №117. – P. 883-896.
5. *Puel A., Doffinger R., Natividad A., Crabich M., et al.* Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type 1 // J. Exp. Med. 2007. – Vol. 207. – №2. – P. 291-297.
6. *Romani L.* Immunity to fungal infections//Nature Publishing Group. Nature Reviews. Immunology. –2004. – Vol. 4. – P. 1-13.
7. *Шабашова Н.В.* Грибы и иммунитет (взаимоотношения грибов и макроорганизма-хозяина: от носительства до инвазии). Учебное пособие. – СПб.: СПбМАПО, 2009. – 93 с.
8. *Шабашова Н.В.* Иммунодефициты при хроническом кандидозе кожи и слизистых оболочек // Проблемы мед. микологии. – 2009. – Т. 11, №1. – С. 3-10.
9. *Spellberg B. and Edwards J.E., Jr.* Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases//Clin. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 32(1 January). – P. 76-102.
10. *Lilic D.* New perspectives on the immunology of chronic mucocutaneous candidiasis //Curr. Opin. in Infect. Dis. – 2002. – №15. – P. 143-147.
11. *Иммунология и аллергология /* Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В.Караулова. – М.: Практ. Медицина, 2006. – 288 с.
12. *Ярилин А.А.* Иммунология: учебник. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
13. *Хаитов Р.М., Ярилин А.А., Пинегин Б.В.* Иммунология. Атлас. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 624 с.
14. *Netea M. G. and van der Meer J. W.M.* Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors//N. Engl. J. Med. – 2011. – Т. 364. – №6. – P. 60-70.
15. *Graaf C.A.A., Netea M. G., Dronthe J.P.H., et al.* Candida-specific interferon- γ deficiency and Toll-like receptor polymorphisms in patients with chronic mucocutaneous candidiasis// Nider. J. Med. – 2003. –Vol. 61. – №11. – P. 365-369.
16. *Hong M., Ryan K.R., Arkwright P.D., et al.* Pattern recognition receptor expression is not impaired in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy//Clin. & Exper. Immunol. – 2009. – Vol. 156. – P. 40-51.
17. *Eyerich K., Foerster S., Rombold S., Seidl H-P, et al.* Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22// J. of Invest Dermatol. –2008. – Vol. 128. – P. 2640-2645.
18. *Glocker E.-O., Hennigs A., Nabavi M., et al.* A homozygous CARD9 Mutation in family with Susceptibility to Fungal Infections //N. Engl. J. Med. – 2009. – Vol. 361. – №18. – P. 1727-1735.
19. *Veerdonk F.L., Plantinga T.S., Hoischen A., et al.* STAT1 mutations on autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis //N. Engl. J. Med. – 2011. – Т. 365. – P. 54-61.

Поступила в редакцию журнала 01.11.2012

Рецензент: Е.В. Пронина



СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРБИНАФИНА (ЛАМИЗИЛА) И АМОРОЛФИНА (ЛОЦЕРИЛА) В КОМБИНАЦИИ ПРИ ОНИХОМИКОЗЕ СТОП

**Котрехова Л.П. (доцент кафедры,
зав. отделением)***

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина
Северо-Западного государственного медицинского
университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург,
Россия

© Котрехова Л.П., 2012

В статье приведены результаты одноцентрового, проспективного, рандомизированного, открытого, сравнительного исследования эффективности комбинированной терапии тербинафином (Ламизилом) и аморолфином (Лоцерилом) с аппаратной подчисткой ногтей и монотерапии тербинафином (Ламизилом) у больных с онихомикозом стоп, протекающим с прогностически неблагоприятными клиническими проявлениями. При исследовании выявили, что полная эффективность комбинированной антифунгальной терапии составила 80,8%, а эффективность монотерапии системным антимикотиком – 58,3%.

Ключевые слова: Ламизил, Лоцерил, онихомикоз стоп

COMPARATIVE STUDY OF COMBINATION THERAPY OF TERBINAFINE (LAMISIL) AND AMOROLFINE (LOCERYL) IN PATIENTS WITH FEET ONYCHOMYCOSIS

**Kotrekhova L.P. (associate professor, head
of the department)**

Kashkin Research Institute of Medical Mycology,
North-Western State Medical University named after I.I.
Mechnikov, St. Petersburg, Russia

© Kotrekhova L.P., 2012

Results of single-center, prospective, randomized, open, comparative study of combination therapy of terbinafine (Lamisil) and amorolfine (Loceryl) with hardware cleanup and nails alone terbinafine (Lamisil) in patients with feet onychomycosis flowing with prognostically

* Контактное лицо: Котрехова Любовь Павловна,
Тел.: (812) 303-51-40

unfavorable clinical manifestations have been presented in this article. During the study revealed that the full effectiveness of combination antifungal therapy was 80,8%, and the full effectiveness of therapy only systemic antimycotic alone – 58,3%.

Key words: feet onychomycosis, Lamisil, Loceryl

Микоз ногтей (онихомикоз) – наиболее частая причина изменения ногтевых пластинок кистей и стоп. На его долю приходится более половины всех случаев заболеваний ногтей. При онихомикозе чаще поражаются ногтевые пластинки стоп, а также может иметь место сочетанное поражение ногтей кистей и стоп. Реже всего при онихомикозе наблюдаются изолированное поражение кистей, которое, как правило, имеет дрожжевую природу и чаще развивается у женщин, в отличие от онихомикоза стоп, к которому более предрасположены мужчины [1]. При онихомикозе подвержены инфицированию все анатомические структуры ногтя: сама ногтевая пластинка, ногтевое ложе и матрикс ногтя. При поражении ногтей недерматомицетами (дрожжами и плесневыми микромицетами) в патологический процесс могут вовлекаться околоногтевые валики и развиваться паронихии. Притом, что онихомикоз не является угрожающим жизни заболеванием, его развитие порождает большое количество психосоматическим проблем. Возникающие болезненные ощущения при онихомикозе, неприглядный внешний вид ногтей, их деформация, а также боязнь заразить близких вызывают физический и эмоциональный дискомфорт у больных, что значительно ухудшает их качество жизни (Lubeck D.P., 1998).

В группы риска заболевания онихомикозом входят пожилые люди, старше 60 лет, больные сахарным диабетом, лица, страдающие нарушением кровообращения в конечностях, больные иммунодефицитными состояниями (Корнишева В.Г., 1998; Руковишников В.М., 1999).

Длительно протекающие, распространенные формы онихомикоза с поражением матрикса ногтей, развитием онихолизиса, онихогрифоза и дерматомикоза наиболее тяжело поддаются терапии. Эти клинические особенности онихомикоза, как и перечисленные выше заболевания, сопровождаются отрицательными результатами лечения. Такие клинические проявления онихомикоза считают «плохими» прогностическими признаками, способствующими неэффективности антифунгальной терапии онихомикоза [2-4]. Одним из способов повышения ее эффективности является применение комбинированных способов лечения, когда одновременно назначают два антимикотика – системного и местного действия. Этот метод позволяет увеличить эффективность лечения на 10-15% [5]. В качестве противогрибкового средства системного действия обычно назначают один из трех антимикотиков: тербинафин, итраконазол или флуконазол. Для местного применения используют один из антифунгальных лаков, содержащих аморолфин (Лоцерил) или циклопи-

рокс. Лекарственная форма – лак для ногтей и вспомогательные вещества этих препаратов обеспечивают их фиксацию на ногтях и способствуют глубокому проникновению в ногтевую пластинку, создавая необходимую МИК для большинства возбудителей онихомикоза. Эффективность применения антифунгальных лаков была доказана многоцентровыми рандомизированными клиническими испытаниями, в отличие от эффективности участвовавшего в России применения других лекарственных форм антифунгальных препаратов – растворов, кремов и мазей (Annemarie P., 1993).

Более 10 лет в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина при лечении больных онихомикозом применяют аппаратную чистку ногтей, в результате которой, максимально, как это, возможно, удаляют все визуально пораженные участки ногтевой пластинки. Отметим, что такая подготовка ногтей перед проведением антифунгальной терапии обеспечивает лучшее проникновение противогрибкового лака в пораженные ногти и это, в свою очередь, повышает эффективность антифунгальной терапии онихомикоза стоп. Применение подготовки ногтевых пластинок, а именно – их чистки, основано на лабораторных исследованиях, доказывающих, что аморолфин лучше накапливается в плотных частях ногтя, а в рыхлой её части и на участках онихолизиса его концентрация снижается [6].

Для подтверждения нашей гипотезы, о том, что комбинированное лечение онихомикоза стоп антимикотиками системного и местного действия, в сочетании с аппаратной чисткой ногтей стоп, обеспечивает повышение эффективности противогрибковой терапии онихомикоза стоп, было проведено настоящее исследование.

Цель исследования – доказать превосходство комбинированной терапии над системной антифунгальной монотерапией онихомикоза стоп, протекающего с прогностически неблагоприятными клиническими проявлениями.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Исследование проводили в рамках диссертационной работы Л.П. Котреховой на соискание ученой степени доктора медицинских наук с 2008 по 2012 год. Протокол исследования был одобрен на заседании Локального этического комитета ГОУ ДПО СПб МАПО в январе 2008 года.

По дизайну исследование было одноцентровым, проспективным, рандомизированным, открытым и сравнительным.

В комбинированную терапию включали: аппаратную чистку ногтей с удалением фрезой всех доступных для этого пораженных участков ногтевой пластинки; системный антимикотик – тербинафин (лализил) в дозе 250 мг/сутки сроком на 12 недель; применение лака с аморолфином (лоцерил) 2 раза в 7 дней сроком 26 недель. При монотерапии назначали только тербинафин (лализил) в дозе 250 мг/сутки

сроком 12 недель. Выбор антифунгального средства был обусловлен тем, что тербинафин обеспечивает большую эффективность, по сравнению с другими антимикотиками, за счет фунгицидного действия по отношению к основным возбудителям онихомикоза и за счёт высокой биодоступности действующего вещества. Кроме того, аморолфин в лаке лоцерил оказывает фунгицидное действие и обладает хорошей проникающей способностью в ногтевую пластинку.

Критериями включения в исследование были: подписание больными информированного согласия, возраст больных от 18 лет и старше; онихомикоз стоп, подтвержденный положительными результатами микологических исследований – прямой микроскопией с применением 10% раствора КОН и/или посева на среду Сабуро; поражение более 2 ногтевых пластинок стоп; площадь поражения >50 %; один или более прогностических неблагоприятных фактора: поражение матрикса ногтя, наличие дерматофитом, онихолизис >25% площади ногтя, толщина ногтя >2 мм, рост ногтя <1 мм в течение 8 недель.

Критерии исключения из исследования: отсутствие информированного согласия; возраст больных меньше 18 лет; отсутствие лабораторного подтверждения онихомикоза; беременность и лактация; алкогольная и наркотическая зависимости; легкое течение онихомикоза, не требующее назначения системной антифунгальной терапии; нарушение функции печени и почек; непереносимость компонентов исследуемых препаратов (тербинафина, аморолфина).

В протокол исследования входило 6 визитов пациентов. На первом визите (скрининге) больной подписывал информированное согласие и далее подвергался физикальному осмотру, проверке соответствию критериям включения и исключения, забору крови и мочи для лабораторных исследований, забору ногтевых пластинок для микологических исследований. Всем пациентам при первом визите проводили исследования общего анализа мочи, клинического и биохимического (АЛТ, АСТ, билирубин, креатинин) анализов крови.

Второй визит больные осуществляли через 2 недели после получения результатов микологических исследований, анализов крови и мочи. Повторно проверяли соответствие пациента критериям включения или исключения для лечения онихомикоза комбинированным методом. После этого выполняли процедуру рандомизации при помощи программы генератора случайных чисел (Statistica 5.5) и больного распределяли в одну из исследуемых групп. Больные первой группы получали комбинированную терапию антимикотиком системного действия – тербинафином (лализил) и противогрибковым лаком с аморолфином (лоцерил); больные второй группы – только тербинафин (лализил) в стандартной дозировке и по стандартной схеме. Перед назначением антифунгальной терапии при втором визите пациентам первой группы проводили аппаратную обработку пораженных ногтевых пластинок. Всем больным

выдавали дневники наблюдения, где они ежедневно должны были отмечать прием препарата, нанесение лака и нежелательные явления в случае их развития.

На третьем визите (через 6 недель от начала лечения) больным проводили контрольные анализы крови (клинический и биохимический), мочи, проверяли дневник (соблюдение комплаентности) и отмечали нежелательные явления. В случае их развития оценивали возможность продолжения системной терапии. При невозможности приема системного антимикотика, больного исключали из исследования.

В четвертый визит (через 12 недель от начала терапии) предусматривали окончание системной терапии. Больным проводили контрольные анализы крови (клинический и биохимический), мочи, проверяли дневник (соблюдение комплаентности) и отмечали нежелательные явления.

При пятом визите (26 недель от начала терапии) осуществляли: забор ногтевых пластинок для проведения микологического исследования, проверку дневников – фиксирование нежелательных явлений при применении лака с аморолфином (лоцерил). За неделю до последнего визита (на 25 неделе) больные прекращали применение противогрибкового лака. По результатам микологического исследования выполняли промежуточную оценку эффективности лечения – микологического, клинического и полного.

В шестой визит (52 неделя от начала лечения) у пациентов осуществляли забор ногтевых пластинок для проведения микологического исследования. По его результатам определяли итоговую оценку эффективности лечения – микологического, клинического и полного.

После расчета необходимого объема исследуемых групп больных, при мощности исследования на уровне 90%, уровне статистической значимости – 0,05 и стандартизованном различии – 0,4, в группы исследования были распределены случайным выбором по 120 больных онихомикозом стоп.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование было включено 240 больных в возрасте от 21 года до 87 лет, которые были разделены на две группы по 120 человек. Первую группу составили 120 больных онихомикозом: 58 мужчин (48,3%) в возрасте от 21 года до 82 лет ($54,4 \pm 16,8$) и 62 женщины (51,7%) в возрасте от 24 до 85 лет ($54,2 \pm 15,5$). Им была назначена комбинированная терапия, сочетающая аппаратный педикюр, прием тербинафина и нанесение лака лоцерил. Вторую группу составили 120 больных онихомикозом: 56 мужчин (46,7%) в возрасте от 23 до 87 лет ($53,9 \pm 15,6$) и 64 женщины (53,3%) в возрасте от 24 до 85 лет ($49,7 \pm 15,7$), которым была назначена монотерапия тербинафином. Различий по полу и возрасту в группах не наблюдали ($p > 0,05$).

Также не выявили различий в группах по количеству пораженных ногтей и количеству неблагоприятных для прогноза лечения симптомов. В первой группе количество пораженных ногтей было от 3 до

10 (медиана – 6,0; 25%-75% интерквартильный размах – 4-9%), во второй – от 3 до 10 (медиана – 6,5; 25%-75% интерквартильный размах – 5-9%) (критерий U, $p = 0,3$). Суммарное количество неблагоприятных симптомов у больных первой группы – от 2 до 12 (медиана – 7,0; 25%-75% интерквартильный размах – 5-10%), во второй – от 3 до 11 (медиана – 6,5; 25%-75% интерквартильный размах – 5-9 %) (критерий U, $p = 0,5$).

В результате проведенного лабораторного исследования установлено, что основными возбудителями онихомикоза у больных 1 группы были дерматомицеты – 69% случаев, 2 группы – 72%. У 31% больных 1 группы возбудители не были верифицированы до вида, диагноз устанавливали на основании результатов микроскопии. Во 2 группе методом микроскопии диагноз онихомикоза был подтвержден у 28% пациентов. Среди дерматомицетов доминировал *Trichophyton rubrum*, который выделяли в 71% случаев, *T. mentagrophytes* – в 19%, *Epidermophyton floccosum* – в 10%. Ни одного случая достоверного поражения ногтевых пластинок недерматомицетами установлено не было.

Исследование закончили все 120 больных 1 группы и 120 больных 2 группы. Прекращения лечения из-за развития нежелательных явлений не было.

К концу 26 недели от начала лечения клиническое выздоровление наблюдали у 83,3% (100 из 120) больных онихомикозом, получавших комбинированную терапию тербинафином и аморолфином (лоцериллом), и у 64,2% (77 из 120) пациентов, получавших монотерапию тербинафином ($\chi^2 = 11,4$; $p = 0,00074$). Результаты микологического исследования были отрицательными у 87,5% (105 из 120) больных, получавших комбинированную терапию и у 70,0% (84 из 120) пациентов, получавших монотерапию тербинафином ($\chi^2 = 10,9$; $p = 0,00092$). Полное выздоровление отметили у 80,8% (97 из 120) пациентов, получавших комбинированную терапию системным антимикотиком и противогрибковым лаком, и у 58,3% (70 из 120) человек, получавших монотерапию системным антимикотиком ($\chi^2 = 14,4$; $p = 0,00015$). Таким образом, полное выздоровление (эффективность) было на 22,5% выше в группе больных, получавших комбинированную терапию тербинафином и лоцериллом, чем в группе больных, получавших монотерапию тербинафином.

Отдаленными результатами исследования показано, что разница полной эффективности терапии между группами больных незначительно возросла до 25%. К концу 52 недели полное выздоровление установили у 77,5% (93 из 120) пациентов 1 группы, получавших комбинированную терапию системным антимикотиком и противогрибковым лаком. У больных, получавших монотерапию системным антимикотиком, полная эффективность была достигнута только у 52,0% (63 из 120) ($\chi^2 = 16,5$; $p < 0,0001$). Клиническое выздоровление наблюдали в первой группе у 86,7% (104 из 120) больных, а во второй группе – у 61,7% (74 из 120) больных ($\chi^2 = 19,6$; $p < 0,0001$). Мико-

логическое выздоровление выявили у 80,8% (97 из 120) больных 1 группы и у 57,5% (69 из 120) – 2 группы ($\chi^2=15,3$; $p<0,0001$).

В течение всего периода приема тербинафина все пациенты отмечали хорошую переносимость препарата, только у 1 больного к концу 12 недели от начала приема появилось изменение вкусовой чувствительности. Других нежелательных явлений не было (как и не обнаружили их при применении лоцерила).

ВЫВОДЫ

1. Эффективность (микологическая, клиническая, полная) комбинированной терапии, включающей аппаратную подчистку ногтей, прием системного анти-

микотика тербинафина, нанесение лака аморолфина (Лоцерил) выше на 22,5% по окончании лечения, и на 25% – через 6 месяцев после окончания лечения, чем монотерапия системным антимикотиком тербинафином у больных онихомикозом стоп, протекающим с прогностически неблагоприятными клиническими проявлениями.

2. Аппаратный педикюр, за счет удаления измененных участков ногтевой пластинки, обеспечивает лучшую проникаемость лака лоцерил, что способствует повышению эффективности антифунгальной терапии у больных онихомикозом стоп, протекающим с прогностически неблагоприятными клиническими проявлениями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gupta A.K., Drummond-Main C., Cooper E.A., et al. Systematic review of nondermatophyte mold onychomycosis: diagnosis, clinical types, epidemiology, and treatment // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2012. – Vol. 66, №3. – P. 494-502.
2. Gupta A.K., Cooper E.A. A Simple algorithm for the treatment of dermatophyte toenail onychomycosis. *Skin therapy letter family practice.* – 2008. – Vol. 4, №3. – P. 1-3.
3. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Разнатовский К.И. Дерматомикозы, или поверхностные микозы кожи и её придатков – волос и ногтей. Лабораторная диагностика // *Проблемы медицинской микологии.* – 2008. – Т.10, №1. – С. 27-34.
4. Кубасова Н.А., Пупкова М.А., Клиценко О.А., Васильева Н.В. Особенности диагностики и лечения онихомикоза стоп, обусловленного нитчатыми недерматомицетами и дрожжами // *Проблемы медицинской микологии.* – 2010. – Т. 12, №3. – С. 25-28.
5. Baran R., Kaoukhov A. Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and combination therapy // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* – 2005. – Vol. 19. – P. 21-29.
6. Neubeat R.H.H., Gensbogel C., Jäckel A., Waatewing S. Different physico-chemical properties of antifungal drugs that affect their penetration through the nails and the nail plate in humans // *Pharmazie.* – 2006. – Vol. 61. – P. 604-607.

Поступила в редакцию журнала 03.12.2012

Рецензент: А.В. Сухарев



ОСТРЫЙ ДИССЕМИНИРОВАННЫЙ ФУЗАРИОЗ (ОБЗОР). ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ

¹Хостелиди С.Н. (ассистент кафедры),
²Мошникова С.М. (врач-гематолог),
²Мясников А.А. (зав. отд.), ²Здоров А.Е.
(доцент кафедры), ¹Богомолова Т.С. (зав.
лаб.), ¹Климко Н.Н. (зав.кафедрой)

¹ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург; ²ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова», г. Петрозаводск, Россия

© Коллектив авторов, 2012

Инвазивные микозы в последние годы становятся актуальной клинической проблемой. В статье представлен клинический случай диссеминированного фузариоза у пациентки с острым лимфобластным лейкозом на фоне длительного агранулоцитоза. Проведен анализ литературы.

Ключевые слова: вориконозол, острый лимфобластный лейкоз, фузариоз, *Fusarium* spp.

ACUTE DISSEMINATED FUSARIOSIS (REVIEW). CLINICAL CASE

¹Khostelidi S.N. (assistant lecturer of the chair), ²Moshnina S.M. (hematologist),
²Myasnikov A.A. (head of the department),
²Zdorov A.E. (associate professor of the chair), ¹Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ¹Klimko N.N. (head of the chair)

¹North-Western State Medical University named after I.I.Mechnikov, St. Petersburg; ²GBUZ «V.A.Baranov Republican Hospital», Petrozavodsk, Russia

Invasive mycoses are the actual problem last years. We presented the clinical case of dissemination fusariosis at the woman with acute lymphoblastic leukemia and prolong agranulocytosis. We analyzed the special literature.

Key words: acute lymphoid leukemia, fusariosis, *Fusarium* spp., voriconazole

ВВЕДЕНИЕ

Фузариоз – тяжелая оппортунистическая инфекция, характеризующаяся быстрой диссеминацией микотического процесса и высокой летальностью. В настоящее время во всем мире отмечают рост частоты инвазивных микозов, особенно – у онкогематологических больных. Это связано не только с совершенствованием методов диагностики микозов, но и с более «агрессивными» схемами цитостатической терапии, широким использованием трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и органов как «терапии спасения» [1, 2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Представлен клинический случай диссеминированного фузариоза у пациентки с острым лимфобластным лейкозом на фоне длительного агранулоцитоза. Для постановки диагноза инвазивного микоза (фузариоза) были использованы клинические и лабораторные критерии, предлагаемые Европейской организацией по изучению и лечению рака (EORTC) и группой, исследующей микозы (MSG) Национального института алергологии и инфекционных заболеваний (NIAID) НИН США (De Pauw B., et al. 2008). Также авторы провели анализ данных из научной литературы в базах PubMed (на октябрь 2012 г.), Wiley Interscience (на октябрь 2012 г.) и Cochrane Library (на октябрь 2012 г.).

Описание клинического случая

Больная М., 57 лет, была госпитализирована на гематологическое отделение республиканской больницы, г. Петрозаводска в мае 2012 года.

При поступлении предъявляла жалобы на выраженную слабость, повышение температуры тела, одышку при физической нагрузке, головокружение.

Из анамнеза заболевания выяснили, что у пациентки в апреле 2012 г. впервые появились головокружения, боли в правой голени и правом бедре, выраженная общая слабость. При обследовании амбулаторно по месту жительства был выполнен клинический анализ крови, в котором выявили бластэмию (бласты – 48%), в связи с чем женщину госпитализировали в гематологическое отделение для уточнения диагноза и лечения.

Из анамнеза жизни известно, что ранее отмечала редкие ОРВИ и ангины. В течение 5 лет наблюдала периодические подъемы артериального давления до 140/90 мм.рт.ст.; постоянную гипотензивную терапию не получала. Также в течение 5 лет страдала варикозной болезнью сосудов нижних конечностей, сопровождающейся тромбозом поверхностных вен преимущественно правой голени, по поводу чего периодически получала фраксипарин (1,2 мг). Последний прием – с 4.05.2012 по 12.05.2012 гг. включительно, явления острого тромбоза купированы. В 2010 году течение заболеваний осложнилось формированием трофической язвы правой голени, в настоящее время – стадия эпителизации. Наследственность не отягощена. Аллерго-анамнез без особенностей.

При объективном осмотре общее состояние удовлетворительное. Сознание ясное. Кожные покровы бледные. Над легочными полями дыхание жесткое, хрипов нет, частота дыхательных движений – 16 в минуту. Тоны сердца

ясные, шумов нет. Артериальное давление – 120/80 мм рт. ст. Частота сердечных сокращений – 90 в минуту. Живот при пальпации безболезненный. Гепато- и спленомегалии не выявили. Диурез адекватный. Симптом поколачивания по поясничной области – отрицательный с обеих сторон. Пастозность голеней. Периферические и внутригрудные лимфатические узлы не увеличены. В области внутренней поверхности нижней трети правой голени – одиночная трофическая язва в стадии эпителизации.

При обследовании в клиническом анализе крови: Нб. – 139 г/л, эр. – $4,3 \cdot 10^9$ /л, л. – $24 \cdot 10^9$ /л, мц. – 1%, п. – 2%, с. – 23%, э. – 1%, б. – 1%, лимф. – 20%, мон. – 4%, лимфоциты – 48%, тр. – $165 \cdot 10^6$ /л. В клиническом анализе мочи – без патологии. В биохимическом анализе обнаружили высокий уровень ЛДГ – 1386,6 Ед/л.

При ультразвуковой диагностике органов брюшной полости данных за гепатоспленомегалию нет, периферические лимфатические узлы не увеличены. На рентгенограмме органов грудной полости – легкие и сердце в пределах возрастной нормы, внутригрудной лимфаденопатии нет.

Пациентка была проконсультирована сосудистым хирургом – терапия фраксипарином отменена в связи с купированием явлений тромбоза.

По результатам проведенной стерильной пункции выявили тотальную инфильтрацию костного мозга лимфоцитами, иммунофенотипически – острый лимфобластный лейкоз из В-клеток предшественников, с коэкспрессией антигенов CD7, CD 33, CD71, TdT-75,2%, цитогенетически – комплексный кариотип – 46,XX,del(7)(q23){7}/46,XX,t(9;22)(q34;q11){10}/45,X,t(1;12),t(9;22){1}/46,XX,t(1;12){2}.

10.05.2012 г. диагностировали Ph-положительный, В-острый лимфобластный лейкоз из клеток предшественников, с комплексными абберациями кариотипа.

12.05.2012 г. была начата полихимиотерапия (ПХТ) по программе ALL-Ph(+)-2005. Проведена предфаза преднизолоном (120 мг/сутки в течение 28 дней), на седьмой день терапии преднизолоном купирован лейкоцитоз (л. – $7,2 \cdot 10^9$ /л, п. – 4%, с. – 48%, б. – 1%, лимф. – 37%, мон. – 10%), на десятый день купирована бластемия. В гемограмме после завершения фазы индукции (11.07.2012 г.): Нб. – 111 г/л, эр. – $3,58 \cdot 10^9$ /л, тр. – $416 \cdot 10^9$ /л, л. – $1,8 \cdot 10^9$ /л (п. – 3%, с. – 21%, б. – 1%, лимф. – 58%, мон. – 13%), СОЭ – 5 мм/час. Через 10 дней при амбулаторном контроле в клиническом анализе крови: Нб. – 106 г/л, эр. – $3,3 \cdot 10^9$ /л, л. – $9,7 \cdot 10^9$ /л, п. – 2%, с. – 70%, э. – 1%, б. – 1%, лимф. – 18%, мон. – 8% (б. лее $1 \cdot 10^9$ /л). В биохимическом анализе крови уровень ЛДГ нормализовался – 432 Ед/л. Таким образом, общая продолжительность агранулоцитоза была более 30 суток.

27.07.12 г. пациентка была повторно госпитализирована в гематологическое отделение для выполнения консолидационного курса ПХТ (МТХ + высокодозный цитозар). При осмотре на отделении общее состояние удовлетворительное. Сознание ясное. Кожные покровы розовые, явления винкристиновой периферической полинейропатии. Над легочными полями дыхание жесткое, хрипов нет, частота дыхательных движений (ЧДД) – 17 в минуту. Тоны сердца ясные, шумов нет. Артериальное давление (АД) – 140/80 мм рт. ст. Частота сердечных сокращений (ЧСС) – 74 в минуту. Живот при пальпации безболезненный. Гепато- и спленомегалии не выявили. Диурез адекватный. Симптом поколачивания по поясничной области – отрицательный с обеих сторон. Пастозность голеней. Периферические и внутригрудные лимфатические узлы не увеличены. В области внутренней поверхности нижней трети правой голени – трофическая язва в стадии эпителизации.

Проявлений нейролейкоза нет. В клиническом анализе крови: л. – $8,2 \cdot 10^9$ /л, п. – 1%, с. – 84%, б. – 1%, э. – 5%, лимф. – 8%, мон. – 1%.

27.07.2012 г. был введен эндолумбально триплет (метотрексат 15 мг, дексамед 4 мг, цитозар 40 мг), 03.08.2012 г. проведена терапия лейковорином. На момент окончания ПХТ гемограмма: л. – $8,2 \cdot 10^9$ /л, п. – 1%, с. – 84%, б. – 1%, э. – 5%, лимф. – 8%, мон. – 1%.

6.08.2012 г., на 6 день после окончания ПХТ стала нарастать общая слабость, головокружение, появился кожный зуд. Впервые наблюдали подъем температуры до 38 °С. Дополнительно проводили антибактериальную терапию (цефотаксим 6 г/сутки). В связи с появлением признаков орофарингеального кандидоза (грязно-серые налеты на небе, белесоватые налеты на миндалинах) назначили флуконазол в дозе 200 мг/сутки в течение 16 дней. В клиническом анализе крови: л. – $1,5 \cdot 10^9$ /л, п. – 1%, с. – 56%, б. – 0%, э. – 16%, лимф. – 27%, мон. – 1%. В биохимическом анализе крови отмечали высокий уровень трансаминаз (АЛАТ – 336 Е/л, АСАТ – 362 Е/л), а также уровень билирубина (общий – 43,1 мкмоль/л, прямой – 18,4 мкмоль/л, непрямой – 24,7 мкмоль/л). Данные показатели были восстановлены в течение недели на фоне применения гепатопротекторов.

8.08.2012 г. появилась эритема кожи лица, рук, бедер, верхней половины грудной клетки, эксфолиативный дерматит в области катетеризации подключичной вены справа (ЦВК с 30.07.2012 г.). 10.08.2012 г. состояние ухудшилось – десквамация эпителия спины, бедер, предплечий, кожи живота, ног, десквамация эпителия кожи губ, с геморрагиями, без экссудативного компонента. Изменения на коже были расценены как эксфолиативный дерматит по типу Стивенса-Джонсона на введение метотрексата. В этот же период в клиническом анализе крови наблюдали признаки панцитопении: Нб. – 82 г/л, эр. – $2,58 \cdot 10^9$ /л, л. – $0,7 \cdot 10^9$ /л (всего найдено 60 клеток: с. – 7 клеток, э. – 14 клеток, лимф. – 39 клеток), тр. – $15 \cdot 10^9$ /л. Учитывая выраженную аплазию гемопоэза, фебрильную нейтропению, от введения высоких доз глюкокортикостероидов решено было воздержаться.

В связи с сохраняющейся лихорадкой и панцитопенией, 8.08.2012 г. к терапии добавили сульперацеф – 4 г/сутки, амикацин – 1 г/сутки, таваник – 1 г/сутки. 10.08.2012 г. была начата стимуляция гемопоэза (граноцит – 33,6 млн Ед).

10.08.2012 г. выполнены посевы крови (направлены в коммерческую лабораторию г.Санкт-Петербург, т.к. собственной бактериологической лаборатории в стационаре нет).

11.08.2012 г. у пациентки появились боли в левой руке, отек мягких тканей. При триплексном сканировании притоков ВПВ выявили неокклюзирующий тромбоз левой подкожной вены, окклюзирующий тромбоз левой подмышечной вены (в связи с критической тромбоцитопенией антикоагулянтная терапия была ранее отменена).

13.08.2012 г. впервые появился редкий кашель, с мокротой серого цвета с примесью прожилков крови. Отмечали снижение сатурации O_2 до 93-94% (на воздухе). При аускультации: дыхание ослаблено в нижних отделах с обеих сторон, больше слева, хрипов нет. Из-за тяжести состояния выполнить компьютерную томографию легких не представлялось возможным (требовалась транспортировка в другой корпус больницы).

16.08.2012 г., несмотря на перенесенный токсический гепатит, ввиду отсутствия меропенема, доза сульперацефа была увеличена до 8 г/сутки. С учетом обширного поражения кожного покрова, длительного пребывания в

стационаре, вероятным сепсисом, 16.08.2012 г. к терапии добавлен кубидин – 320 мг/сутки. На следующие сутки наблюдали тенденцию к снижению температуры тела до субферильных цифр, однако сохранялась выраженная слабость, гиперемия кожи, десквамация эпителия на коже спины, грудной клетки, бедер, ягодиц, промежности. Аускультативно над легочными полями прежняя картина – ослабление дыхания в нижних отделах легких, хрипов нет. Трофических изменений кожи в области нижней трети правой голени нет.

17.08.2012 г. был удален центральный венозный катетер. 18.08.12 г., в связи с необходимым сосудистым доступом, выполнена катетеризация единственно проходимой вены – правой яремной.

20.08.2012 г. появились эпизоды затрудненного дыхания (SaO_2 – 90%-89-86%). При аускультации легких – разнокалиберные множественные хрипы в нижних отделах. 21.08.2012 г. сульперацел был заменен на меропенем – 3 г/сутки. Результат теста ПЦР исследования на цитомегаловирусную инфекцию от 20.08.12 – отрицательный.

22.08.2012 г. в области латеральной поверхности грудной клетки, поясничной области, области ягодиц, спины на пораженных участках кожи появились налеты грязно-серого цвета, выступающие над поверхностью, с бархатистомучнистым налетом. Планируемую биопсию кожи в связи с тяжелым состоянием пациентки выполнить не удалось.

По результатам посева крови из коммерческой лаборатории г. Санкт-Петербург диагностировали бактериальный сепсис. 22.08.12 г. повторно взята кровь для культурального исследования. Также выполнен забор крови для проведения теста на галактоманнан. Оба образца отправлены в НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина (г. Санкт-Петербург).

23.08.2012 г. состояние пациентки стало ухудшаться – появилось затрудненное дыхание, множественные хрипы над всей поверхностью легких, ЧДД – 30 в минуту (SpO_2 – до 83%), ЧСС – 90 в минуту. В связи с клиникой нарастающей дыхательной недостаточности больная переведена в отделение реанимации.

23.08.2012 г. выполнена рентгенограмма: признаки выраженного венозного застоя, с развивающимся интерстициальным отеком? с развитием септических «шоковых» легких? левосторонний значительный гидроторакс, гиповентиляция левого легкого, компрессионная, увеличение тени средостения и сердца. Достоверно судить о состоянии легочной ткани и наличии инфильтративных изменений сложно (качество снимка) (Рис. 1).



Рис. 1. Пациентка М. 57 лет, рентгенограмма от 23.08.2012 г.

В течение суток пребывания в отделении реанимации показатели гемодинамики стабильные (АД – 110/70 мм рт.ст.), пациентка находилась на постоянной ингаляции кислорода (SpO_2 –98-99%).

На данный период сохранялась, несмотря на стимуляцию, аплазия гемопоэза: Нв. – 76 г/л, эр. – $2,59 \cdot 10^9$ /л, тр. – $9 \cdot 10^9$ /л, л. – $0,4 \cdot 10^9$ /л (с. – 1%, лимф. – 36%, мон. – 3%), СОЭ – 63 мм/час. В биохимическом анализе крови: креатинин – 72,1 мкмоль/л, АЛАТ – 26 Е/л, АСАТ – 24,7 Е/л, билирубин – 33 ммоль/л. По данным ультразвукового исследования плевральных полостей: справа около 200 мл жидкости, слева – 400-450 мл. В динамике наблюдали нарастание жидкости в плевральных полостях, в связи с чем была выполнена плевральная пункция: справа эвакуировано 600 мл светло-желтого экссудата, слева – 1200 мл. На рентгенограмме в динамике – нарастание интерстициального отека, гидроторакса слева, появление признаков гидроторакса справа, гиповентиляция левого легкого.

24.08.12 г. получен результат теста на галактоманнан из сыворотки крови – 3,29 единиц оптической плотности (норма – менее 0,5), в связи с чем начата терапия вориконозолом – 400 мг x 2 раза в сутки.

На рентгенограмме после плевральной пункции отмечали уменьшение количества жидкости в плевральных полостях, выраженное сосудистое полнокровие, венозный застой 2-3 степени, явления «шоковых» легких, гиповентиляция базальных отделов легких.

25.08.2012 г. наблюдали нарастание явлений дыхательной недостаточности, эпизоды гипотонии до 70/40 мм рт.ст. и гипертензии – до 200/100 мм рт.ст., ЧСС – 74-80 в минуту, интубирована. На рентгенограмме: нарастание жидкости в плевральных полостях, «завуалированность» легочных полей, значительное усиление легочного рисунка, сгущение в прикорневых и базальных отделах, расширение корней легких.

25.08.2012 г. пациентка погибла, несмотря на проведение полного комплекса интенсивных мероприятий.

По результату посева крови от 22.08.2012 г. был получен *post mortem*, выявлен рост грибов рода *Fusarium*. Основной причиной смерти, вероятно, явилась полиорганная недостаточность, развившаяся в результате острого диссеминированного фузариоза и прогрессирования основного заболевания.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частота инвазивных грибковых инфекций растет повсеместно. Наряду с увеличением числа больных инвазивным аспергиллезом и мукоорозом [1, 3-5], мы наблюдаем увеличение числа пациентов, страдающих более редкими оппортунистическими микотическими инфекциями [1, 2].

Грибы рода *Fusarium* являются гиалогифомицетами и принадлежат к порядку *Hypocreales*, отделу *Ascomycota*. Они распространены повсеместно. Наиболее часто их обнаруживают в почве, на растениях. Являясь преимущественно возбудителями заболеваний растений и почвенными сапробами, они могут вызывать у человека широкий спектр патологических состояний, таких как инвазивные микозы и микотоксикозы, после приема в пищу продуктов, пораженных данными грибами [1, 6, 7].

Fusarium spp. могут проникать в макроорганизм не только через поврежденные кожные покровы (в результате травм или мацераций кожи в местах фиксации ЦВК), но и ингаляционным путем, вызывая поражение придаточных пазух носа и легких [1, 2, 8].

Основными факторами риска острого диссеминированного фузариоза являются: длительный агранулоцитоз, применение высоких доз глюкокортикостероидов, иммуносупрессивных препаратов, реакция трансплантат - против хозяина, глубокие ожоги. Из наблюдений следует, что распространение процесса и последующая диссеминация чаще развиваются у пациентов с гемабластомами на фоне миелосупрессивной химиотерапии и/или длительным агранулоцитозом [9, 10]. Проведенными ранее исследованиями показано, что наиболее часто фузариоз развивался у пациентов с острыми лейкозами – 56% больных, более 80% из них находились в состоянии агранулоцитоза [9]. У наблюдаемой нами пациентки острый диссеминированный фузариоз развивался также на фоне прогрессии основного заболевания, длительного агранулоцитоза. Использование стимуляторов гемопоэза было не эффективным.

У пациентов, перенесших трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, до 15% всех микотических осложнений вызывают *Fusarium* spp. [8]. Частота острого диссеминированного у реципиентов ауто-трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток составляла 1-2 пациента на 1000, алло – 20 на 1000 [9]. В то же время фузариоз реже встречается чем, например мукороз, у реципиентов трансплантатов солидных органов (<1-9%) [7].

Fusarium spp. могут поражать почти любой орган (Bushelman S.J., et al., 1995; Singh N., et al., 1995). Являясь ангиоинвазивными, они проникают в кровоток, повреждая стенку сосудов с последующим развитием тромбозов, локальных некрозов и диссеминацией [3].

Отметим, что клиника заболевания у иммунокомпрометированных пациентов сходна с таковой при других инвазивных микозах и зависит от локализации патологического процесса. При поражении придаточных пазух носа, наряду с общевоспалительной симптоматикой, у пациента наблюдают клинику синусита, при поражении легких – пневмонии, с дальнейшей диссеминацией процесса. Согласно данным из научной литературы, поражение легких развивается наиболее часто (39-40%), причем в популяции иммунокомпрометированных больных эта цифра возрастала до 95%. Реже в общей популяции наблюдали синуситы – 18%, до 95% – у иммунокомпрометированных больных [9]. У 41% больных общей популяции и у 70% иммунокомпрометированных больных при обследовании диагностировали острый диссеминированный фузариоз [9].

Одним из наиболее характерных симптомов острого диссеминированного фузариоза является поражение кожи – до 85% пациентов [9, 11, 12]. Дефекты кожи, как правило, представляют собой бо-

лезненные эритематозные папулы или подкожные узелки, с последующим формированием язвенного дефекта с очагом некроза в центре [12]. При этом элементы гриба можно обнаружить в материале из очагов поражения при прямой микроскопии, в посевах выделяют *Fusarium* spp. У наблюдаемой нами больной одним из проявлений острого диссеминированного фузариоза, наряду с признаками системного воспаления, были изменения на коже. Взятие биоптатов кожи не было выполнено из-за тяжести состояния больной.

Уточнить распространенность патологического процесса помогают инструментальные методы диагностики – компьютерная томография легких, придаточных пазух носа, органов брюшной полости в режиме высокого разрешения. Отметим, что рентгенологические признаки поражения органов, в частности легких, сходны с таковыми при аспергиллезе [1, 2]. Тяжесть состояния пациентки в наблюдаемом нами случае не позволила провести компьютерную томографию легких в режиме высокого разрешения.

Значимым фактором для диагностики острого диссеминированного фузариоза является обнаружение *Fusarium* spp. в крови [3]. При анализе научной литературы выявили, что *Fusarium* spp. был выделен при посеве крови у 40-60% больных [1, 11]. При поражении легких и придаточных пазух носа возможно выявление возбудителя в других биосубстратах (бронхоальвеолярном лаваже, промывных водах из придаточных пазух носа) [3]. У наблюдаемой нами больной при отсутствии эффекта от антибиотикотерапии препаратами широкого спектра действия были выполнены посева крови, в которых были выделены *Fusarium* spp.

Серологические методы диагностики фузариоза не разработаны. В то же время во многих публикациях авторы отмечают наличие перекрестных положительных реакций при исследовании крови на галактоманнан методом «Platelia *Aspergillus*». Так, в одном из проведенных анализов, 9 из 12 (75%) больных острым диссеминированным фузариозом имели положительный тест «Platelia *Aspergillus*» [13]. В описываемом нами случае, вероятнее всего, также имела место перекрестная положительная реакция при проведении теста «Platelia *Aspergillus*».

Другим методом диагностики является патоморфологическое исследование, но идентификация *Fusarium* spp. в данном случае затруднена т.к. гифы гриба по своему строению и ветвлению напоминают *Aspergillus* spp. [3]. В отличие от *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. могут образовывать конидии в тканях, что является одним из факторов, способствующих быстрому развитию фунгемии при данной патологии (Nelson P.E., et al., 1994; Liu K., et al., 1998).

В проанализированных публикациях культуральное исследование было положительным у 60% больных. Nucci и Anaissie выделили 12 видов *Fusarium*, являющихся патогенными. Наиболее частым возбудителем, вызывающим инфекции у людей, является

ся *Fusarium solani* (более 50% всех опубликованных случаев), реже – *Fusarium oxysporum* (20%), *Fusarium verticillioidis* и *Fusarium moniliforme* (10% each). Другими возбудителями фузариоза в проанализированных опубликованных случаях были *Fusarium dimerum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium chlamidosporum*, *Fusarium nygamai*, *Fusarium napiforme*, *Fusarium antophilum* и *Fusarium vasinfectum* [9]. Guarro J. и соавторы (2000) сообщали о случае фунгемии, вызванной *Fusarium sacchari*, у иммунокомпрометированного пациента.

Таким образом, основным критерием диагностики фузариоза является выявление *Fusarium* spp. при микологическом обследовании пациента в сочетании с наличием факторов риска, клинической симптоматикой, данными инструментального обследования.

Fusarium spp. устойчивы ко многим противогрибковым препаратам, поэтому развитие заболевания может происходить на фоне применения флуконазола, итраконазола в качестве первичной антимикотической профилактики. По данным из научной литературы, флуконазол, итраконазол, флуцитозин, а также кетоконазол, миконазол, тербинафин и эхинокандины не активны в отношении *Fusarium* spp. [14-17]. Новые триазольные антимикотики (вориконазол, позаконазол и равуконазол) обладают разной степенью активности в отношении *Fusarium* spp. [15]. Препаратом выбора для лечения фузариоза в настоящее время считают вориконазол [18-20]. Амфотерицин В также активен против *Fusarium* spp. in vitro, поэтому его липидные формы применяют как альтернативный препарат у данной категории больных. Так, при использовании амфотерицина В у онкогематологических больных выживаемость была 32-21%, липидного комплекса амфотерицина В – 46%, вориконазола – 46-71%, позаконазола – 48-76% [9, 21, 22]. При рефрактерных случаях применяли комбинированную антимикотическую терапию, преимущественно амфотерицин В и каспофунгин, амфотерицин В и вориконазол [9, 21, 22]. Также одним из эффективных методов лечения считают удаление очага поражения при локализованных формах хирургическим путем. Антимикотическая терапия в наблюдаемом нами случае была начата вориконазолом в дозе 800 мг в сутки, что соответствует международным рекомендациям лечения фузариоза [1, 19, 21].

Прогноз заболевания у иммунокомпрометированных больных при фузариозе крайне не благоприятен и зависит от клинической формы и тяжести основного заболевания. Так, при локальных формах фузариоза выживаемость составляет до 67-74%, при поражении легких – 36-67%, при остром диссеминированном фузариозе – 25-0% [1, 9, 11]. При анализе публикаций выявили, что из 84 больных с гемабла-

столами выживаемость в первые 30 суток после постановки диагноза была 50%, на 90 день – 21% [9]. Если у пациента сохранялся агранулоцитоз, то выживаемость составляла 4%. В то же время, если у пациента на фоне агранулоцитоза продолжали ПХТ и/или лечение глюкокортикостероидами, то выживаемость была 0% [9]. Выживаемость больных, получавших высокие дозы стероидов, – 67%-30%. Среди реципиентов гемопоэтических стволовых клеток выживаемость в течение 90 дней после постановки диагноза была 13%, если у этих пациентов сохранялась нейтропения, то она составляла 4-0% [8, 21, 22].

В описываемом нами клиническом случае клинические проявления фузариоза появились на фоне агранулоцитоза. Несмотря на применение стимуляторов гемопоэза, восстановить уровень лейкоцитов после курса консолидации ремиссии не удалось. При подозрении на микотическую инфекцию было начато лечение вориконазолом. В результате микотического сепсиса и прогрессирования основного заболевания у больной развилась полиорганная недостаточность и пациентка погибла. В описываемом нами клиническом случае у пациентки с острым диссеминированным фузариозом, несмотря на проводимую терапию, наблюдали признаки прогрессирования основного заболевания, что ухудшило прогноз. У больной развилась полиорганная недостаточность, что привело к летальному исходу.

ВЫВОДЫ

1. Фузариоз – тяжелая оппортунистическая инфекция, где основными факторами риска являются длительный агранулоцитоз, применение высоких доз глюкокортикостероидов, иммуносупрессивных препаратов, реакция трансплантат – против хозяина и глубокие ожоги.
2. Наиболее частый клинический вариант фузариоза у онкогематологических больных – поражение легких с дальнейшей диссеминацией; одним из характерных клинических симптомов является поражение кожи и подкожной клетчатки (до 85%).
3. Основной метод диагностики острого диссеминированного фузариоза – многократные посевы крови, что позволяет выделить возбудителя у 40-60% больных.
4. Наиболее распространенным возбудителем фузариоза, вызывающим инфекции у людей, является *Fusarium solani* (50%).
5. Препарат выбора для лечения фузариоза – вориконазол.
6. Общая выживаемость при фузариозе – 25-74%, при остром диссеминированном фузариозе у иммунокомпрометированных больных – 25-4%.

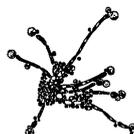
ЛИТЕРАТУРА

1. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. – М.: Ви Жи Групп, 2008. – 336 с.
2. De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P., et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy

- and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group // *CID*. – 2008. – Vol. 46. – P. 1813-1821.
3. *Хостелиди С.Н.* Главное о зигомикозе // *Проблемы медицинской микологии*. – 2006. – Т. 8, №4. – С. 8-18.
 4. *Cornely O.A.* Aspergillus to zygomycetes: causes, risk factors, prevention, and treatment of invasive fungal infections // *Infection*. – 2008. – Vol. 36. – P. 296-313.
 5. *Борзова Ю.В., Десятник Е.А., Хостелиди С.Н., Попова М.О., Чернопятова Р.М., Богомолова Т.С., Игнатьева С.М., Шурпицкая О.А., Колбин А.С., Зюзгин И.С., Зубаровская Н.И., Климович А.В., Васильева Н.В., Клишко Н.Н.* Хронический инвазивный аспергиллез легких у больных в Санкт-Петербурге // *Проблемы медицинской микологии*. – 2009. – Т.11, №3. – С. 20-25.
 6. *Аравийский Р.А., Клишко Н.Н., Васильева Н.В.* Диагностика микозов. – СПб.: СПбМАПО, 2004 – 185 с.
 7. *Garbino J, Uckay I, Rhoner P, et al.* Fusarium peritonitis concomitant to kidney transplantation successfully managed with voriconazole: case report and review of the literature // *Transpl. Int.* – 2005. – Vol. 18. – P. 613-618
 8. *Попова М.О., Зюзгин И.С., Хостелиди С.Н. и др.* Этиология инвазивных микозов у пациентов с гемобластозами после высокодозной противоопухолевой химиотерапии // *Проблемы медицинской микологии*. – 2011. – Т. 13, №2. – С. 78.
 9. *Nucci M, Anaissie E.* Fusarium infections in immunocompromised patients // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2007. – Vol. 20. – P. 695-704.
 10. *Dignani M.C., Anaissie E.* Human fusariosis // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2004. – Vol. 10. – P. 67-75.
 11. *Jossi M., Ambrosioni J., Macedo-Vinas M., Garbino J.* Invasive fusariosis with prolonged fungemia in a patient with acute lymphoblastic leukemia: case report and review of the literature // *Int. J. of Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 14, Issue 4. – P. e354-e356.
 12. *Perez-Perez L., Pereira M. Jr, Sanchez-Aguilar D. and Ulcerous J.* Lesions disclosing cutaneous infection with *Fusarium solani* // *Acta Derm. Venereol.* – 2007. – Vol. 87. – P. 422-424.
 13. *Tortorano A.M., Esposto M.C., Prigitano A., et al.* Cross-Reactivity of *Fusarium* spp. in the Aspergillus Galactomannan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol. 50, №3. – P. 1051-1053.
 14. *Katyar S.K., Edlind T.D.* Role for Fks1 in the intrinsic echinocandin resistance of *Fusarium solani* as evidenced by hybrid expression in yeast // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53. – P. 1772-1778.
 15. *Sutton D.A.* Laboratory evaluation of new antifungal agents against rare and refractory mycoses // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2002. – Vol. 15. – P. 575-582.
 16. *Consigny S., Dhedin N., Datry A., et al.* Successful voriconazole treatment of disseminated *Fusarium* infection in an immunocompromised patient // *Clin. Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 37. – P. 311-313.
 17. *Васильева Н.В., Клишко Н.Н., Цинзерлинг В.А.* Диагностика и лечение инвазивных микозов: современные рекомендации // *Вестник СПб МАПО*. – 2010. – Т.2, №4. – С. 5-18.
 18. *Perfect J.R., Marr K.A., Walsh T.J., et al.* Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections // *Clin. Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 36. – P. 1122-1131.
 19. *Segal B.H., Herbrecht R., Stevens D.A., et al.* Defining Responses to Therapy and Study Outcomes in Clinical Trials of Invasive Fungal Diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer Consensus Criteria // *CID*. – 2008. – Vol. 47. – P. 674-683.
 20. *Hoeningl M., Zollner-Schwetz I., Sill H., et al.* Epidemiology of invasive fungal infections and rationale for antifungal therapy in patients with haematological malignancies // *Mycoses*. – 2010. – Article published online. – DOI: 10.1111/j.1439-0507.2010.01881.x
 21. *Nucci M., Anaissie E.J., Queiroz-Telles F., et al.* Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection // *Cancer*. – 2003. – Vol. 98. – P.315-319.
 22. *Nucci M., Marr K.A., Queiroz-Telles F., et al.* *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients // *Clin. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 38. – P.1237-1242.

Поступила в редакцию журнала 13.11.2012

Рецензент: Ю.В. Борзова



УДК 616-08:616.594.171:618.161:616.594.171.2:621.315.614.5:
616.379-008.64

СЛУЧАЙ УСПЕШНОГО ЛЕЧЕНИЯ ИНФИЛЬТРАТИВНО- НАГНОИТЕЛЬНОЙ ТРИХОФИТИИ ОБЛАСТИ ЛОБКА В СОЧЕТАНИИ С КАНДИДОЗОМ КОЖИ И СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК У ПАЦИЕНТКИ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ I ТИПА

**Иванова Ю.А. (ассистент кафедры)*,
Евтропова Я.А. (дерматовенеролог)**

ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский
университет Росздрава; КГБУЗ ККВД, г. Барнаул,
Россия

© Коллектив авторов, 2012

*Описан случай инфильтративно-нагноительного поражения
кожи, вызванного Trichophyton spp. и Candida parapsilosis в атипичной
локализации. Приведены факторы риска, особенности
клинической картины, течения заболевания и лечения пациентки
с данной патологией.*

Ключевые слова: дерматомикозы, кандидоз, микоз лобковой
области, трихофития инфильтративно-нагноительная

CASE OF SUCCESSFUL TREATMENT OF INFILTRATIVE - PURULENT TRICHOPHYTIA OF PUBIC AREA IN COMBINATION WITH CANDIDOSIS OF SKIN AND MUCOUS MEMBRANES OF PATIENT WITH DIABETES TYPE I

**Ivanova Yu.A. (assistant lecture of the chair),
Evtropova Ya.A. (dermatovenereologist)**

SBEI HPE Altai State Medical University; RSBIH Regional
Skin and Venereal Diseases Dispensary, Barnaul, Russia

© Collective of authors, 2012

*Case of infiltrative-purulent skin injury caused by Trichophyton
spp. and Candida parapsilosis in atypical localization have been*

* Контактное лицо: Иванова Юлия Александровна,
Тел.: (3852)62-40-11

*describes in this article. Risk factors, features of clinical picture, course
of the disease and treatment of a patient with this pathology are given.*

Key words: candidosis, dermatomycosis, infiltrative-purulent
trichophytia, mycosis of pubic area

ВВЕДЕНИЕ

Трихофития – микоз, вызываемый различными видами грибов-трихофитонов. Проявления заболевания бывают различными, что может зависеть от многих причин, в частности, от особенностей возбудителя микоза, места внедрения гриба, состояния организма человека, продолжительности болезни. Условия передачи трихофитии также бывают неодинаковыми. Различают: 1) трихофитию, вызываемую паразитами человека (эти виды трихофитона не поражают животных и вызывают у человека поверхностную и хроническую трихофитию); 2) трихофитию, обусловленную грибами, паразитирующими на некоторых домашних животных, грызунах, которые также могут вызывать заболевание и у человека в виде инфильтративно-нагноительной формы [1]. Характерной особенностью трихомикозов и трихофитии, в частности, является постепенное изменение микробиоты с изменением соотношения доли зоофильных и антропофильных возбудителей. Если раньше наиболее частыми возбудителями были антропофильные грибы, то сейчас на их долю приходится чуть более одного процента. В то же время отмечают рост сочетанных грибковых поражений кожи и слизистых оболочек, вызванных разными видами грибов. Чаще встречаются больные трихофитией с атипичной локализацией очагов, например, в области лобка, половых органов, ягодиц [2].

Приводим наше клиническое наблюдение пациентки с инфильтративно-нагноительной трихофитией лобковой области в сочетании с кандидозом кожи и слизистых оболочек и сопутствующим сахарным диабетом I типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациентка К., 19 лет поступила в отделение ККВД 10.11.2011 г.

Жалобы при поступлении на высыпание на коже лобка и гениталий, чувство жжения и болезненности в области лобка, усиливающиеся при ходьбе, а также на «творожистые» выделения из влагалища, зуд в области наружных половых органов, общую слабость, быструю утомляемость, сухость во рту.

Анамнез заболевания: больна в течение двух месяцев, когда впервые в лобковой области появилось уплотнение, которое увеличивалось в размерах, с болезненными проявлениями, покраснением, локальным повышением температуры кожных покровов в очаге. Выделение из влагалища и зуд наружных половых органов стали беспокоить около трех недель назад. Самостоятельно не лечилась. Пациентка в течение двух месяцев наблюдалась амбулаторно у хирурга и дерматолога. Было проведено хирургическое вскрытие очага инфекции с последующей антибактериальной

терапии. После чего лечение продолжила у дерматолога по месту жительства с диагнозом «посттравматическая экзема лобковой области». В амбулаторных условиях получила десенсибилизирующую терапию, затем преднизолон внутривенно – 30 мг №3, местно – антибактериальные и глюкокортикостероидные мази. Эффекта от проводимого лечения не было, в связи с чем больная была направлена в краевой кожно-венерологический диспансер.

Анамнез жизни: страдает сахарным диабетом 1 типа в течение 10 лет, ежедневно получает инъекции инсулина короткого действия – 42 ЕД, длительного действия – 14 ЕД. Эффективного контроля сахарного диабета не было. Уровень гликемии – 9-13 ммоль/л в течение суток.

Общий статус: состояние удовлетворительное. Температура тела – 37,7 °С. Тоны сердца ясные, ритмичные, АД – 120/80 мм рт. ст. Дыхание везикулярное, хрипов нет. Живот при пальпации мягкий, безболезненный. Мочеиспускание учащенное, безболезненное. Периферические лимфатические узлы не увеличены.

Специальный статус: кожа вне высыпаний физиологической окраски, сухость всех кожных покровов с участками гиперкератоза в области локтей. Кожный процесс носит ограниченный характер и захватывает всю лобковую область с переходом на верхнюю треть больших половых губ. Очаг с размытыми границами, кожа в очаге багрово-синюшного цвета, блестящая, горячая на ощупь, равномерно сплошь инфильтрирована. В очаге множественные пустулезные элементы, эрозии с серозно-гнойным и серозным отделяемым, желтоватыми гнойными и геморрагическими корочками, чешуйками. Волосы в центре очага почти полностью отсутствуют, по периферии сохраняются и частично обломлены на высоте 1-3 мм над уровнем кожи, при ручной эпиляции легко удаляются. Верхняя треть больших половых губ гиперемирована, с багровым оттенком, отечна, с серозно-гнойными корочками. Слева, чуть выше основного очага, в паховой области виден отсев округлой формы, диаметром около 4 см, с четкими границами, по периферии окруженный красным венчиком с папулезно-везикулезными элементами, мелкими чешуйками. Ногтевые пластинки кистей и стоп не изменены

Осмотр в зеркалах: слизистая вульвы и влагалища ярко гиперемирована, отечна, с обильными творожистыми, легко удаляемыми выделениями.

Лабораторные исследования

При поступлении в стационар:

Общий анализ крови: СОЭ – 12 мм в час, Нв. – 127 г/л, л. – 6,7·10⁹/л, п. – 2%, с. – 71%, лимф. – 22%, мон. – 5%.

Общий анализ мочи: цвет – желтый, реакция – кислая, удельный вес – 1016, белок – отр., сахар – 2,8, лейкоциты – 5-6 в поле зрения, эпителий – 4-5 в поле зрения, эритроциты – отр.

Биохимический анализ крови: билирубин общий – 10,7 мкмоль/л, билирубин прямой – 1,4 мкмоль/л, билирубин не прямой – 9,3 мкмоль/л, общий белок – 72 г/л, общий холестерин – 3,6 ммоль/л, креатинин – 53 мкмоль/л, глюкоза – 10,1 ммоль/л, АлаТ – 0,37 ммоль/л, ЩФ – 567 ммоль/л, АсаТ – 0,35 ммоль/л, СРБ – отр., ИФА – сум., Lues – отр.

Микроскопическое исследование мазка из влагалища: эпителий – 4-5 в поле зрения, лейкоциты – 4-6, выявили дрожжевые почкующиеся клетки, трихомонады и гонококки не обнаружены.

Микроскопическое исследование чешуек с лобковой области: в патологическом материале – массивное скопление септированного мицелия, дрожжевые клетки в скоплениях.

На основании данных анамнеза, общего и специального клинического осмотров, а также результатов микроскопического исследования выставлен предварительный диагноз: Инфильтративно-нагноительный микоз области лобка и наружных половых органов. Кандидозный вульвовагинит. Сахарный диабет 1 типа, декомпенсация.

Пациентке назначили системную противогрибковую терапию: гризеофульвин в суточной дозе 1,0 грамм (22 мг/кг), десенсибилизирующие средства и наружно – серно-дегтярную мазь и крем клотримазол, а также вагинальные таблетки клотримазол ежедневно на ночь в течение 10 дней. На фоне проводимого лечения больная отмечала слабую положительную динамику.

Результаты культурального исследования мазка из влагалища на 4 сутки от 14.11.2011 г.: в патологическом материале рост колоний дрожжевых грибов, во всех точках – рост *Candida parapsilosis*.

Результаты культурального исследования чешуек с кожи лобка на 9 сутки: рост грибов *Trichophyton* spp. – в 3 точках, *C. parapsilosis* – в 9 точках.

На основании наличия факторов риска (сахарный диабет), клинической картины и данных лабораторного исследования выставлен окончательный диагноз: Инфильтративно-нагноительная трихофития области лобка и наружных половых органов. Кандидоз кожи лобка. Вульвовагинальный кандидоз. Сахарный диабет 1 типа, стадия декомпенсации.

После получения результатов микологического исследования к лечению был добавлен флуконазол в суточной дозе 150 мг в течение 15 дней, наружно – нистатиновая мазь два раза в сутки.

На фоне проводимого лечения состояние больной значительно улучшилось, высыпания на коже регрессировали, проявления кандидоза слизистых оболочек купированы.

Пациентка выписана из стационара с клиническим улучшением, рекомендовано последующее наблюдение у дерматолога в амбулаторных условиях. Общий курс системной противогрибковой терапии составил 2 месяца.

ОБСУЖДЕНИЕ

Причинами инфильтративно-нагноительных процессов на коже, вызванных грибами, как правило, являются дерматомицеты, которые приводят к развитию резких, острых воспалительных явлений с наличием инфильтрата, залегающего в глубоких слоях кожи, формированием фолликулярных абсцессов с исходом в размягчение очагов и нагноение. Однако подобные поражения могут быть вызваны и стафилококками, вирусами и дрожжами, что создает значительные трудности в дифференциальной диагностике, так как клинические проявления, обусловленные пиококками и грибами, могут быть весьма сходными.

Candida spp. могут образовывать ассоциации с другими грибами и бактериями, что приводит к фор-

мированию аллергических и парааллергических реакций [3]. При этом уточнение этиологического фактора при поражении типа керииона имеет прямое отношение к рациональному лечению и эпидемиологическим мероприятиям. Нагноительная трихофития, вызванная смешанной микобиотой (трихофитоны, *Candida*), отличается более длительным течением с частыми рецидивами, по сравнению с истинным трихофитийным кериионом и вторичными аллергическими реакциями. Это требует дополнительной терапии – назначения антимикотиков, десенсибилизирующих средств [1, 2, 4].

Кандидоз, как правило, является спутником заболеваний и состояний, которые создают эндогенный фон для биологической активации грибов, перехода их из сапробного в патогенное состояние. Длительное время основным возбудителем кандидоза считали *C. albicans*. Хорошо усваивая сахара, *Candida* spp. предпочитают ткани, богатые глюкозой и содержащими ее соединениями, именно поэтому кандидозы часто развиваются у больных с сахарным диабетом. Возникающие при диабете гормональные сдвиги (и, как следствие, гипергликемия, глюкозурия, в тяжелых случаях – кето- или лактатацидоз), влекут серьезные отклонения обменных процессов в тканях, развитие микроангиопатий, трофических расстройств, ослабление иммунной резистентности кожи, слизистых оболочек и организма в целом, что приводит к активации условно-патогенных грибов, раннему появлению симптомов микоза и его аллергическим осложнениям.

Кроме типичных случаев заражения трихофитией, в научной литературе описаны случаи полового пути передачи. На кафедре дерматовенерологии института последипломной подготовки медицинских кадров (Душанбе, Таджикистан) в 2009 г. изучали особенности распространения и клиники зооантропонозных вариантов трихофитии и микроспории с атипичной локализацией. Согласно исследованиям, у 30% больных выявили изолированное поражение лобковой области, у 70% – кожи лобковой области и окружающих поверхностей, из них у 80% наблюдали половой путь передачи зооантропонозных трихомикозов [5]. Изменился возрастной состав больных. По данным исследователей из Узбекистана, в конце

девяностых годов прошлого столетия 86% больных трихофитией составляли дети дошкольного и младшего школьного возрастов, в последние годы пациентами являются лица старше 15 лет – 61% [6]. Учащению микотической инфекции способствуют увеличение в популяции лиц с иммунодефицитными состояниями, эндокринопатиями, злокачественными новообразованиями, нерациональное использование антибиотиков, кортикостероидных гормонов, цитостатиков [7, 8].

Данный клинический случай может быть полезен для практикующих врачей в силу определенных эпидемических, этиологических и клинических особенностей: атипичная локализация заболевания, связанная с половым путем передачи инфекции, тяжелое течение микотического процесса, обусловленное разными видами возбудителей и сопутствующим неконтролируемым сахарным диабетом. У пациентки наблюдали клинические признаки, характерные как для инфильтративно-нагноительной трихофитии (округлые очаги, горячие на ощупь, болезненный плотный инфильтрат синюшно-багрового цвета, с папуло-пустулами с мелкими отверстиями, из которых при сдавлении выделялись капли гноя, отсутствие волос в центре очага, обломленные волосы по периферии на высоте 1-3 мм над уровнем кожи, легко удаляемые при ручной эпиляции), так и для кандидоза кожи (менее четкие размытые границы высыпаний, эритематозные очаги с блестящей поверхностью и эрозиями вишнево-красного цвета с серозным экссудатом, везикулезные элементы).

Обращает внимание непосредственная близость высыпаний на коже и слизистых оболочках наружных половых органов, пораженных *Candida* spp. При микроскопическом исследовании дерматомицеты не были обнаружены, что возможно при инфильтративно-нагноительных формах заболевания. При получении результатов культуральной диагностики (*Trichophyton* spp. и *C. parapsilosis*) верифицировали диагноз. Обнаружение двух возбудителей при культуральном исследовании соотносилось с тяжестью и длительностью течения микоза и потребовало иных подходов к терапии по сравнению с истинным трихофитийным кериионом.

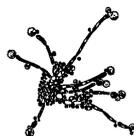
ЛИТЕРАТУРА

1. Шебашова Н.В., Мишина Ю.В., Никифорова Е.В. Современные подходы к диагностике и терапии кандидозных поражений кожи и ногтей // Ж. Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. – 2009. – №3. – С. 49-51.
2. Касымов О.И., Амакджанов М.Р., Таджибаев У.А. Атипичные варианты зооантропонозных форм трихофитии и микроспории // Ж. Проблемы медицинской микологии. – 2010. – Т. 12, №2. – С. 96.
3. Кулага В.В., Романенко И.М., Афонин С.Л., Кулага С.М. Грибковые болезни и их осложнения. – М., 2010. – С. 173-189; 217-231.
4. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. – М., 2007. – С. 90-109.
5. Шебашова Н.В., Клеменова И.А., Мишина Ю.В. Разнообразие видового состава грибов рода *Candida* при онихомикозах и дрожжевых поражениях кожи // Ж. Успехи медицинской микологии. – 2007. – Т. 10. – С. 3-34.
6. Абидова З.М., Нурматов У.Б. Клиническое течение и методы лечения зооантропонозной трихофитии у взрослых с локализацией поражения в лобковой области // Ж. Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11, №2. – С. 31-35.

7. Pfaller M.A., Diekema D J. Rare and emerging opportunistic fungal. Pathogens: Concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. doi: 10.1128/JCM.42.10.4419-4431.2004// J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42, №10. – P. 4419-4431.
8. Janaki C., Sentamilselvi G., Murugusundram M. Trichomycoses//Int. J. Trichology. – 2009. – Vol. 1, №2. – P. 100-107.

Поступила в редакцию журнала 3.12.12

Рецензент: В.Г. Корнишева



КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА, ОСЛОЖНЕННОГО МИКОЗАМИ КОЖИ

¹Гурбанова М.Г. (аспирант)*,
²Гулордава М.Д. (врач-
дерматовенеролог), ²Чилина Г.А. (зав.
лабораторией), ¹Котрехова Л.П. (доцент
кафедры), ¹Разнатовский К.И. (зав.
кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: ¹кафедра дерматовенерологии, ²НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2012

В статье приведены результаты исследования влияния микозов кожи на течение атопического дерматита (АД). Обследовано 97 больных АД. Установлены статистически значимые различия в тяжести течения АД в группах у больных АД с микозами кожи (МК) и у больных АД без МК.

Ключевые слова: атопический дерматит, микозы кожи, шкала SCORAD

CLINICAL PECULIARITIES OF ATOPIC DERMATITIS COMPLICATED BY SKIN MYCOSES

¹Gurbanova M.G. (postgraduate student),
²Gulordava M.D. (dermatovenerologist),
²Chilina G.A. (head of laboratory),
¹Kotrekhoval P. (associate professor of the
chair), ¹Raznatovskij K.I. (head of the chair)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹Chair of Dermatology and Venereology; ²Kashkin Research Institute of Medical Mycology, St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2012

Results of research of fungal infections influence on the course of atopic dermatitis (AD) have been presented in this article. Examined 97 patients with AD. Established statistically significant differences of severity of AD in groups of patients AD with skin mycoses and the patients AD without skin mycoses.

Key words: atopic dermatitis, SCORAD score, skin mycoses

* Контактное лицо: Гурбанова Махри Гуртбаевна
Тел.: 8-921-393-57-52

Атопический дерматит (АД) – одно из наиболее часто регистрируемых заболеваний кожи в практике врача-дерматолога. Патогенетическую основу клинических проявлений атопического дерматита составляет хроническое иммуноопосредованное воспаление кожи, обусловленное развитием сенсибилизации различными аллергенами. Патогенез АД и характер морфологических изменений кожного покрова при АД способствуют колонизации на коже бактериальной и грибковой микробиоты, что приводит к развитию инфекционных осложнений. В то же время, как бактерии, так и грибы могут выступать в роли триггеров, вызывать обострение АД, обуславливать тяжелое рецидивирующее течение АД [1,2]. В лечении АД нередко используют иммуносупрессивные препараты, способствующие развитию МК. Часто эта инфекция длительное время остается нераспознанной, так как приобретает нехарактерные для нее клинические проявления [3,4]. Ряд исследователей указывают, что присоединение МК при АД может не только осложнять клиническое течение АД, но также вызывать и поддерживать аллергическое воспаление кожи по IgE-зависимому типу аллергических реакций. Более всего в настоящее время изучена роль дрожжевых грибов родов *Candida* и *Malassezia* [5] в патогенезе АД, в меньшей степени – роль дерматомицетов. Однако информация о грибах при АД разрознена и порой носит противоречивый характер.

Цель нашей работы – изучить влияние микотической инфекции на характер течения атопического дерматита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол исследования был утвержден на заседании локального этического комитета ГБОУ СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Обязательным условием включения в исследование было подписание пациентом информированного согласия. Критерии включения: возраст от 18 лет и старше, диагноз атопического дерматита с давностью установления не менее 6 месяцев; критерии исключения: возраст младше 18 лет, беременность, лактация, алкогольная и наркотическая зависимости. В исследование включили 97 больных АД: 60 женщин (61,9% от числа всех обследованных лиц) в возрасте от 18 до 61 года (медиана – 28 лет) и 37 мужчин (38,1%) в возрасте от 18 до 54 лет (медиана – 26 лет).

Всем пациентам было проведено микологическое исследование кожных чешуек, ногтей, длинных и пушковых волос с целью выявления МИ. Для обнаружения *Malassezia* spp. кожные чешуйки забирали с кожи волосистой части головы, лица, шеи, передней грудной клетки, межлопаточной области [6]. Для выявления грибов *Candida* spp. и подтверждения диагноза кандидоза кожи забор проводили с очагов поражения кожи, типичных для кандидозной инфекции: участков опрелости в складках кожи, участков мацерации эпидермиса, паронихий, онихий с прок-

симальным и дистально-латеральным поражением. У больных с подозрением на дерматомикотическое поражение кожи забор патологического материала (ногтей, волос, кожных чешуек) выполняли с очагов поражения, характерных для микозов кожи и ее придатков. Далее проводили прямую микроскопию патологического материала с КОН. Видовую идентификацию возбудителей осуществляли с помощью культурального исследования [7].

Степень тяжести АД оценивали по индексу SCORAD (Severity Scoring of Atopic Dermatitis), который определяли по общепринятой методике, а также по интенсивности и распространенности кожных высыпаний, частоте обострений в течение года [8].

Для решения поставленных задач по результатам микологического исследования были сформированы две группы. Группу исследования составили 60 больных АД, у которых были выявлены возбудители микозов кожи и ее придатков. В группу сравнения вошли 37 больных АД, у которых грибы не обнаружили.

Полученные данные проанализировали с помощью программы STATISTICA for Windows (версия 6.0) с использованием методов и критериев непараметрической статистики (критерий Манна-Уитни, критерий Вальда-Вольфовица). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микозы кожи и ее придатков отмечали у 60 (61,9%) из 97 больных АД в возрасте от 18 до 68 лет (медиана 28 лет): у 27 (45%) мужчин и 33 (55%) женщин. Эти пациенты составили группу исследования. Микозы кожи не были диагностированы у 37 (38,1%) человек из 97 обследованных больных АД в возрасте от 20 до 70 лет (медиана 27 лет): у 11 мужчин (27%) и у 26 женщин (66,7%). Эти больные вошли в группу сравнения. Исследуемые группы не отличались по возрасту и полу ($p > 0,05$).

Диагноз микоза кожи был подтвержден результатами микроскопического исследования патологического материала у 60 больных АД. Идентифицировать грибы до рода и вида с помощью посева удалось у 39 пациентов, что составило 65% от числа всех больных АД с микозами кожи. Отметим, что в большинстве случаев были выделены *Malassezia* spp. – у 23 человек (59%). *Candida albicans* идентифицировали в 7 случаях (18%), *Trichophyton rubrum* – в 3 (8%), *Rhodotorula mucilaginosa* – в 6 (15%) (Рис. 1).

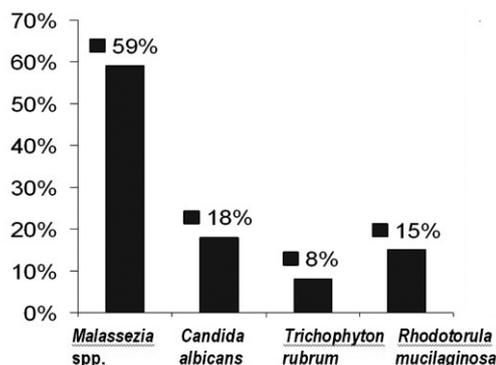


Рис. 1. Идентификация грибов до рода у больных атопическим дерматитом, осложненным микозами кожи (n=60)

Для АД, осложнённого МК, было характерно более тяжёлое течение (табл. 1), большая площадь поражения кожи (табл. 2), сильнее сухость кожных покровов; более выражены такие клинические проявления заболевания, как лихенификация, эскориации, эритема, нарушения сна.

Таблица 1.

Сравнение исследованных групп по клиническим признакам

Клинические признаки АД (оценка в баллах)	АД с дерматомикозом (n=60), (M±m)	АД без дерматомикоза (n=37), (M±m)	Достоверность
Сухость кожи	2,4±0,55	2,1±0,35	p=0,01
Лихенификация	2,1±0,46	1,6±0,55	p=0,0002
Эскориации	2,0±0,57	1,7±0,52	p=0,005
Эритема	2,0±0,43	1,7±0,52	p=0,01
Нарушения сна	6,2±1,63	5,3±1,56	p=0,015

Различие средних величин считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

При оценке степени тяжести течения АД по шкале SCORAD в группах больных оказалось, что при АД, осложнённом МК, процесс протекал тяжелее, чем без МК. У пациентов с АД и наличием МК оценка в баллах по шкале варьировала от 27,8 до 92 (медиана – 57,1), интерквартильный размах между 25-м и 75-м процентилями составил 50,7-74,6 соответственно. У больных АД без МК баллы по шкале SCORAD (табл. 2) были от 34,1 до 85,8 (медиана – 54,7), интерквартильный размах – 41,6-66,6. Больные со средней степенью тяжести АД с МК составили 25% (15 человек), с тяжелым течением – 75% (45 человек), со средней степенью тяжести при АД без МК – 43,2%, с тяжелым течением – 56,8%.

Таблица 2.

Сравнение исследованных групп по SCORAD и площади поражения

Показатели	Больные АД, (n=97)				Достоверность
	АД с дерматомикозом, (n=60)		АД без дерматомикоза, (n=37)		
	медиана	25-75% квантили	медиана	25-75% квантили	
SCORAD (%)	57,1	50,1-74,6	54,7	41,6-66,6	p=0,034
Площадь поражения (%)	31,0	14,5-78,3	24,0	8,0-63,0	p=0,01

Различие средних величин считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

В международном согласительном документе по атопическому дерматиту (США, 2002) эксперты отмечают, что это, как правило, наследственное заболевание, часто ассоциированное с астмой, пищевой аллергией, аллергическим ринитом и рецидивирующими кожными инфекциями. Инфекция может существенно изменить течение заболевания [9].

Это обусловлено тем фактом, что вирусы, бактерии и грибки могут быть триггерами атопического дерматита и приводить к его обострению. С другой стороны, дефицит керамидов, в результате выраженного снижения уровня сфингомиелина, способствует сухости кожи и более легкому проникновению инфекционных агентов и аллергенов в поврежденный эпидермис, а это, в свою очередь, поддерживает воспалительный процесс в коже. В научной литературе описаны наблюдения, свидетельствующие о роли бактериальных и грибковых колонизаций в формировании резистентного к лечению и более тяжелого рецидивирующего течения АД [10]. Это было подтверждено и нашими исследованиями. У больных АД с МК процесс протекал тяжелее, чаще рецидивировал, сухость кожи была значительно сильнее, чем у больных АД без МК.

Также у больных АД, осложненным МК, были выявлены статистически значимые изменения в степени тяжести течения процесса при оценке состояния

больных по шкале SCORAD, что также не противоречит данным литературы [11, 12].

Таким образом, чем тяжелее течение АД, больше площадь поражения и длительность заболевания, тем чаще имеет место грибковая колонизация кожных покровов. Исходя из этого, можно предположить, что дрожжевые грибы и мицелиальные дерматомицеты утяжеляют кожный процесс при данной форме аллергии и способствуют развитию устойчивости АД к традиционной противоаллергической терапии. По результатам проведенного нами исследования можно сделать вывод о том, что у всех больных АД необходимо проводить микологические исследования, для расширения проводимого лечения и при необходимости включения в его состав топических или системных антимикотиков.

ВЫВОДЫ

1. Дерматомикозы и колонизацию дерматомицетами выявляли у 62% больных атопическим дерматитом.

2. Развитие дерматомикоза и колонизация *Candida* spp., *Malassezia* spp., *Trichophyton rubrum*, *Rhodotorula mucilaginosa* ассоциировано с тяжестью течения АД, распространённостью поражения и длительностью заболевания.

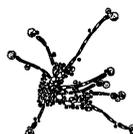
3. Больным АД показано микологическое исследование для оптимизации лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Leung D.Y.M. Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention // J. Allergy Clin. Immunol. – 2000. – Vol. 105, №5. – P. 860-876.
2. Феденко Е.С., Елисютина О.Г. Роль грибковой инфекции в развитии атопического дерматита и целесообразность противогрибковой терапии // Российский аллергол. журнал. – 2006. – №5. – С. 4-13.
3. Tateishi Y., Sato H., Akiyama M., et al. Severe generalized deep dermatophytosis due to *Trichophyton rubrum* (trichophytic granuloma) in a patient with atopic dermatitis // Arch. Dermatol. – 2004. – Vol. 140, №5. – P. 624-625.
4. Rallis E., Koumantaki-Mathioudaki E. Pimecrolimus induced tinea incognito masquerading as intertriginous psoriasis // Mycoses. – 2008. – Vol. 51, №1. – P. 71-73.
5. Sugita T. Genotype analysis of the rRNA gene of *Malassezia* colonizing the skin surface of patients with atopic dermatitis // Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi. – 2005. – Vol. 46, №3. – P. 147-50.
6. Пиотровская И.В., Котрехова А.П., Богданова Т.В., Васильева Н.В., Разнатовский К.И., Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Учеваткина А.Е. Клинико-лабораторные особенности и терапия фолликулита, обусловленного *Malassezia* spp. // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, №1. – С. 18-22.
7. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Разнатовский К.И. Дерматомикозы, или поверхностные микозы кожи и её придатков – волос и ногтей. Лабораторная диагностика // Проблемы медицинской микологии. – 2008. – Т. 10, №1. – С. 27-34.
8. Vakirlis E., Lazaridou E., Tzellos T.G., et al. Investigation of cytokine levels and their association with SCORAD index in adults with acute atopic dermatitis // J. of the European Academy of Dermatol. and Venereol. – 2010. – № 25. – P. 409-416.
9. Ellis C., Luger T., Abeck D., et al. Новые клинические данные и современные стратегии лечения атопического дерматита // Аллергология. – 2003. – №4. – P. 50-58.
10. Leung D. Infection in atopic dermatitis // Curr. Opin. Pediatr. – 2003. – №15. – P. 399-404.
11. Ong P.Y., Leung D.Y.M. The Infectious Aspects of Atopic Dermatitis // Immunol. Allergy Clin. North Am. – 2010. – Vol. 30, №3 – P. 309-321.
12. Maintz L., Novak N. Modifications of the Innate Immune System in Atopic Dermatitis // J. Innate. Immun. – 2011. – №3. – P. 131-141.

Поступила в редакцию журнала 14.09.2012

Рецензент: М.А. Шевяков



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ *ASPERGILLUS* SPP. ИЗ РОССИЙСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Михайлова Ю.В. (н.с.), Чилина Г.А. (зав. лаб), Полищук А.Г. (зав. лаб)*

НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2012

В настоящее время в связи с открытием большого числа криптических видов *Aspergillus* для точной идентификации представителей этого рода требуется молекулярный анализ. Была проведена видовая идентификация 21 штамма *Aspergillus* с использованием секвенирования нуклеотидных последовательностей фрагмента гена β -тубулина. Совпадение результатов фенотипической и молекулярной идентификации составило 100% на уровне видового комплекса и 62% – на уровне вида. Причиной несоответствия результатов было обнаружение криптических видов *Aspergillus* с помощью ДНК секвенирования – в видовых комплексах *A. niger* и *A. versicolor* при молекулярном анализе выявили криптические виды *A. tubingensis* и *A. sydowii* соответственно. Таким образом, секвенирование последовательности фрагмента гена β -тубулина помогло не только идентифицировать *Aspergillus* spp. до вида, но и выявить криптические виды этого рода.

Ключевые слова: *Aspergillus* spp., β -тубулин, молекулярная идентификация, секвенирование ДНК

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *ASPERGILLUS* SPP. FROM RUSSIAN COLLECTION OF PATHOGENIC FUNGI

Mikhaylova Y.V. (scientific researcher), Chilina G.A. (head of the laboratory), Polischouk A.G. (head of the laboratory)

Kashkin Research Institute of Medical Mycology of North-Western State Medical University named after I.I.Mechnikov, St. Petersburg, Russia

* Контактное лицо: Полищук Анна Генриховна
Тел.: (812) 303-51-40

** Существует разночтение в написании слова «секвенирование» от англ. *sequence* [ˈsi:kwəns] и «секвенирование», из них первое правильное, второе – нет, но ряд исследователей в России и других странах предпочитают писать «секвенирование» (гл. редактор Н.П.Елинов)

Due to the discovery of a large number of sibling species of *Aspergillus*, molecular analysis is currently required to identify the members of this genus accurately. Twenty one strains of *Aspergillus* were identified to the species level by DNA sequence analysis of the β -tubulin gene fragment. The results of phenotypic and molecular identifications were concordant at the species complex level in 100 % of cases and at the species level in 62 % of cases. The reason for the discordant results was the detection of sibling species in the species complexes *A. niger* and *A. versicolor* by DNA sequencing analysis. *A. tubingensis* was detected in the former of them and *A. sydowii* in the latter. Thus, the sequencing of the β -tubulin gene fragment enables us not only to delimitate *Aspergillus* species, but also to reveal the sibling species of this genus.

Key words: *Aspergillus* spp., β -tubulin, DNA sequencing, molecular identification

ВВЕДЕНИЕ

Грибы рода *Aspergillus* Micheli ex Link относят к семейству *Trichocomaceae* класса *Eurotiomycetes* отдела *Ascomycota*. Они являются наиболее частой причиной инвазивных микозов, вызванных filamentозными грибами [1-3], продуцируют опасные для человека токсины и приводят к развитию аллергических реакций [4]. В природе эти грибы являются сапротрофами и живут преимущественно в почве, на органических остатках.

Род *Aspergillus* включает в себя 23 секции [5], из которых в 12 есть клинически значимые представители [6]. Эти секции объединяют в подрода (таблица 1). Ряд видов, согласно номенклатурным правилам, носит названия телеоморф (*Neosartorya*, *Emericella*).

Таблица 1.

Таксономическая принадлежность клинически значимых представителей рода *Aspergillus* (на основе [4]).

Подрод	Секция	Виды
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. chevalieri</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. amstelodami</i> , <i>A. repens</i> , <i>A. ruber</i>
	<i>Restricti</i>	<i>A. penicillioides</i> , <i>A. restrictus</i> , <i>A. caesiellus</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. lentulus</i> , <i>A. udagawae</i> , <i>Neosartorya fischeri</i> (синоним <i>A. fischeri</i>), <i>N. pseudofischeri</i> (синоним <i>A. thermomutatus</i>)
	<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i> , <i>A. clavatonanicus</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. sclerotiorum</i>
	<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. awamori</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>A. aculeatus</i> , <i>A. japonicus</i>
	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. avenaceus</i>
<i>Terrei</i>	<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>
	<i>Flavipedes</i>	<i>A. flavipes</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. niveus</i> , <i>A. janus</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>A. nidulans</i> , <i>Emericella quadrilineata</i> (синоним <i>A. quadrilineatus</i>), <i>A. unguis</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. sydowii</i>
	<i>Usti</i>	<i>A. ustus</i> , <i>A. deflexus</i> , <i>A. granulatus</i>
<i>Candidi</i>	<i>Candidi</i>	<i>A. candidus</i>

Сложность систематики рода *Aspergillus* обуславливает необходимость применения к этой группе микромицетов принципов полифазной таксономии, когда для классификации и идентификации привлекаются все возможные данные – фенотипические, генотипические и филогенетические [7]. Благодаря такому комплексному подходу были открыты два медицински значимых криптических вида, характеризующиеся пониженной чувствительностью к азолам, – *A. lentulus* Balajee & K.A. Marr [8] и *A. calidoustus* Varga, Houbraeken & Samson [9].

По морфологическим признакам хорошо идентифицируются морфовиды аспергиллов, представляющие собой видоые комплексы (агрегаты), каждый из которых содержит один или несколько близких видов. Так, при исследовании инвазивного аспергиллёза у пациентов трансплантационных центров в США было выделено 15 видов, которые объединены в семь видоых комплексов: *A. fumigatus* Fresen., *A. niger* Tiegh., *A. flavus* Link, *A. terreus* Thom, *A. ustus* (Bainier) Thom & Church, *A. versicolor* (Vuill.) Tirab. и *A. nidulans* (Eidam) G. Winter [10]. Детальная идентификация внутри видоого комплекса возможна только с привлечением молекулярных методов.

Наиболее часто используемые для идентификации микромицетов локусы рДНК ITS и D1/D2 в случае аспергиллов дают разрешение только до уровня агрегата близких видов (морфовида). Локусы D1/D2 очень близки или идентичны у многих видов *Aspergillus*, что позволило применить для них термин «молекулярный двойник», например, *A. flavus* имеет шесть молекулярных двойников по D1/D2, для которых нуклеотидная последовательность совпадает на 99,8-100%: *A. gymnosardae* Yukawa (синоним *A. parasiticus* Speare), *A. sojae* Sakag. & K. Yamada ex Murak., *A. subolivaceus* Raper & Fennell, *A. terricola* Marchal & É.J. Marchal, *A. tamaritii* Kita, *A. flavofurcatus* Bat. & H. Maia [11].

Рабочая группа по исследованию аспергиллов при Международном сообществе медицинских и ветеринарных микологов ISHAM рекомендует использовать для этого анализ нуклеотидных последовательностей интрон-богатых генов, кодирующих белки, например, β-тубулин [12]. Определение, основанное только на морфологических признаках, в настоящее время не считается достаточным [13].

Цель нашего исследования – молекулярная идентификация представителей *Aspergillus* из разных видоых комплексов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе были использованы 21 штамм аспергиллов из Российской коллекции патогенных грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина: *A. fumigatus* РКПГФ 1377, *A. fumigatus* РКПГФ 1327, *A. fumigatus* РКПГФ 1384, *A. flavus* РКПГФ 1375, *A. flavus* РКПГФ 1247, *A. niger* РКПГФ 1329, *A. niger* РКПГФ 1249/880-2, *A. niger* РКПГФ 1337, *A. niger* РКПГФ 1345, *A. niger* РКПГФ 1376, *A. versicolor* РКПГФ 1115, *A. versicolor* РКПГФ 4/307, *A. versicolor* РКПГФ 47, *A. terreus* РКПГФ 109/ВКМФ65, *A. terreus* РКПГФ 111/ВКМФ 67, *A. terreus* РКПГФ 850/724, *A. terreus* РКПГФ 886/644к, *A. terreus* РКПГФ 1275/1397, *A. sulphureus* РКПГФ 1062, *A. glaucus* РКПГФ 1250/2340.

Грибы были фенотипически идентифицированы с помощью микроскопии. Микромицеты выращивали на агаре Сабуро и картофельно-морковном агаре (группа *A. versicolor*).

Выделение ДНК

Выделение геномной ДНК из культур микромицетов осуществляли по модифицированной методике Дойла и Дойла (Doyle, Doyle) [14], как описано ранее [15].

ДНК секвенирование

Все использованные в работе микромицеты были идентифицированы с помощью секвенирования ДНК согласно рекомендациям Института Клинических и Лабораторных стандартов США [16]. Идентификацию *Aspergillus* проводили по фрагменту гена β-тубулина с праймерами bt-2a и bt-2b [17]. В ходе оптимизации было протестировано несколько протоколов амплификации фрагмента гена β-тубулина [17-19]. Был выбран следующий: стартовая денатурация 5 мин. – 94 °С, 35 циклов (15 сек. – 94 °С, 30 сек. – 60 °С, 30 сек. – 68 °С), финальная элонгация 5 мин. – 68 °С. ПЦР проводили в 50 мкл в присутствии 0,2 мМ каждого дНТФ (СибЭнзим, Новосибирск), 20 пкмоль каждого праймера (Синтол, Москва), 2,5 е.а. Таq-полимеразы (Синтол, Москва), 2,5 мМ MgCl₂ (Синтол, Москва) и 2 нг геномной ДНК на термоциклере Verity (Applied Biosystems, США).

Визуализацию продуктов ПЦР, их очистку, получение и анализ первичных нуклеотидных последовательностей проводили, как описано ранее [15]. Полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в базу данных GenBank.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для точной видоой идентификации мы использовали фрагмент гена β-тубулина, согласно рекомендациям рабочей группы по аспергилам при ISHAM [12].

Полученные нуклеотидные последовательности для всех исследованных штаммов *Aspergillus* представляли собой участки гена β-тубулина, содержащие часть экзона 3, полные экзоны 4 и 5, часть экзона 6, высокоизменчивые интроны 3, 4 и 5. У представителей морфовида *A. versicolor* интрон 5 отсутствовал. Результаты молекулярной идентификации и номера доступа к соответствующим последовательностям в базе данных GenBank представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Сравнение фенотипической и молекулярной идентификации *Aspergillus* spp.

Фенотипическая идентификация	Молекулярная идентификация (ДНК-секвенирование)	Номер штамма в РКПГ	Номер последовательности фрагмента гена β-тубулина в GenBank
<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	РКПГФ 1377	КС 190481
	<i>A. fumigatus</i>	РКПГФ 1327	КС 190482
	<i>A. fumigatus</i>	РКПГФ 1384	-
<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	РКПГФ 1375	КС 197807
	<i>A. flavus</i>	РКПГФ 1247	КС 190483
<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	РКПГФ 1329	КС 190484
	<i>A. niger</i>	РКПГФ 1249/880-2	КС 190485
	<i>A. tubingensis</i>	РКПГФ 1337	КС 190486
	<i>A. niger</i>	РКПГФ 1345	-
	<i>A. tubingensis</i>	РКПГФ 1376	-

<i>A. versicolor</i>	<i>A. sydowii</i>	РКПГФ 1115	КС 190480
	<i>A. versicolor</i> , <i>A. jensenii</i> , <i>A. creber</i>	РКПГФ 4/307	-
	<i>A. sydowii</i>	РКПГФ 47	КС 190479
<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	РКПГФ 109/ВКМФ65	КС 197805
	<i>A. terreus</i>	РКПГФ 111/ВКМФ 67	КС 190477
	<i>A. terreus</i>	РКПГФ 850/724	КС 190476
	<i>A. terreus</i>	РКПГФ 886/644k	КС 190475
	<i>A. terreus</i>	РКПГФ 1275/1397	-
<i>A. sulfureus</i>	<i>A. sclerotiorum</i>	РКПГФ 1062	КС 190487
<i>A. glaucus</i>	<i>A. amstelodami</i>	РКПГФ 1250/2340	КС 197806

Согласно фенотипической идентификации, выполненной при включении штаммов в музейную коллекцию, 19 изолятов принадлежали пяти морфовадам: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. terreus*. Для двух из них нами были обнаружены криптические виды. Штаммы РКПГФ 1337 и РКПГФ 1376 были идентифицированы как *A. tubingensis* Mosseray, вид морфологически неотличимый от *A. niger* и являющийся причиной инвазивного аспергиллёза у человека [10]. Недавно с помощью молекулярных данных было показано, что основной причиной отомикозов является не определяемый фенотипически *A. niger*, а виды *A. awamori* и *A. tubingensis* [20].

Два из трёх штаммов морфологически определённых как *A. versicolor*, по результатам секвенирования, оказались видом *A. sydowii*. Один штамм не удалось идентифицировать однозначно, т.к. нуклеотидная последовательность фрагмента гена β -тубулина была идентична трём видам – *A. versicolor*, *A. jensenii*, *A. creber*. Два из этих видов (*A. jensenii* и *A. creber*) являются криптическими видами агрегата *versicolor* и были описаны в 2012 г. с использованием полифазного таксономического подхода, который включал мультилокусное секвенирование по семи фрагментам генома [21].

При анализе последовательностей *A. flavus* в результатах BLAST появляются последовательности *A. oryzae* (Ahlb.) Sohn. Согласно номенклатурной базе данных Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>) и базе данных Международной Микологической Ассоциации (<http://www.mycobank.org>), *A. oryzae* не является самостоятельным видом, а рассматрива-

ется как разновидность *A. flavus* var. *oryzae* (Ahlb.) Kurtzman, M.J. Smiley, Robnett & Wicklow. Анализ результатов полногеномного секвенирования типовых штаммов *A. flavus* и *A. oryzae* показал их практически полную идентичность [22].

Два изолята из 21 исследованных являются минорными среди медицински значимых аспергиллов. Штамм РКПГФ 1062 фенотипически был идентифицирован как *A. sulphureus* Desm., а молекулярно – как *A. sclerotiorum* G.A. Huber, таксономически принадлежащий секции *Circumdati* [5]. Штамм РКПГФ 1250/2340 фенотипически был идентифицирован как *A. glaucus* (L.) Link, а молекулярно – как *A. amstelodami* Thom & Church (синоним – *Eurotium amstelodami* L. Mangin). *A. amstelodami* и *A. glaucus* с таксономической точки зрения относятся к одной секции [5]. Таким образом, в данном случае результаты молекулярной и фенотипической идентификации согласуются на уровне секции. Система криптических видов для этих грибов ещё не достаточно разработана, что может быть связано с их сравнительно редкой встречаемостью. Неточность фенотипической идентификации также обусловлена необычностью этих видов в клинической практике.

Согласно данным из научной литературы, наибольшее количество криптических видов идентифицируют в комплексах *A. versicolor* и *A. niger*. Так, среди изолятов, выделенных от пациентов инвазивным аспергиллёзом, 6%, 32% и 40% видов комплексов *A. fumigatus*, *A. niger* и *A. versicolor* соответственно, оказались криптическими [10]. В нашем исследовании два изолята комплекса *A. niger* (из пяти) и все изоляты комплекса *A. versicolor* (три из трёх) были идентифицированы как криптические виды. В комплексах *A. flavus* и *A. terreus* клинически значимых криптических видов обычно не выявляют [10, 23].

ВЫВОДЫ

Секвенирование фрагмента гена β -тубулина можно успешно использовать для идентификации *Aspergillus* spp. и выявления криптических видов, трудно различимых морфологически.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хостелиди С.Н., Борзова Ю.В., Десятник Е.А., Игнатъева С.М., Зубаровская Н.И., Колбин А.С., Зюзгин И.С., Бойченко Э.Г., Богомолова Т.С., Васильева Н.В., Климко Н.Н. Аспергиллез головного мозга: описание четырех клинических случаев // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11., №3. – С. 16-19.
2. Борзова Ю.В., Десятник Е.А., Хостелиди С.Н., Попова М.О., Чернопятова Р.М., Богомолова Т.С., Игнатъева С.М., Шурпицкая О.А., Колбин А.С., Зюзгин И.С., Зубаровская Н.И., Климович А.В., Васильева Н.В., Климко Н.Н. Хронический инвазивный аспергиллез легких у больных в Санкт-Петербурге // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11., №3. – С. 20-25.
3. Warnock D.W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections // Jpn. J. Med. Mycol. – 2007. – Vol. 48. – P. 1-12.
4. Hedayati M.T., Pasqualotto A.C., Warn P.A. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer // Microbiology. – 2007. – Vol. 153. – P. 1677-1692.
5. Varga J., Samson R. A. *Aspergillus* in the Genomic Era. – Wageningen, the Netherlands: Wageningen Academic Publishing. – 2008. – 334 p.
6. Klich M.A. Identification of clinically relevant aspergilli // Med. Mycol. – 2006. – P. S127-S131.
7. Hong S.-B., Go S.-J., Shin H.-D., et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species // Mycologia. – 2005. – Vol. 97, № 6. – P. 1316-1329.
8. Balajee S. A., Gribskov E., Hanley D., et al. *Aspergillus lentilus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus* // Eukaryot.

- Cell. – 2005. – Vol. 4. – P. 625-632.
9. Varga J, Houbroken J, Lee V.D., et al. *Aspergillus calidoustus* sp. nov., causative agent of human infections previously assigned to *Aspergillus ustus* // Eukaryot. Cell. – 2008. – Vol. 7. – P. 630-638.
 10. Balajee S.A., Kano R., Baddley J.W., et al. Molecular Identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47, №10. – P. 3138-3141.
 11. Hinrikson H.P., Hurst S.F., Lott T.J., et al. Assessment of ribosomal Large-Subunit D1-D2, Internal Transcribed Spacer 1, and Internal Transcribed Spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species // J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 43, №5. – P. 2092-2103.
 12. Balajee S.A., Houbroken J, Verweij P.E., et al. *Aspergillus* species identification in the clinical setting // Studies in Mycology. – 2007. – Vol. 59. – P. 39-46.
 13. Balajee S.A., Nickle D., Varga J., Marr K.A. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping // Eukaryot. Cell. – 2006. – Vol. 5, №10. – P. 1705-1712.
 14. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. – 1987. – Vol. 19. – P. 11-15.
 15. Михайлова Ю.В., Полищук А.Г. Молекулярная идентификация представителей *Zygomycetes* из Российской Коллекции Патогенных Грибов по нуклеотидным последовательностям рДНК // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 3. – С. 59-63.
 16. CLSI. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; approved Guideline. CLSI document MM14-A. – Wayne, PA: Clin. and Lab. Standards Institute, 2008. – 76 p.
 17. Glass N.L., Donaldson G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify genes from filamentous ascomycetes // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – Vol. 61. – P. 1323-1330.
 18. Howard S.J., Harrison E., Bowyer P., et al. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2011. – Vol. 55, №10. – P. 4802-4809.
 19. Balajee S.A., Baddley J.W., Peterson S.W. et al. *Aspergillus alabamensis*, a new clinically relevant species in the section *Terrei* // Eukaryot. Cell. – 2009. – Vol. 8, №5. – P. 713-722.
 20. Szigeti G., Koscube S., Doczi I., et al. Molecular identification and antifungal susceptibilities of black *Aspergillus* isolates from otomycosis cases in Hungary // Mycopathologia. – 2012. – Vol. 174. – P. 143-147.
 21. Jurjevic Z., Peterson S. W., Horn B. W. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny // IMA Fungus. – 2012. – Vol.3, № 1. – P. 59-79.
 22. Payne G. A., Nierman W. C., Wortman J. R., et al. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae* // Med. Mycol. – 2006. – Vol. 44, № s1. – P. 9-11.
 23. Arabatzis M., Kambouris M., Kyprianou M., et al. Polyphasic identification and susceptibility to seven antifungals of 102 *Aspergillus* isolates recovered from immunocompromised hosts in Greece // Antimicrob. Agents and Chemotherapy. – 2011. – Vol. 55, №6. – P. 3025-3030.

Поступила в редакцию журнала 29.11.2012

Рецензент: Райко М.П.



АНТИМИКОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В ОТНОШЕНИИ *CANDIDA ALBICANS*

¹Куликов С.Н. (с.н.с.)*, ²Шакирова Д.Р. (студент), ³Тихонов В.Е. (с.н.с.), ³Безродных Е.А. (н.с.), ⁴Ильина А.В. (в.н.с.), ⁴Левов А.Н. (с.н.с.), ⁴Варламов В.П. (зав. лаб.)

¹Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, Казань; ²Казанский Федеральный Университет, Казань; ³Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва; ⁴Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия

© Коллектив авторов, 2012

Исследовали антимикотическую активность хитозана и его производных в отношении Candida albicans. Установлено, что повышение антимикотической активности связано с модуляцией положительного заряда поликатиона. Показано, что хитозановый полимер в сублетальных концентрациях ингибирует образование клетками C. albicans мицелиальных структур. Наиболее сильными ингибиторами гифообразования являлись производные олигохитозанов, содержащие четвертичные аминогруппы, для которых эффект был отмечен при концентрациях в 1/128 МИК.

Ключевые слова: антимикотическая активность, гифообразование, молекулярная масса, производное хитозана, степень деацетилирования, хитозан

ANTIMYCOTIC ACTIVITY OF CHITOSAN AND ITS DERIVATIVES AGAINST *CANDIDA ALBICANS*

¹Kulikov S.N. (senior scientific collaborator), ²Shakirova D.R. (student), ³Tikhonov V.E. (senior scientific collaborator), ³Bezrodnykh Ye.A. (scientific collaborator), ⁴Il'ina A.V. (leading scientific collaborator), ⁴Levov A.N. (senior scientific collaborator), ⁴Varlamov V.P. (head of the laboratory)

¹Kazan Scientific Research Institute of epidemiology and microbiology, Kazan; ²Kazan Federal University, Kazan; ³A.N.Nesmeyanov Institute of elements organic connections of RAS, Moscow; ⁴Center «Bioengineering» of RAS, Moscow, Russia

© Collective of authors, 2012

* Контактное лицо: Куликов Сергей Николаевич
тел.: (843) 238-99-79

Antifungal activity of chitosan and its derivatives against Candida albicans have been investigated. It was found that increasing of antimycotic activity is associated with the modulation of the positive charge of chitosan polycation. It was shown that chitosan polymer in sublethal concentrations inhibits forming of filamentous structures. The most potent inhibitors were derivatives containing quaternary amine groups, when was observed at concentrations of 1/128 MIC.

Key words: antifungal activity, chitosan, chitosan derivative, degree of deacetylation, gifal formation, molecular mass

ВВЕДЕНИЕ

Candida spp. являются одной из основных причин возникновения оппортунистических микозов. Наиболее значимым представителем данного рода, с точки зрения медицинской микологии, долгое время является *Candida albicans*. Этот микроорганизм способен поражать самые разнообразные органы и ткани человека. Кроме этого, клинические штаммы *C. albicans* всё чаще характеризуются как устойчивые к тем или иным противогрибковым препаратам. Поэтому разработка новых антимикотических средств сохраняет свою актуальность.

Одним из таких веществ является хитозан – биогенный полимер, получаемый из хитина методом щелочного деацетилирования и состоящий из остатков глюкозамина и ацетилглюкозамина. В отличие от классических антимикотиков, хитозан не имеет единственной мишени для своего действия, а его противогрибной эффект является совокупностью нескольких возможных механизмов, складывающихся в сложный процесс, который приводит, в конечном итоге, к гибели клеток микроорганизма [1]. В последних исследованиях показано, что набор генов, которые вовлечены в активацию при действии хитозана и антимикотиков, существенно отличается [2], следовательно, хитозан может быть использован в качестве эффективной альтернативы классическим фунгицидам для борьбы с резистентными штаммами патогенных грибов.

Ранее нами были продемонстрированы антимикотические свойства низкомолекулярных хитозанов (от 1 до 20 кДа) в отношении различных условно-патогенных дрожжеподобных грибов [3]. Более сильной антимикотической активностью могут обладать модифицированные хитозаны, к которым присоединены химические группы, придающие хитозановому полимеру новые или улучшенные свойства, – растворимость при высоких значениях pH, имеющие более сильный положительный заряд, сродство к гидрофобным структурам (за счет введения гидрофобных заместителей), в том числе – к липидным мембранам. В многочисленных исследованиях [4, 5], выявили высокую эффективность подобных модифицированных хитозанов в отношении бактерий; менее изученной остаётся антимикотическая активность таких производных и практически неизученной – влияние хитозанового полимера и его производных на формирование грибом мицелиальных структур, что является важным фактором вирулентного потенциала микроорганизма.

В связи с вышеизложенным, интерес представляло сравнение антимикотических свойств низкомолекулярных и олигомерных форм хитозана и их химических модификаций в отношении *S. albicans*, а также их влияние на образование грибом мицелиальных структур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы хитозанов. Низкомолекулярные хитозаны со средневязкостной молекулярной массой (ММ) 22 кДа и степенью дезацетилирования 58 и 89% были получены из крабового высокомолекулярного хитозана путём ферментной деполимеризации с использованием ферментного препарата Целловиридин Г20х. Для получения образца со степенью дезацетилирования 58%, вышеупомянутый образец был реацетилирован [6]. Олигохитозан со средневязкостной молекулярной массой (Мв) 7 кДа и степенью дезацетилирования >90% был получен путём химической деполимеризации.

В работе использовали N,N,N-триметиламмоний хитозан, полученный из олигохитозана с M_w 7 кДа и содержанием четвертичных аминогрупп 30 моль% (Рис. 1А).

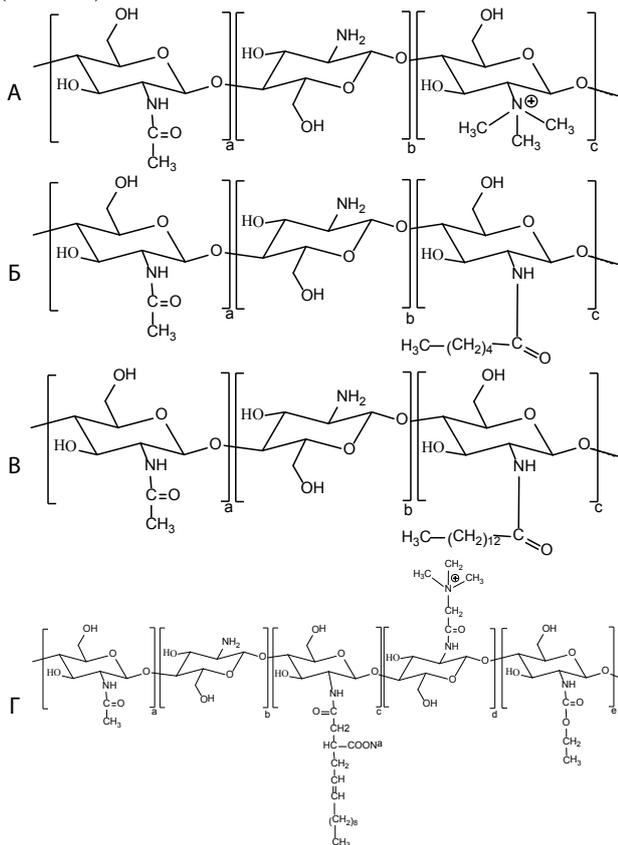


Рис. 1. Структура производных хитозана. А – N,N,N-триметиламмоний хитозан, Б – N-капроноилхитозан, В – N-миристиноилхитозан, Г – N-(доддецил)сукциноил – N,N,N-триметиламмоний хитозан

В работе использовали ацилированные (с длиной жирнокислотного остатка 6 и 14 атомов углерода) по аминогруппе производные олигохитозана с M_w 8,3 кДа и степенью дезацетилирования 99%, полученные, как описано в работе [8], (Рис. 1Б и 1В). Сте-

пень замещения ацильными остатками составляла 8 моль%. Также использовали производное олигохитозана с молекулярной массой 4,6 кДа, содержащий C₁₂ алифатическую группу 12 моль% и четвертичный аммоний 25 моль% [9] (Рис. 1Г).

Хроматографический анализ хитозанов. Полученные образцы низкомолекулярных хитозанов анализировали хроматографическим методом, как описано в работе [10].

Приготовление рабочих растворов низкомолекулярных хитозанов и их производных. Образцы растворяли в дистиллированной воде до концентрации 8 мг/мл, полученные растворы стерилизовали фильтрацией через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм и хранили при 4 °С.

Штаммы грибов и условия их культивирования. В работе использовали музейные штаммы *S. albicans* № 4 (коллекция КНИИЭМ) и ATCC 90028, а также клинический штамм *S. albicans* № 2515, любезно предоставленный Лисовской С.А. (лаборатория микологии КНИИЭМ). *S. albicans* № 2515, выделенный со слизистой оболочки зева, характеризовался устойчивостью к кетоконазолу, флуконазолу, тербинафину, клотримазолу и натамицину, высокой чувствительностью к нистатину и интраконазолу. Свежевыделенный штамм хранили на агаризованной среде Сабуро при 4 °С не более двух недель до проведения исследования. Условия хранения и культивирования штаммов грибов, а также определение минимальных ингибирующих концентраций проводили, как описано в работе [11].

Оценку ингибирования образования мицелиальных структур у клинического штамма *S. albicans* выполняли с применением световой микроскопии [11]. Для этого из эксперимента по определению МИК хитозанов и их производных, в ходе которого готовили ряд двойных разведений вещества, после 48 часов инкубации при 30 °С отбирали аликвоту суспензии объемом 20 мкл. Суспензию помещали на предметное стекло и с помощью светового микроскопа подсчитывали в 10 разных полях зрения количество дрожжеподобных клеток. В тех же полях зрения подсчитывали количество мицелиальных структур. Рассчитывали долю мицелиальных структур по отношению к общему количеству дрожжеподобных клеток в опыте. Долю мицелиальных структур в контрольном варианте без добавления хитозана принимали за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что биоцидная активность хитозана во многом определяется положительным зарядом аминогрупп хитозана. В нашем исследовании были взяты два образца низкомолекулярного хитозана (22 кДа) с высокой (89%) и низкой (58%) степенью дезацетилирования, которые подтвердили взаимосвязь высокой антимикотической активности полимера с количеством свободных аминогрупп (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние физико-химических характеристик образцов хитозана на МИК (мкг/мл) хитозанов и их производных в отношении *C. albicans*

Образец хитозана	Штамм <i>C. albicans</i>		
	№ 4	АТСС 90028	№ 2515
7 кДа	128	512	512
8,3 кДа	128	512	512
7 кДа, К	32	64	64
8,3 кДа, С6	128	512	512
8,3 кДа, С14	128	512	512
5 кДа, К, С12	32	64	64
22 кДа, СД 58%	256	1024	≥2000
22 кДа, СД 89%	64	256	256

Представлены средние значения данных из трёх независимых экспериментов

Высокодезацетилованный образец показал более высокую антимикотическую активность, что выражалось в уменьшении значения МИК в отношении всех взятых в эксперимент штаммов *C. albicans*, по сравнению с образцом, у которого почти половина аминокрупп ацетилована.

Низкомолекулярный образец (ММ 22 кДа, СД 89%) также обладал более высокой антимикотической активностью, по сравнению с олигомерными формами хитозана (7–8,3 кДа), что подтверждено ранее полученными результатами на дрожжеподобных грибах [3]. Однако олигохитозаны, при немного худшей антимикотической эффективности, обладают рядом привлекательных свойств – лучшей растворимостью при $pH \geq 7$, более высоким pK_a и более низкой вязкостью. На основе олигосахарида (ММ 7 кДа) было синтезировано производное с четвертичной аминокруппой – N,N,N-триметиламмоний хитозан. Такое производное обладает более выраженными катионными свойствами, чем немодифицированный хитозан. Показатель МИК кватернизированного производного уменьшался в четыре раза, по сравнению с немодифицированным хитозаном, из чего заключили, что положительный заряд играет важную роль в проявлении хитозаном антимикотических свойств, а её модуляция позволяет усилить биологический эффект полимера.

Также нами были использованы производные олигохитозана (ММ 8,3 кДа), содержащие алифатические группы различной длины (Рис. 1Б, В). Благодаря наличию гидрофобной части такие модифицированные хитозаны могут обладать повышенным сродством к мембранным структурам микроорганизмов, усиливая негативное воздействие на них поликатиона. Ранее нами было продемонстрировано, что ацильные производные олигохитозанов с боковыми ацильными остатками жирных кислот, содержащих 6 и 14 атомов углерода, усиливают антибактериальные свойства полимера в отношении бактерий [8]. При этом было отмечено усиление антибактериального эффекта производных не только в отношении грамотрицательных энтеробактерий, которые

обладают внешней бислоистой мембраной, но также в отношении грамположительных бактерий, у которых плазмалемма защищена толстой клеточной стенкой. В связи с этим предположили возможность проникновения производных хитозана через клеточную стенку не только бактерий, но также дрожжеподобных грибов. Однако, как видно из таблицы 1, МИК для ацильных производных не отличается от МИК исходного образца. Вероятно, это связано с особенностями строения ЦПМ грибных клеток, делающих эти структуры более устойчивыми к действию поликатиона. Известно, что жирнокислотный состав ЦПМ может сильно влиять на чувствительность грибных клеток к действию хитозанового полимера [12]. Возможно, что клеточные покровы грибных клеток обладают большими барьерными свойствами, препятствуя проникновению молекул хитозана к ЦПМ.

Также нами было исследовано производное хитозана (ММ 7 кДа), содержащее одновременно кватернизированные аминокруппы и боковые остатки с алифатическим составом (Рис. 1 Г). МИК данного образца в отношении всех штаммов *C. albicans* была сопоставима с МИК кватернизированного образца (8,3 кДа). Следовательно, антимикотическая активность хитозана в отношении *C. albicans* модулируется путём внесения в состав молекулы кватернизированных аминокрупп, но не с помощью внесения гидрофобных группировок (ацильных, додецильных).

Наряду с определением МИК хитозанов и их производных, мы исследовали способность этих веществ влиять на образование мицелиальных структур *C. albicans*. Поскольку музейные штаммы при культивировании практически не образовывали мицелий, в эксперимент был взят клинический штамм хорошо образующий эти структуры (Рис. 2А).

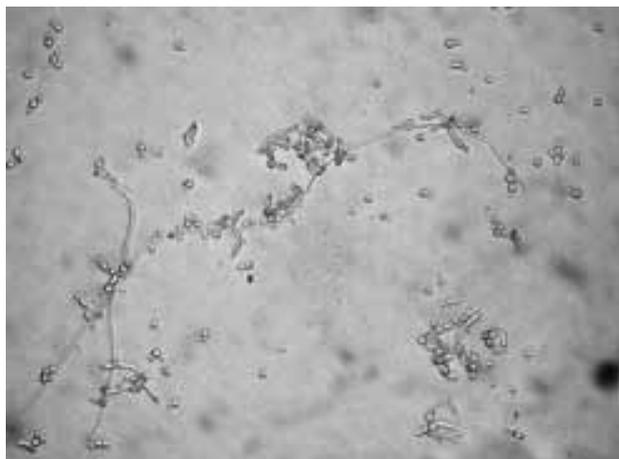
Было показано, что все образцы в той или иной мере способны в субингибирующих концентрациях подавлять гифообразование (табл. 2).

Таблица 2

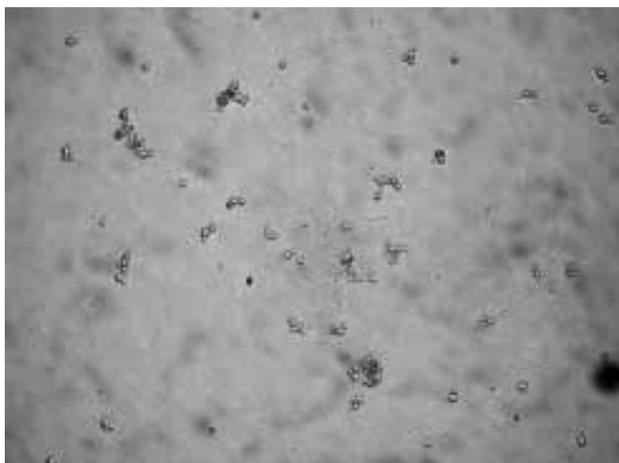
Влияние концентрации хитозана с различной молекулярной массой на образование мицелиальных структур у *C. albicans* № 2515

Образец хитозана	Концентрация хитозана, МИК					
	1/4	1/16	1/32	1/64	1/128	контроль
7 кДа	0	15±6	30±6	50±8	74±8	72±10
8,3 кДа	0	17±6	31±5	55±7	76±13	73±11
7 кДа, К	0	0	5±4	30±6	50±6	71±10
8,3 кДа, С-6	0	14±5	27±6	44±7	71±6	72±9
8,3 кДа, С-14	0	15±6	25±5	44±7	68±10	74±10
4,6 кДа, К, С-12	0	0	6±4	29±5	49±6	70±7
22 кДа, СД 58%	20±5	45±5	50±6	65±7	69±8	70±10
22 кДа, СД 89%	0	5±4	15±5	40±5	70±9	69±9

К – кватернизированное производное; С-6, С-12 и С-14 – производные с гидрофобными заместителями; СД – степень деацетилирования. Представлены данные трёх независимых экспериментов.



А



Б

Рис. 2. Типичный вид *C. albicans* № 2515 в отсутствии хитозана (А) и в присутствии субингибирующей концентрации хитозана (Б)

Ингибирующий эффект зависел от концентрации вещества. В присутствии сравнительно высоких концентраций хитозанов (1/4 МИК) почти все образцы полностью подавляли образование *Candida* мицелиальных структур (Рис 2Б). В таких условиях в культуре присутствовали только дрожжеподобные клетки.

Не полностью подавляя гифообразование только образец низкомолекулярного хитозана (22 кДа) с низкой степенью дезацетилирования, что также согласуется и с его самой низкой антимикотической активностью. Низкомолекулярный хитозан (22 кДа, СД 89%) проявлял немного более высокую эффективность в подавлении гифообразования грибом, чем олигохитозаны (7 и 8,3 кДа), что также указывает на зависимость эффекта от молекулярной массы полимера. Лучшими в подавлении гифообразования были производные хитозана, содержащие кватернизированные группы, – образование мицелия значительно ингибировалось ими при 1/16 МИК, а эффект сохранялся даже при 1/128 МИК.

ВЫВОДЫ

Таким образом, были получены производные олигохитозанов с усиленными антимикотическими свойствами в отношении *C. albicans*. Выявили, что повышение антимикотической активности связано с модуляцией положительного заряда поликатиона. Внесение в молекулу полимера гидрофобных заместителей, отличающихся длиной заместителя алифатических групп различного происхождения, на противокандидозную активность производных не влияло. Установлено, что в субингибирующих концентрациях исследуемые вещества подавляют образование грибом мицелиальных структур. Наиболее сильными ингибиторами гифообразования являлись производные олигохитозанов, содержащие четвертичные аминогруппы, для которых эффект был отмечен при концентрациях в 1/128 МИК. Обнаруженный эффект ингибирования роста псевдогиф хитозаном может быть использован для создания средств, уменьшающих патогенный потенциал микроорганизмов со сниженным воздействием на нормальную микрофлору человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке регионального гранта Российского фонда фундаментальных исследований №12-04-97039 р_поволжье_а.

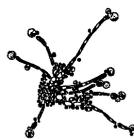
ЛИТЕРАТУРА

1. Zakrzewska A., Boorsma A., Delneri D., et al. Cellular processes and pathways that protect *Saccharomyces cerevisiae* cells against the plasma membrane-perturbing compound chitosan // Eukar. Cell. – 2007. – Vol. 6, № 4. – P. 600-608.
2. Jaime M.D., Lopez-Llorca L.V., Conesa A., et al. Identification of yeast genes that confer resistance to chitosan oligosaccharide (COS) using chemogenomics // BMC Genomics. – 2012. – Vol. 13, №1. – P. 267-312.
3. Куликов С.Н., Хайруллин Р.З., Лисовская С.А. и др. Антимикотическая активность хитозана с различной молекулярной массой и его влияние на морфологию клеток дрожжеподобных грибов // Проблемы медицинской микологии. – 2010. – Т. 12, №2. – С. 32-35.
4. Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review // Int. J. Food Microbiol. – 2010 – Vol. 144, №1. – P. 51-63.
5. Lim S.H., Hudson S.M. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals // J. Macromol. Sci. – 2003. –Vol. 43, №2. – P. 223-269.
6. Ильина А.В., Ткачёва Ю.В., Варламов В.П. Деполимеризация высокомолекулярного хитозана ферментным препаратом Целловиридин Г20х // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38, №2. – С. 132-135.
7. Ильина А.В., Варламов В.П. Влияние степени ацетилирования на ферментативный гидролиз хитозана препаратом Целловиридин Г20Х // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т.39, № 3. – С. 273-277.
8. Куликов С.Н., Хайруллин Р.З., Степнова Е.А. и др. Получение низкомолекулярных хитозанов и их ацильных производных и исследование их антибактериальных свойств // Бутлеровские сообщения. – 2010. – Т. 20, № 6. – С. 59-64.
9. Stepnova E.A., Tikhonov V.E., Babushkina T.A., et al. New approach to the quaternization of chitosan and its amphiphilic derivatives // Europ. Polymer J. – 2007. – Vol. 43. – P. 2414-2421.

10. *Лопатин С.А., Дербенева М.С., Куликов С.Н. и др.* Фракционирование хитозана методом ультрафильтрации // Журнал аналитической химии. – 2009. – Т. 64, №6. – С. 666-670.
11. *Куликов С.Н., Лисовская С.А., Глушко Н.И. и др.* Действие низкомолекулярного хитозана в отношении *Candida albicans* // Практическая медицина . – 2009. – Т. 35, №3. – С. 69-71.
12. *Palma-Guerrero J., Lopez-Jimenez J.A., Pérez-Berná A.J., et al.* Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan // Mol. Microbiol. – 2010. – Vol. 75, №4. – P. 1021-1032.

Поступила в редакцию журнала 04.10.2012

Рецензент: Н.П. Елинов



ЭЛЕКТРОННО - МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ *LICHTHEIMIA* SPP. *IN VIVO* И *IN VITRO*

¹Степанова А.А. (в.н.с.)*, ²Хостелиди С.Н. (ассистент кафедры), ¹Аравийский Р.А. (в.н.с.), ³Зюзгин И.С. (зав.отд.), ³Ружинская О.С. (врач-гематолог), ⁴Криволапов Ю.А. (руководитель отделения), ¹Синицкая И.А. (с.н.с.), ²Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: ¹НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, ²кафедра клинической микологии, иммунологии и аллергологии и ⁴клиника молекулярной морфологии; ³Ленинградская областная клиническая больница, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2012

Сравнением ультраструктуры клеток вегетативного мицелия тканевых и культуральных форм *Lichtheimia* spp. показано, что они сходны по числу и строению ядер, митохондрий, по типу аккумулируемых запасных веществ, но сильно различаются по строению клеточных стенок. Тканевые формы гриба отличались большим разнообразием ультраструктуры клеточных стенок, что можно рассматривать в качестве защитного механизма в ответ на воздействие иммунной системы пациента и антифунгальной терапии. Показано, что для колоний культуральных форм гриба типично редуцированное спороношение.

Ключевые слова: *in vitro*, *in vivo*, *Lichtheimia* spp., световая, трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия, ультраструктура

ELECTRON-MICROSCOPIC INVESTIGATIONS OF *LICHTHEIMIA* *CORYMBIFERA* *IN VIVO* AND *IN VITRO*

¹Stepanova A.A. (leading scientific collaborator), ²Khostelidi S.N. (assistant lecture of the chair), ¹Araviyskiy R.A. (leading scientific collaborator), ³Zuzgin I.S. (head of the department), ³Ruzjinskaiya O.S. (hematologist), ³Krivolapov Y.A. (head of the department), ¹Sinitskaya I.A. (senior scientific collaborator), ²Klimko N.N. (head of the chair)

* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна
Тел.: (812) 303-51-40

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹Kashkin Research Institute of Medical Mycology, ²Chair of Clinical Mycology, Immunology and Allergology and ⁴clinic of molecular morphology; ³Leningrad Region Clinical Hospital, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2012

Comparison of ultrastructure of the cells of vegetative mycelium of *Lichtheimia* spp. tissue and cultural forms showed that they are similar on number and a structure of nuclei, mitochondrions, on type of accumulated spare substances, but strongly differed on a structure of cellular walls. The tissue fungal forms differed a big cell walls ultrastructural variety, that is possible to consider as the protective mechanism in reply to influence of patient immune system and antifungal therapy. It was shown that for colonies of cultural fungal forms the reduced sporogenesis are typical.

Key words: *in vitro*, *in vivo*, *Lichtheimia* spp., light, scanning and transmission electron microscopy, ultrastructure

ВВЕДЕНИЕ

Lichtheimia spp. – широко распространенные в природе виды патогенных грибов (отдел *Zygomycetes*, порядок *Mucorales*), способные поражать кожу, легкие и другие внутренние органы человека [1-2]. В научной литературе данные по особенностям ультраструктурной организации этого вида гриба были фрагментарны (Gale G.T., 1963). Представляло интерес изучить особенности ультраструктуры клеток тканевых форм *Lichtheimia* spp. и особенности трансформации тонкого строения составляющих их клеток при последующем посеве на питательную среду.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

У пациентки (Ж., 1956 г.р., полное описание случая приведено в работе Хостелиди С.Н. с соавторами) [3] с острым миелобластным лейкозом 13.10.2010 г. появились интенсивные боли в области послеоперационной раны (мастэктомия слева от 22.08.2010 г.). При перевязке обнаружили зону некроза мягких тканей (кожа, грануляции) диаметром 2 см. Взят материал для микроскопии, посева, гистологического исследования мягких тканей в области послеоперационной раны. При микроскопии – несептированный мицелий гриба.

15.10.2010 г. была проведена некротомия мягких тканей и начата терапия амфотерицином В в дозе 1 мг/кг/сутки (7 дней), затем – 1,5 мг/кг/сутки. Параллельно пациентка получала лечение лейкостимом в дозе 480 мкг в течение недели. После проведенной некрэктомии вновь отмечены язвенные дефекты с некрозом и светлым налетом, напоминающим мицелий гриба (Рис. 1 а, стрелка).

21.10.2010 г. выполнено оперативное удаление некротизированных участков кожи, подкожной клетчатки области груди слева – 25х15 см. В ходе оперативного лечения в дне раны визуализированы и удалены нежизнеспособные ткани большой грудной мышцы (на 8 сутки от появления некроза кожи). Выполнен торакоцентез слева, дренирование плевральной полости. Операционный материал передан вновь

для посева, а также для проведения гистологических и электронно-микроскопических исследований.

При посеве биоптатов кожи на питательную среду сусло-агар был получен рост светло-серой колонии (Рис. 1 б). При гистологическом исследовании (окрашивание гематоксилин-эозином) фрагментов кожи и подкожной жировой ткани в световом микроскопе Leica DM LB были выявлены многочисленные широкие гифы несептированного мицелия (Рис. 1 в). Таким образом, у пациентки был диагностирован мукоромикоз мягких тканей левой половины грудной клетки, обусловленный *Lichtheimia* spp.

Биоптаты и небольшие (4x5 мм) кусочки агаризированной среды с разных участков колоний гриба через 1, 2 и 3 суток после посева и их выращивания (при 28 °С) фиксировали для трансмиссионной (Jem 100SX) и сканирующей электронной (JSM 35) микроскопии по методике, описанной нами ранее [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологические данные. Светооптические исследования продольных срезов биоптатов кожи и подкожной жировой ткани пациентки, окрашенных гематоксилином-эозином, позволили выявить в поверхностных отделах некротизированной кожи с характерными многочисленными кровоизлияниями обильные широкие несептированные, часто неправильной формы, гифы (Рис. 1 г, стрелки). На основании этого был диагностирован мукоромикоз кожи с распространенным вторичным некрозом. Элементы спороношения в анализируемых срезах кожи отсутствовали, что характерно для тканевых форм этого вида гриба, вне зависимости от того, какой тип ткани он инфицирует [5].

Ультраструктура *Lichtheimia* spp. in vivo. В биоптатах пораженной кожи обнаружили только гифы несептированного мицелия, формирующие многочисленные скопления из профилей гиф различного (3,8-6,5 мкм) диаметра, которые различались между собой по характеру содержимого. Они находились на разных стадиях развития: роста, созревания, зрелости и старения. Довольно часто наблюдали полностью отмершие (Рис. 1 ц), часто – сильно искривленные гифы мицелия без содержимого.

Ядра (1,9x2,5 мкм) одиночные (Рис. 1 д, з) либо в небольших группах, обычно приурочены к клеточной стенке. Диффузный и конденсированный хроматин представлены в равной мере. Ядрышко одно, эксцентричное, крупное (0,5 мкм), с преобладанием гранулярного компонента. Контур оболочки ядра ровный либо слегка извилистый.

Митохондрии в большом числе, располагались в группах от 10 до 50 (Рис. 1 е) и находились в тесном контакте друг с другом. Они округлой (1,0-1,5 мкм) или эллипсоидной (0,4-0,5 мкм) формы. Матрикс органелл и содержимое крист по электронной плотности сходны с цитозолем.

Вакуоли в одних фрагментах гиф многочислен-

ные (Рис. 1 е), равномерно распределены по площади среза, мелкие, светлые, неправильной формы, контрастным тонопластом. Чаще всего встречались профили гиф с небольшим числом светлых вакуолей средних размеров разнообразной формы либо с крупной центральной.

Из запасных веществ в цитозоле интактных гиф выявляли липидные включения, а также в содержимом вакуолей – гранулы полифосфатов. Липидные включения умеренной плотности, округлой или неправильной формы. Для просветов молодых гиф с большим числом мелких вакуолей и митохондрий характерно наличие довольно большого числа мелких (0,3-0,4 мкм) липидных включений (Рис. 1 е). В профилях гиф с вакуолями средних размеров, помимо описанных липидных включений, имели место более крупные (3,0-4,0 мкм), часто занимающие весь их просвет (Рис. 1 з). Профили гиф с мелкими (0,1-0,2 мкм) темными гранулами полифосфатов в вакуолях отмечали как исключение.

Из компонентов эндомембранной системы в цитозоле клеток наблюдали редкие мелкие светлые пузырьки и короткие цистерны агранулярного эндоплазматического ретикулума (Рис. 1 ж). Плотный цитозоль богат свободными рибосомами. Плазмалемма трехслойная, асимметричная, плотно прилегала к клеточной стенке.

Особенностью ультраструктуры зрелых гиф тканевой формы мицелия было то, что они сильно различались между собой по строению (толщина, форма, электронная плотность, текстура) клеточных стенок. Выявили четыре основных типов строения клеточных стенок зрелых гиф изучаемого вида гриба: 1) довольно толстые (в среднем, 1,2 мкм) и равномерно утолщенные (Рис. 1 а, н, 2 а), двухслойные (с толстым темным, довольно плотным многослойным внутренним (в среднем, 0,8 мкм) и наружным тонким (в среднем, 0,2 мкм), умеренной электронной плотности тонкогранулярным); 2) трехслойные со средним тонким (0,1 мкм), темным, гомогенным (Рис. 1 и, 2 б), внутренним, варьирующей толщины (0,5-1,0 мкм), темным гомогенным (Рис. 1 и, 2 б) и наружным (0,4-0,6 мкм), умеренной электронной плотности, тонкогранулярным; 3) с тонкими (в среднем, 0,1 мкм) темными гомогенными клеточными стенками, интегральной частью которых был прилегающий к ним хорошо развитый (0,5-2,5 мкм) наружный слой, состоящий из плотно расположенных контрастных микрофибрилл (Рис. 1 к, 2 в); 4) неравномерно толстыми (1,5-3,0 мкм), темными, разнообразной, часто причудливой (на поперечном срезе гифы) формы (Рис. 1 ж, о-х, 2 г). Наиболее часто встречались гифы с клеточными стенками четвертого типа (75% от общего числа изученных), а наиболее редко (1%) – третьего. Гифы с клеточными стенками второго типа составляли 5%, тогда как первого – 19% от общего числа исследованных.

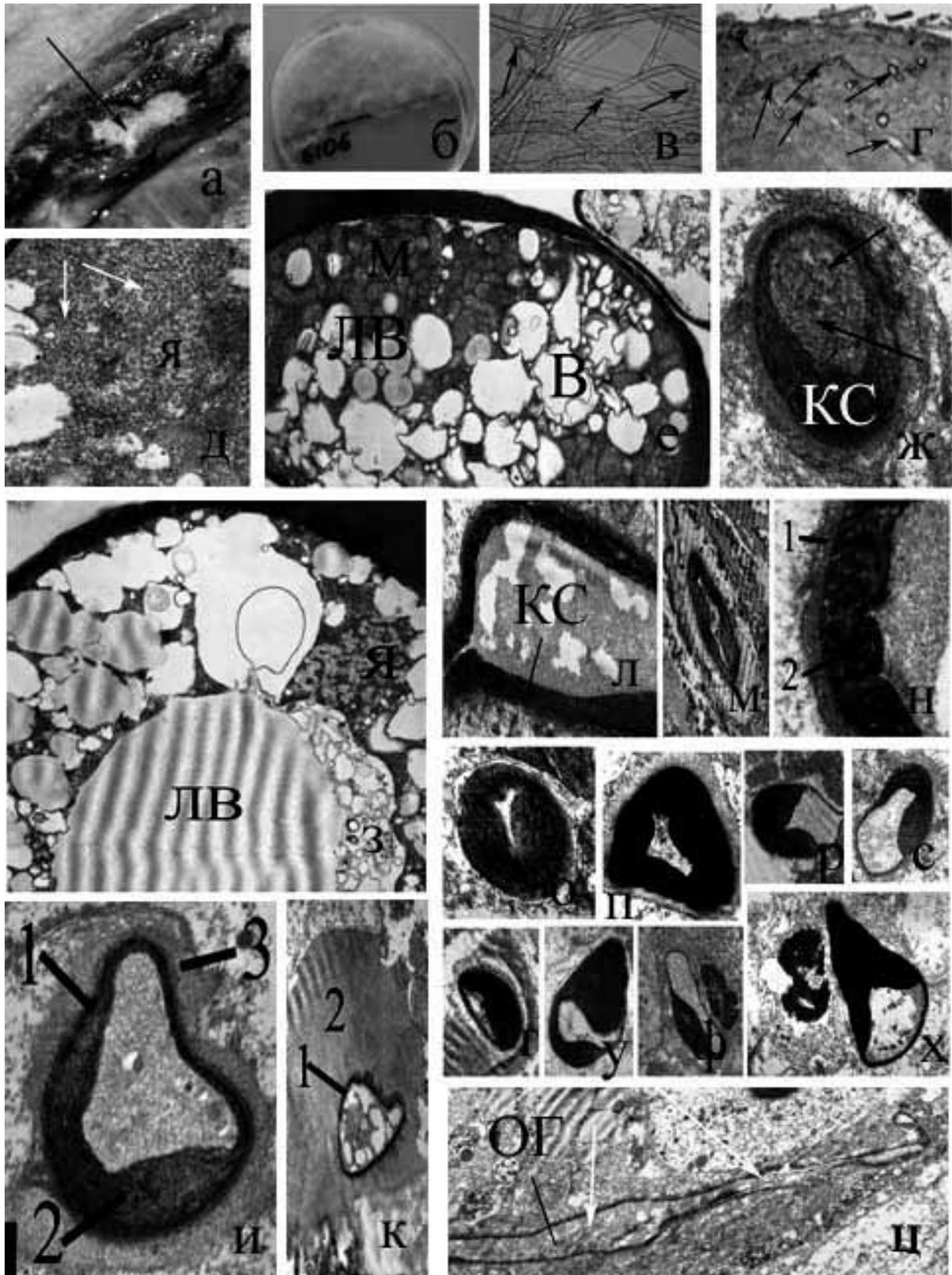


Рис. 1. а – фрагмент послеоперационной раны с налетом мицелия (показан стрелкой); б – общий вид колонии *Lichtheimia* spp. в чашке Петри через 3 суток после посева на питательную среду сусло-агар; в – особенности морфологии гиф мицелия *Lichtheimia* spp. в световом микроскопе (стрелками показаны спорангии); г – продольный срез кожи и подкожной жировой клетчатки (окраска гематоксилин-эозином) инфицированной *Lichtheimia* spp. (стрелками показаны гифы гриба); д-ц – электроннограммы клеток вегетативного мицелия тканевых форм гриба. На рисунках н, и, к цифрами обозначены слои клеточной стенки. Ув.: а – х40; б – х20; в – х250; г – х400; д, е, з – х18000; ж, л, и – х15000; н – х25000; к, м, о-ц – х1000. Условные обозначения здесь и на рис. 2: А – апофиза; В – вакуоль; Г – гифа; Зг – зигоспора; КС – клеточная стенка; ЛВ – липидное включений; М – митохондрия; ОГ – отмершая гифа; ПГ – полифосфатные гранулы; С – спорангий; Сп – септа; Сс – спорангиоспора

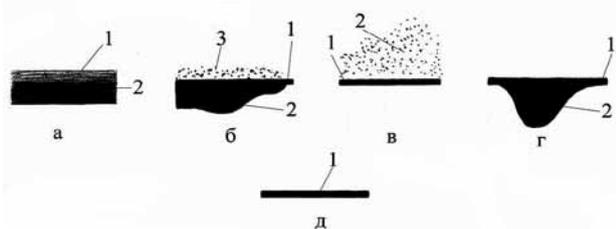


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая строение клеточных стенок гиф мицелия *Lichtheimia* spp. *in vivo* (а-г) и *in vitro* (д). Цифрами обозначены слои клеточной стенки

Отметим, что септы в гифах мицелия тканевых форм гриба не обнаружили, что связано с отсутствием спороношения.

В стареющих гифах мицелия цитозоль локально просветляется, существенно сокращалась численность органелл и запасных веществ. Ядра теряли групповое расположение, ядрышко сокращались в размерах, позже исчезал конденсированный хроматин. В митохондриях просветлялся матрикс и резко сокращалось число крист; форма их становилась неправильной. Тонoplast вакуолей и плазмалемма распадалась на фрагменты, формирующие везикулярные элементы. Со временем, в содержимом клеток органеллы и запасные вещества исчезали (Рис. 1 ц, стрелки). Латеральные клеточные стенки утоньшались, теряли слоистость и электронную плотность. В отмерших клетках последние приобретали сильно извилистые очертания и примыкали друг к другу.

Ультроструктура *Lichtheimia* spp. *in vitro*. После высева биоптатов на среду сусло-агар, уже через 7 часов (при 28 °С) формировалась пушистая колония (Рис. 1 б), характеризующаяся большой скоростью роста. Окраска колонии вначале роста белая, а со временем – светло-серая. При изучении морфологии колонии в световом микроскопе (Рис. 1 в) выявили довольно широкие гифы (3,5-6,0 мкм). Септы встречались редко и, в основном, в спорангиеносцах варьирующей длины (от 150 до 250 мкм), несущих разно-возрастные спорангии (Рис. 1 в, стрелки). Отметим, что формирование септ вблизи репродуктивных структур является характерной особенностью вегетативного мицелия зигомицетов.

Как видно на снимке, полученном на небольшом увеличении сканирующего электронного микроскопа, для изучаемой колонии характерны радиально и рыхло ориентированные гифы (Рис. 1 а), имеющие гладкую поверхность (Рис. 1 б). Морфологической особенностью гиф мицелия была редкая встречаемость латеральных ответвлений, располагающихся под прямым углом к несущей ее гифе (Рис. 3 в), а также спорангиев (Рис. 1 в, 3 а, стрелки) и зигоспор.

Спорангии – обратно грушевидной формы (от 20-60 мкм, Рис. 3 г), с характерным тонко-гранулярным рисунком поверхности (Рис. 3 д). Апофиза (50-100 мкм) конической формы, что наглядно очевидно после разрыва (Рис. 3 ч, стрелка) оболочки спорангия и освобождения шаровидных или эллиптических

спорангиоспор (Рис. 3 е). Поверхность молодых спорангиоспор гладкая, тогда как зрелых – четко орнаментирована в виде хаотично расположенных (Рис. 3 ж), невысоких (0,6-0,9 мкм) гребневидных выростов. Интересной особенностью спорангиоспор было то, что сразу после их освобождения из спорангия, они имели гладкую поверхность (то есть были не зрелыми, Рис. 3 ч), а собственно процесс их созревания, сопровождающийся формированием орнаментированной оболочки, проходил уже за его пределами, создавая трудности при изучении истинной их скульптуры, имеющей важное таксономическое значение.

В исследуемой колонии исключительно редко наблюдали разновозрастные зигоспоры (Рис. 3 з и, к, л). Вблизи молодых зигоспор выявляли так называемые «копулирующие отростки» (Рис. 3 з, стрелка), принимающие прямое участие в процессе их формирования. Зигоспоры закладывались и формировались при слиянии апексов двух копулирующих отростков. Обнаружено, что поверхность копулирующего отростка тонкогранулярная, то есть по строению идентична таковой зрелого спорангия. Зрелые зигоспоры имели размеры от 15,5 до 20,0 мкм (в среднем, 17,7 мкм); их поверхность отличалась наличием хорошо выраженного рисунка в виде «сот» (Рис. 3 л), составленного из слегка волнистых гребней высотой, в среднем, 1,5 мкм, с неровным наружным краем. Отметим, что, согласно данным из научной литературы [5, 6], зигоспоры характерны для колоний *L. corymbifera*, выделенных от пациентов и из окружающей среды. Особенности строения зрелых зигоспор имеют важное таксономическое значение и наиболее обильны в колониях *L. corymbifera*, выращенных на агаре с дрожжевым экстрактом при 30 и 33 °С, тогда как на сусло-агаре они формируются в меньшем числе [6]. Нам представляется, что характерное для изучаемой колонии наличие редуцированного спороношения (формирование небольшого числа спорангиев и зигоспор может) быть результатом ингибирующего действия антимикотика – амфотерицина В, который применяли для лечения пациентки.

Клетки вегетативного мицелия *in vitro*, как и у тканевых форм гриба, проходили стадии роста, созревания, зрелости и старения. Часто отмечали и полностью отмершие профили гиф с сильно деформированными тонкими клеточными стенками.

В интактных клетках мицелия многочисленные ядра и митохондрии (Рис. 3 п) по числу, топографии, размерам, форме и особенностям тонкого строения были сходны с таковыми мицелия тканевых форм гриба. Профили гиф мицелия различались между собой по степени вакуолизации, что свидетельствовало о том, что они находились на разных стадиях развития. Так, в одном из них вакуоли многочисленные, мелкие (Рис. 3 м), в другом – многочисленные, средних размеров (Рис. 3 п), а в третьем имела место одна или несколько крупных, занимающих основную часть на площади среза гифы. Вакуоли светлые, содержали многочисленные мелкие (0,2-0,4 мкм), тем-

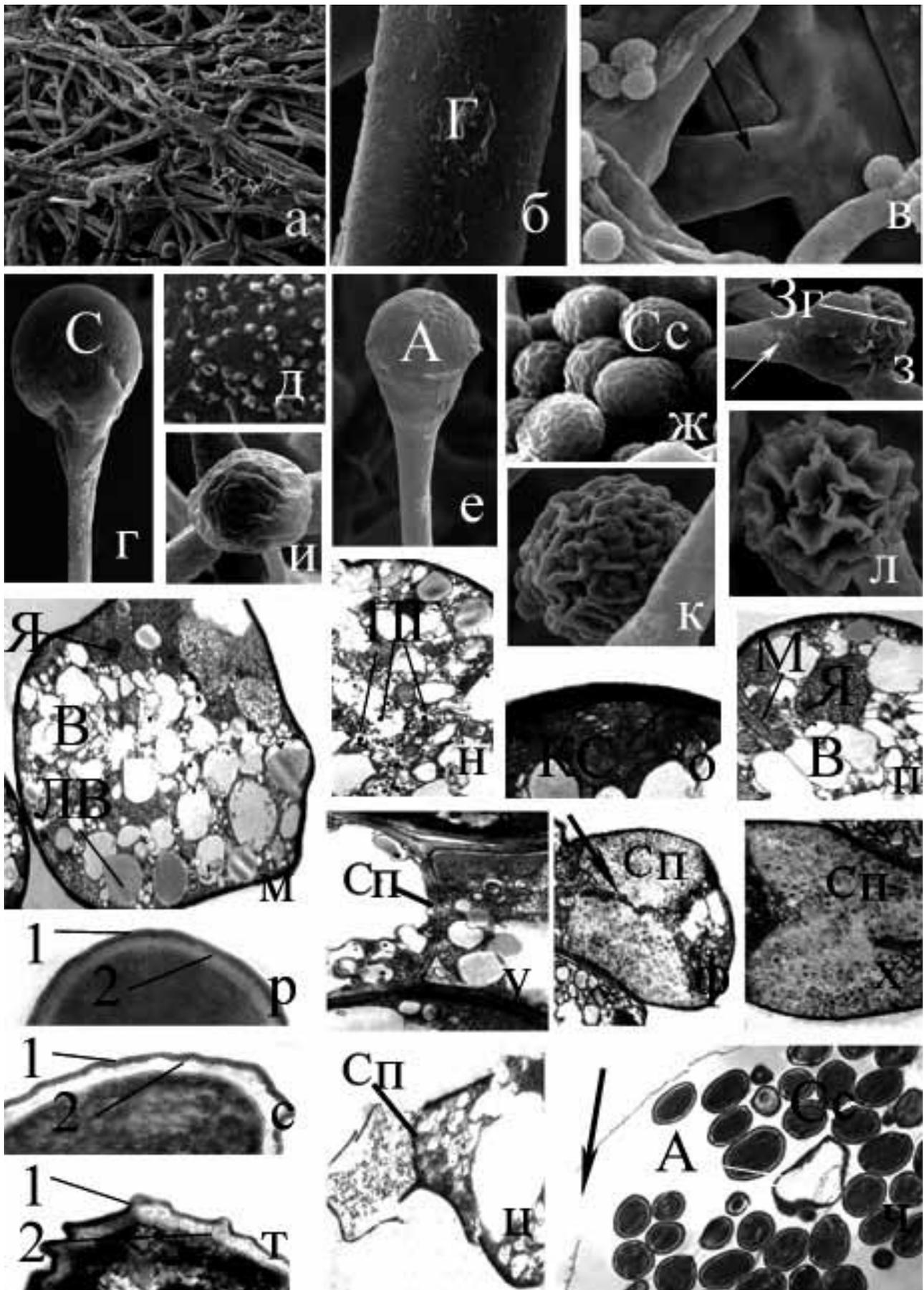


Рис. 3. Особенности строения клеток вегетативного мицелия *Lichtheimia* spp., выращенных *in vitro*, в сканирующем (а-л) и трансмиссионном (м-ч) электронных микроскопах. Ув.: а – х250; б – х9000; в – х7000; г, е, з – х3000; д – х20000; ж, к, л – х12000; и – х40000; о, р, с, т – х25000; м, н, п, у, ф, х, ц – х10000

ные гранулы полифосфатов (Рис. 3 н), равномерно расположенные по площади среза вакуоли. В цитозоле имели место многочисленные липидные капли (0,2-0,3 мкм) умеренной электронной плотности. Усиление уровня вакуолизации в отдельных участках гифы сопровождалось снижением числа митохондрий и запасных включений. Компоненты эндо- мембранной системы, как и в содержимом тканевых форм гриба, встречались редко. Цитозоль плотный, богат свободными рибосомами.

Гифы мицелия не различались между собой по толщине и строению клеточных стенок, в отличие от тканевых форм гриба. Клеточные стенки тонкие (от 0,1 до 0,2 мкм), темные, гомогенные (Рис. 3 о, 2 д). В гифах, образующих спорангии, имели место одиночные, прямые (0,2 мкм), трехслойные (с двумя крайними темными слоями и центральным светлым) сплошные септы (Рис. 3 у). Помимо септ описанного строения, между участками гиф, находящихся на разных стадиях развития (включая старение), выявили «ложные септы». Они представляли собой сильно и симметрично расширенные на довольно большом протяжении (3,0-4,0 мкм) участки периплазматического пространства, заполненные тонкогранулярным содержимым, по морфологии напоминающим слизь (Рис. 3 ф). Описанные расширения периплазматического расширения могли формировать довольно протяженный, тонкий (0,2-0,3 мкм) просвет (аналог септальной поры, Рис. 3 ф, стрелка), по которому сообщался цитозоль близлежащих участков гифы. В случае, если в зоне просвета такой септы плазмалемма смыкалась, сообщение между смежными участками гифы по симпласту полностью прекращалось (Рис. 3 х), что имело место при переходе их на более продвинутые стадии развития, включая старение.

Факт наличия ложных септ в мицелии *Lichtheimia* spp. проливает свет на одну из важных сторон биологии развития объекта настоящего исследования: каким образом протекает рост и развитие апикально растущих гиф, не имеющих регулярно расположенных ригидных септ, особенности строения порового аппарата которых позволяют в пределах одной гифы сосуществовать клеткам, находящимся на разных стадиях развития (основная догма биологии развития мицелиальных септированных грибов). Ложные септы, по-видимому, более лабильны, чем обычные; их присутствие обеспечивает более быстрый рост мицелия, поскольку на их формирование требуется меньше времени и «строительного» материала. Как следует из микрофотографии, представленной на рис. 3 ц, формирование настоящих сплошных септ в конидиеносцах также способствует изоляции формирующихся генеративных структур от стареющих клеток мицелия, что позволяет им благополучно завершать свое развитие. Их присутствие обеспечивает ригидность конидиеносцев и возможность их вертикальной пространственной ориентации, важной для процесса распространения спорангиоспор.

Старение гиф мицелия протекало сходным образом с аналогичными тканевых форм гриба. Отличие состояло лишь в том, что в клеточных стенках гиф без содержимого формировались многочисленные перфорации варьирующей (0,02-0,17 мкм) толщины.

Таким образом, при сравнении ультраструктурной организации тканевых (кожа и подкожная жировая клетчатка) и культуральных форм *L. corymbifera* выявили, что характерной особенностью первых является способность формировать разнообразные (даже в пределах одной гифы) по строению меланифицированные клеточные стенки. Здесь уместно привести данные, представленные в работе Gale R.R (1963), согласно которым клетки мицелия *Mucor corymbifera* (синоним *L. corymbifera*), в ответ на действие противогрибкового антибиотика Ro 2-7758, не различались между собой по строению и формировали в условиях культуры в 6-7 раз более толстые, чем в контроле клеточные стенки, которые, судя по снимкам, представленным в данной работе, не были меланифицированы.

Мы не обнаружили существенных различий в строении клеток вегетативного мицелия тканевых и культуральных форм гриба по числу и строению ядер, а также компонентов цитоплазмы. Отмечена лишь заметно большая способность аккумулировать полифосфатные гранулы клетками мицелия, выращенного на питательной среде, что можно объяснить разной «питательной ценностью» субстратов. Из данных настоящей работы следует, что к числу цитологических критериев вирулентности анализируемого штамма *Lichtheimia* spp. можно отнести способность тканевых форм гриба формировать разнообразные по строению клеточные стенки, что позволяет ему противостоять «натиску» со стороны иммунной системы хозяина и является основной их стратегической «уловкой».

Отметим, что в отличие от объекта настоящего исследования, тканевые формы клеток сильновирulentных штаммов базидиомицетового гриба *Cryptococcus neoformans* [7, 8] синтезировали большее число запасных веществ, формировали одну гигантскую митохондрию, многочисленные пузырьки и пероксисомы, а также сильно утолщенные клеточные стенки, однако они были однообразного строения. Налицо факт наличия различных цитологических преобразований в строении клеток патогенных грибов в зависимости от их таксономического положения.

ВЫВОДЫ

1. Согласно данным сканирующей электронной микроскопии, для клеток вегетативного мицелия и спорангиеносцев *Lichtheimia* spp. *in vitro* было характерно наличие гладкой поверхности, тогда как для зрелых спорангиев и копулирующих отростков – тонкогранулярной.

2. У объекта настоящего исследования формирование специфического рисунка слоя орнаментации

спорангиоспор проходило после их освобождения из спорангия. Поверхность зрелых зигоспор имела хорошо выраженный рисунок в виде «сот».

3. При сравнении ультраструктуры клеток вегетативного мицелия тканевых и культуральных форм *Lichtheimia* spp. выявили, что они были сходны по числу и строению ядер, митохондрий, по типу и количеству аккумулируемых запасных веществ, но

сильно различались по строению клеточных стенок (толщина, форма, электронная плотность, текстура).

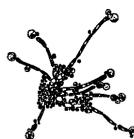
4. Выявленное разнообразие в строении клеточных стенок тканевых форм гриба можно рассматривать в качестве защитного механизма в ответ на воздействие иммунной системы пациента и антифунгальной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roden M.M., Zaoutis T.E., Buchanan W.L., et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: A review of 929 reported cases // Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 41. – P. 634-653.
2. Gomes M.Z., Lewis R.E., Kontoyiannis D.P. Mucormycosis caused by unusual mucormycetes, non-*Rhizopus*, -*Mucor*, and -*Lichtheimia* species // Clin. Microbiol. Rev. – 2011. – Vol. 24 – P. 411-445.
3. Хостелиди С.Н., Аравийский Р.А., Богомолова Т.С. и др. Случай успешного лечения рас-пространенного зигомикоза (*Absidia corymbifera*) у больной острым лейкозом // Проблемы мед. микологии. – 2011. – Т. 13, №2. – P. 116.
4. Степанова А.А., Сеницкая И.А. Ультраструктура клеток *Aspergillus niger*. Вегетативный мицелий // Проблемы мед. микологии. – 2003. – Т. 5, №4. – С. 32-39.
5. Steven C., Diven M.D., Carlos A.A., et al. Intestinal zygomycosis due to *Absidia corymbifera* mimicking necrotizing enterocolitis in a preterm neonate // J. Perinatol. – 2004. – Vol. 24. – P. 794-796.
6. Alastruey-Izquierdo A., Hoffmann K., Sybren de Hoog G., et al. Species recognition and clinical relevance of the zygomycetous genus *Lichtheimia* (syn. *Absidia* Pro Parte, *Mucocladius*) // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 48, №6. – P. 2154-2170.
7. Васильева Н.В., Степанова А.А., Сеницкая И.А. Электронно-микроскопическое изучение биологии развития клеток слабо и сильно вирулентного штаммов *Cryptococcus neoformans* in vitro и in vivo // Проблемы мед. микологии. – 2007. – Т. 9, №2. – С. 47-48.
8. Васильева Н.В., Степанова А.А., Сеницкая И.А. Особенности морфогенеза клеток *Cryptococcus neoformans* в зависимости от вирулентности штаммов // Проблемы мед. микологии. – 2007. – Т. 9, №4. – С. 22-30.

Поступила в редакцию журнала 25.11.2012

Рецензент: Парусов В.Н.



АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ МЕТАБОЛИТОВ *STACHYBOTRYS* SPP. В ОТНОШЕНИЕ *PARAMECIUM CAUDATUM*

**Доршакова Е.В. (н.с.)*, Елинов Н.П.
(проф. кафедры)**

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина
Северо-Западного государственного медицинского
университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург,
Россия

© Доршакова Е.В., Елинов Н.П., 2012

Проблема продукции микотоксинов микроскопическими грибами по-прежнему остается актуальной и в настоящее время. Токсигенными свойствами обладают многие микромицеты-биодеструкторы, в частности Stachybotrys spp., способные вызвать заболевание – стахиботриотоксикоз. Микотоксины – продукты вторичного обмена микромицетов обладают различными химическим строением и путями воздействия на живые макроорганизмы.

Ключевые слова: микромицеты, микотоксины *Stachybotrys* spp., стахиботриотоксикоз

THE ACTIVITY OF SOME *STACHYBOTRYS* SPP. METABOLITES TO *PARAMECIUM CAUDATUM*

**Dorshakova E.V. (scientific collaborator),
Yelinov N.P. (professor of the chair)**

Kashkin Research Institute of Medical Mycology,
North-Western State Medical University named after
I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

© Dorshakova E.V., Yelinov N.P., 2012

The problem of mycotoxins production with microscopic fungi is always actual and today. Many micromycetes-biodestructors possess with toxigenic properties, for example Stachybotrys spp. able to stachybotryotoxicosis. Mycotoxins - products of secondary fungal metabolism possess variable chemical structure and ways of actions in living macroorganisms.

Key words: micromycetes, mycotoxines *Stachybotrys* spp., stachybotryotoxicosis

Продукты жизнедеятельности микромицетов нередко оказывают негативное воздействие на здоровье людей, долгое время пребывающих в помещениях, контаминированных микобиотой. *Stachybotrys* spp. продуцируют широкий спектр метаболитов, в частности, микотоксины трихотеценового ряда, оказывающие цитотоксический и нейротоксический эффекты на живые организмы [1-4]. Они же являются причиной развития стахиботриотоксикоза, характеризующегося поражением слизистых оболочек, кожи, желудочно-кишечного тракта. Изучение особенностей биосинтеза и воздействия метаболитов *Stachybotrys* spp. на живые организмы по-прежнему актуальны.

Общие сведения о метаболитах микромицетов

Метаболиты микромицетов представлены различными группами химических соединений, синтезируемых в результате обменных процессов. Метаболиты могут быть первичными – продуктами матричного синтеза и вторичными – продуктами ферментативных реакций. Первичными метаболитами являются белки (преимущественно – ферменты), а вторичными – вещества иного химического строения, образующиеся, как правило, под каталитическим действием первичных метаболитов [5]. Спектр вторичных метаболитов крайне разнообразен, отличается у микромицетов различных таксонов (классов, порядков, родов, видов и штаммов). Качественный и количественный состав метаболитов изменяется в зависимости от условий окружающей среды: температуры, влажности, состава органических и минеральных веществ.

Метаболиты *Stachybotrys* spp., их воздействие на организм человека

Среди первичных метаболитов *Stachybotrys* spp. привлекают внимание гемолизины и протеиназы, обуславливающие появление геморрагий и кровоизлияний в легких у младенцев с последующим развитием гемосидероза [1,6]. Вторичными метаболитами *Stachybotrys* spp. являются: трихотеценовые микотоксины (триходермин, триходермол, триховерины), макроциклические трихотеценовые микотоксины (сатратоксины G и H, роридины A и E), спироциклические дриманы, долабеллановые дитерпены и атраноны [1-3, 6]. *S. chartarum* – наиболее распространенный вид рода *Stachybotrys*, подразделяемый по спектру метаболитов на хемотип S и хемотип A. К первому относят микромицеты, продуцирующие макроциклические трихотецены, ингибирующие синтез белка и обладающие нейротоксическим и цитотоксическим действиями. К хемотипу A отнесены микромицеты, синтезирующие атраноны [7, 8].

Токсичное действие атранонов в настоящее время мало изучено, известно лишь их раздражающее действие на слизистую оболочку респираторного тракта [1]. Было установлено [9], что микромицеты *S. chartarum* хемотипа A составляют 60%, а хемоти-

* Контактное лицо: Доршакова Евгения Владимировна
Тел.: (812) 303-51-40

па S – 40%. Микромицеты двух хемотипов имеют отличия в последовательности нуклеотидов в гене *Tri 5*, кодирующем триходиевсинтеазу, и в гене *Chs 1*, кодирующем хитинсинтеазу [7, 8]. Среди *Stachybotrys* spp., контаминирующих стены зданий, нередко встречается *S. chlorochalonata*, продуцирующий триходермин, триходермол, а также доллабеллановые дитерпены и атраноны, как микромицеты *S. chartarum* хемотипа А [6].

Локализация метаболитов *Stachybotrys* spp. и пути их воздействия на организм человека

Известно, что трихотеновые микотоксины синтезируются в конидиях, стеригмах, а также конидиеносцах *Stachybotrys* spp. Gregory L. С коллегами [10], используя иммуноцитохимические и иммуногистохимические методы, определили места локализации сатратоксина G и стахилизина – на внутренней части оболочки спор, а также в мицелии микромицетов. *Stachybotrys* spp. оказывают токсичное действие на организм человека при соприкосновении с мицелием, вдыхании спор, а также при попадании в ЖКТ загрязненных им пищевых продуктов. Воздействию метаболитов *Stachybotrys* spp. чаще подвержены фермеры, работники предприятий по обработке волокон растительного происхождения, а также офисные работники и жители квартир, в которых имеются очаги биодеструкции [1, 6].

Stachybotrys spp. чаще обнаруживают в помещениях, на изделиях, содержащих целлюлозу, в частности – на гипсокартоне и обоях [3], также его можно обнаружить на штукатурке, материалах для изоляции труб, стекловолокне [11]. Выявить *Stachybotrys* spp. среди микобиоты, контаминирующей техногенные субстраты, не просто в связи с их низкой скоростью роста на питательных средах *in vitro*, по сравнению с другими микромицетами-биодеструкторами. Среди микромицетов, контаминирующих жилые и офисные помещения Санкт-Петербурга, *S. chartarum* был выявлен в 11 (8,47%) из 77 помещений, из них в 5 случаях – в очагах биоповреждений на штукатурке, в 4 – на обратной стороне обоев, в 2 – на гипсокартоне. Наибольшая концентрация *S. chartarum* в исследуемых образцах составляла 250000 КОЕ/г [12, 13].

В связи с частой встречаемостью *Stachybotrys* spp. в природе, а также обнаружением в больших количествах в техногенных субстратах представляет интерес оценка воздействия его метаболитов в отношении живых организмов.

Активность некоторых метаболитов *Stachybotrys* spp. в отношении *Paramecium caudatum*

Нами оценено суммарное действие метаболитов *Stachybotrys* spp. на одноклеточный эукариотический организм – *P. caudatum*. Были изучены метаболиты 12 штаммов *S. chartarum* и *S. chlorochalonata* (видовую идентификацию осуществляли культуральным и молекулярно-генетическим /ДНК-секвенирование/ методами), в зависимости от продолжительности их

роста и развития, в сравнимых условиях при стремлении выявить различия в степени воздействия на простейшие организмы метаболитов спор и культуральной жидкости микромицетов, выращенных на различных питательных средах, а также на техногенном субстрате (гипсокартон).

В качестве объектов исследования были взяты 11 штаммов *S. chartarum* и 1 штамм *S. chlorochalonata*, выделенные из отделочных материалов в жилых и офисных помещениях Санкт-Петербурга. Материалы исследования: фильтраты культуральных жидкостей *Stachybotrys* spp., выращенных на картофельном отваре с добавлением 2% глюкозы; споры микромицетов, выращенных на солодовом и картофельно-глюкозном агаре, взятые через 11, 21 и 56 суток, а также споры *Stachybotrys* spp., взятые с образцов гипсокартона.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первоначальном этапе в лабораторных условиях проводили посев штаммов, выделенных из строительных материалов, на солодовый агар с последующим выдерживанием в термостате при 28 °С в течение 7 суток. Затем готовили суспензию спор, подсчитывали конидии в камере Горяева. Конидии ($2,6 \cdot 10^6 \pm 0,2 \cdot 10^6$ в 1 мл) объемом 500 мкл вносили в картофельный отвар с 2% глюкозой, на картофельно-глюкозный агар, на солодовый агар и образцы гипсокартона, предварительно смоченные дистиллированной водой. Затем питательные среды с засеянными штаммами микромицетов помещали в термостат при 28 °С на сроки от 11 до 56 дней, а образцы гипсокартона были положены в эксикаторы, один из которых был также помещен в термостат для экспозиции при 28 °С, другой – в лабораторный шкаф для выращивания штаммов *Stachybotrys* spp. при комнатной температуре (22-23 °С). Отбор культуральной жидкости, а также смывы спор с питательных сред и гипсокартона проводили в каждый из временных периодов (11, 21, 56) в трех повторностях. Культуральную жидкость фильтровали через бумажные фильтры ($d = 2$ мкм). Суспензии спор разводили дистиллированной водой до концентрации $2,4 \cdot 10^6 \pm 0,2 \cdot 10^6$ в 1 мл. Фильтраты культуральной жидкости и суспензии спор вносили в равных количествах в пробирки с *P. caudatum*. Фильтраты и *P. caudatum* титровали методом серийных разведений 1:8. В ходе эксперимента фиксировали время внесения культуральной жидкости/суспензии спор, наблюдая за состоянием тест-объекта в световой микроскоп и отмечая время гибели всех особей (при продолжительности эксперимента до 4 часов).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фильтраты культуральных жидкостей 11 штаммов *S. chartarum* (возрастом 11 и 21 день) во всех разведениях вызвали гибель тест-объекта. Наименьшее

время, за которое погибли *P. caudatum*, отмечали в пробах, взятых на 21 день роста микромицетов, и находилось в пределах 0,5-2 минут при равном соотношении фильтратов и среды с простейшими (1:1), а также в интервале 4-10 минут – при их соотношении 1:8. Время гибели всех особей тест-объекта, находящегося под воздействием образцов 11-дневных культур, составлял 0,5-2 минуты (1:1) и 7-69 минут (1:8). Штамм *S. chlorochalonata* на 11 день роста не оказал токсичного воздействия на парамеций, а на 21 день показал наименьшие токсичные свойства. Гибель парамеций при воздействии фильтратов культуральных жидкостей возрастом 56 дней, в отсутствии разведения, наступала в течение 3-9 минут, при разведении 1:8 активность метаболитов выявляли лишь у трех штаммов в течение 78, 86 и 90 минут.

Споры всех микромицетов *Stachybotrys* spp., выращенных на питательных средах, а также гипсокартоне, вызвали гибель *P. caudatum*. Споры штаммов, выращенных на питательных средах в течение 11 и 21 дня, оказали токсичное действие на простейших быстрее (2-10 минут), чем споры штаммов, выращенных на гипсокартоне в течение 21 дня (4-11 минут). Штаммы *Stachybotrys* spp., выращенные на гипсокартоне при комнатной температуре и при 28 °С, проявляли токсичное действие в отношении простейших в одном временном интервале. Воздействие спор микромицетов, выращенных на солодовом и картофельном агаре, в каждый из временных периодов, на парамеций также отличалось незначительно, за исключением одного из штаммов, рост и спороношение которого были слабее, чем у других штаммов. Обнаружили снижение токсичного действия конидий *Stachybotrys* spp. к 56 дню роста на обеих питательных средах, когда гибель *P. caudatum* наступала в интервале (4-84 и 4-79 минут). Обращает на себя внимание значительно более низкая активность метаболитов спор *S. chlorochalonata*, выращенного на питательных средах в течение 56 дней (84 и 79 минут), по сравнению с таковой штаммов *S. chartarum*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что наибольшей активностью в отношении *P. caudatum* обладают фильтраты культуральной жидкости *Stachybotrys* spp., взятые на 21 сутки роста микромицетов. К 56-м суткам наблюдали исчезновение токсичных свойств у большинства штаммов *S. chartarum* и *S. chlorochalonata*. Возможным является синтез микромицетами веществ, способствующих распаду токсичных соединений, по достижении ими предельной концентрации. Штаммы, не утратившие токсичности к этому времени могут обладать более медленным метаболизмом и, следовательно, максимальные значения активности их метаболитов можно будет пронаблюдать и в более поздние сроки, чем у других микромицетов. Также следует учитывать, что спектр метаболитов, синтезируемых различными штаммами, может отличаться и, в связи с различием в структуре, их распада с течением времени в культуральной жидкости может не происходить (или происходить в разное время). Сохранение токсичных свойств культуральных жидкостей может быть связано с иной химической структурой вещества, более медленной скоростью его синтеза.

Активность спор в отношении тест-объекта была выражена слабее, чем культуральной жидкости. Действие метаболитов спор микромицетов, выращенных на питательных средах, было выражено сильнее, чем у микромицетов, выращенных на образцах техногенного субстрата.

ВЫВОДЫ

1. Наибольшее влияние суммарных метаболитов *Stachybotrys* spp. в отношении *P. caudatum* было выявлено при исследовании фильтратов культуральной жидкости микромицетов, выращенных в течение 21 дня.

2. Токсичный эффект взвеси спор и культуральной жидкости *S. chartarum* выражен сильнее, чем *S. chlorochalonata*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pestka J.J., Yike I., Dearborn D.G., et al. *Stachybotrys chartarum*, Trichothecene Mycotoxins and Damp Building – Related Illness: New Insights into a Public Health Enigma // *Toxicological sciences*. – 2008. – Vol. 104. – P. 4-26.
2. Cameron D.G. Toxicity profile of *Stachybotrys chartarum* // A Thesis In Environmental toxicology/ Submitted to the Graduate Faculty of Texas Tech University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of science. – 2009.
3. Доршакова, Е.В. Морфолого-физиологические особенности токсинообразующих грибов - биодеструкторов из рода *Stachybotrys* // *Проблемы медицинской микологии*. – 2011. – Т. 13, №3. – С. 13-21.
4. Беляков Н.А., Щербо А.П., Елинов Н.П., Васильева Н.В. и др. Вклад микробиоты в процессы старения больничных зданий и ее потенциальная опасность для здоровья больных // *Проблемы медицинской микологии*. – 2005. – Т. 7, №4. – С. 3-12.
5. Елинов Н.П. Токсигенные грибы в патологии человека // *Проблемы медицинской микологии*. – 2002. – Т. 4, №4. – С. 3-7.
6. Scott A.M. *Stachybotrys chartarum* (or *S. atra* or *S. alternans*): Review of Toxicological Literature. Integrated Laboratory Systems, Inc. Research Triangle Park, North Carolina. – 2004.
7. Andersen B., Nielsen K.F. and Jarvis B.B. Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production // *Mycologia*. – 2002. – Vol. 94. – P. 392-403.
8. Andersen B., Nielsen K.F. and Thrane U. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorochalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings // *Mycologia*. – 2003. – Vol. 95. – P. 1227-1238.

9. *Jarvis B.B. Stachybotrys chartarum: A fungus for our time// Phytochemistry. – 2003. – Vol. 64. – P. 53-60.*
10. *Gregory L., Pestka J.J., Dearborn D.G. and Rand T.G. Localization of satratoxin-G in Stachybotrys chartarum spores and spore-impacted mouse lung using immunocytochemistry // Toxicol Pathol. – 2004. – Vol. 32. – P. 26-34.*
11. *Hossain M.A., Ahmed M.S. and Ghannoum M.A. Attributes of Stachybotrys chartarum and its association with human disease // J. Allergy Clin Immunol. – 2004. – Vol. 113. – P.200-208.*
12. *Павлова И.Э., Богомолова Т.С., Чилина Г.А., Васильева Н.В., Маметьева А.А. Микобиота жилых и офисных помещений в Санкт-Петербурге и Ленинградской области// Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т.14, №2. – С.118.*
13. *Доршакова Е.В. Микромицеты в естественной среде обитания и в помещениях – их потенциальная опасность для здоровья людей// Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т.14, №3. – С.53-57.*

Поступила в редакцию журнала 13.12.2012

Рецензент: И.А. Босак



ПРОХОР НИКИФОРОВИЧ КИСЕЛЕВ. 100 ЛЕТ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ

**Киселева Е.П. (проф. кафедры),
Елинов Н.П. (проф. кафедры)**

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина
Северо-Западного государственного медицинского
университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург,
Россия

© Киселева Е.П., Елинов Н.П., 2012

PROCHOR NIKIFOROVICH KISELYOV. 100 YEARS FROM THE BIRTH DATE

**Kiseleva Ye.P. (professor of the chair),
Yelinov N.P. (professor of the chair)**

Kashkin Research Institute of Medical Mycology of
North-Western State Medical University named after I.I.
Mechnikov, St.Petersburg, Russia

© Kiseleva Ye.P. (professor of the chair), Yelinov N.P., 2012



Фото.1. Выдающийся многогранный ученый, великолепный педагог, блестящий оратор – таким остался в нашей памяти Прохор Никифорович Киселев

10 августа 2012 года исполнилось 100 лет со дня рождения одного из ярких представителей отечественной школы микробиологов-радиобиологов, заслуженного деятеля науки РФ, профессора Прохора Никифоровича Киселева.

После окончания Смоленского медицинского института, Прохор Никифорович в 1933-1934 гг.

возглавлял отдел санитарной инспекции Восточно-Сибирского края в Иркутске, затем защитил кандидатскую диссертацию в Центральном научно-исследовательском рентгенорадиологическом институте (ЦНИРРИ) в Ленинграде и в 1939 г. был призван в Красную Армию. Во время Великой Отечественной войны возглавлял отдел особо опасных инфекций и противочумный отдел санитарно-эпидемиологической службы Ленинградского Фронта. Был награжден орденом Отечественной Войны II степени, медалями «За оборону Ленинграда», «За победу над Германией» и другими.

В 1946 г. П.Н. Киселев вернулся в ЦНИРРИ, защитил докторскую диссертацию и стал руководителем лаборатории радиационной микробиологии и иммунологии, которую он возглавлял в течение 31 года – до выхода на пенсию в 1982 г. В 1951-1956 гг. Прохор Никифорович исполнял обязанности заместителя директора ЦНИРРИ по научной работе, а в 1957-1962 гг. являлся также профессором и заведующим кафедрой микробиологии Ленинградского химико-фармацевтического института.



Фото. 2. П.Н. Киселев среди сотрудников кафедры микробиологии Ленинградского химико-фармацевтического института, 1953 г.

Фамилии лиц, стоящих в последнем ряду (слева направо): студенты Синяева, Архипова, Максимюк, Фёдорова, Зимина, Орехова, Селезнёва, Быкова, старший лаборант Парамонова Н.К., Лоцова, Медведева, Корсакова, Травкина. Фамилии сотрудников кафедры, сидящих во втором ряду (слева направо): Цыганов В.А. (аспирант), Леонтовская А.П. (старший лаборант), Елинов Н.П. - к.б.н. (декан инженерно-микробиологического факультета), проф. П.Н. Кашкин (зав.каф. микробиологии), Конокотина А.Г. (доцент), Киселёв П.Н. (профессор кафедры), Добромыслов В.В. (ассистент), Безбородов А.М. (аспирант). Фамилии студентов, лежащих на полу в первом ряду (слева направо): Конев, Елизаровский, Шульман, Бойцова.

Научную деятельность П.Н. Киселева отличает многогранность и широта интересов. В 1941 г., совместно с профессором П.Н. Кашкиным, он выпустил учебник «Эпидемиология» и провел исследование по этиологии лимфогранулематоза. В те годы

бытовало представление об инфекционной природе этого заболевания. П.Н. Киселев установил, что выделяемый из крови больных гемолитический микробокк не вызывает заболевания. К этому выводу он пришел, сделав себе прививку микробной культуры, выделенной от больного человека.

Главным направлением его научной деятельности стало исследование роли нарушений проницаемости тканей при лучевом поражении организма. Фактически эта работа положила начало отечественной радиационной микробиологии и иммунологии. В его лаборатории была доказана роль микробных токсинов в генезе основных синдромов лучевой болезни (кишечного, геморрагического и панцитопенического). Этот опыт П.Н. Киселев обобщил в книге «Токсикология инфекционных процессов» (1971), которая получила высокую оценку специалистов в нашей стране и за рубежом. П.Н. Киселевым впервые были заложены основы специфической профилактики бактериальных токсикозов при лучевой болезни и разработаны принципы специфической и неспецифической детоксикации организма, имеющие большое значение для инфекционной патологии и радиобиологии.



Фото 3. П.Н.Киселев среди сотрудников лаборатории радиационной микробиологии и иммунологии Центрального научно-исследовательского рентгено-радиологического института (ЦНИРРИ), 1978 г.

Итог интенсивной научной деятельности П.Н. Киселева составляют свыше 120 научных публикаций. Будучи крупным специалистом в области радиационной микробиологии и иммунологии, П.Н. Киселев в течение 19 лет являлся экспертом ВОЗ и представлял нашу страну на многих конгрессах за рубежом.

В качестве профессора и руководителя кафедры микробиологии Ленинградского химико-фармацевтического института П.Н. Киселев проводил большую работу по подготовке специалистов-микробиологов для отечественной промышленности антибио-

тиков. Его преподавательская деятельность требовала глубоких знаний в различных областях, в том числе – в общей, медицинской и технической микробиологии, общей патологии, микологии и других. Будучи широко образованным педагогом, он всегда призывал учеников не удовлетворяться узко специальными навыками и знаниями.

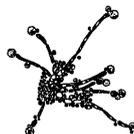
В течение многих лет Прохор Никифорович состоял членом правления и председателем радиационной комиссии Ленинградского отделения Всероссийского общества микробиологов, эпидемиологов и инфекционистов, являлся членом редколлегии журналов «Вестник рентгенологии» и «Медицинская радиология».

Под руководством Прохора Никифоровича выполнено более 20 кандидатских и докторских диссертаций. Он является учителем многих известных российских ученых, среди которых можно назвать академика РАМН К.П. Кашкина, профессоров: А.А. Смородинцева, А.Н. Шутко, В.Б. Климовича, Г.Ф. Железникову и других.



Рис. 4. По случаю 100-летия со дня рождения профессора П.Н. Киселева сотрудники института ФГБУ РНЦРХТ (бывший ЦНИРРИ) возлагают цветы на его могилу на Песочинском кладбище

В день памяти состоялось торжественное возложение цветов на могилу П.Н. Киселева на Песочинском кладбище и семинар, посвященный его жизни и деятельности в стенах Федерального государственного учреждения «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ФГБУ РНЦРХТ – бывший ЦНИРРИ). Ученики, сотрудники и продолжатели дела П.Н. Киселева тепло отзывались о своем руководителе, с благодарностью вспоминали его человечность и доброту. Отечественная микробиологическая наука может по праву гордиться такими беззаветно преданными ей исследователями, как Прохор Никифорович Киселев, внесшими значительный вклад в развитие радиационной биологии в Советское время.



ПАМЯТИ РОАЛЬДА АЛЕКСАНДРОВИЧА АРАВИЙСКОГО (12.05.1939 – 14.11 2012)

TO THE MEMORY OF ROALD ALEKSANDROVICH ARAVIYSKIY



14 ноября 2012 года на 74 году жизни скончался известный ученый-миколог, профессор, доктор медицинских наук Роальд Александрович Аравийский, посвятивший свою жизнь медицинской микологии, изучению тканевых форм патогенных грибов и механизмов иммунной защиты организма.

Роальд Александрович родился 12 мая 1939 года в Новокузнецке в семье крупного ученого, врача-дерматовенеролога А.Н. Аравийского, внесшего значительный вклад в исследования дерматомикозов в России.

Роальд Александрович был начитанным человеком, тяготевшим к рисованию, и поэтому после окончания средней школы поступил в Мухинское

училище. Однако вскоре решил посвятить себя медицине: в 1964 г. с отличием закончил 1-й ЛМИ им. акад. И.П. Павлова и поступил в ординатуру по цитологии и электронной микроскопии в ИЭМ АМН СССР. В 1968 г. он защитил кандидатскую диссертацию на тему «Кладоспориоз мозга», а через год, в 1969 г., по приглашению проф. П.Н. Кашкина, был принят на работу в отдел глубоких микозов ГИДУВа, где организовал патоморфологическую группу.

С 1975 г. Р.А. Аравийский заведовал лабораторией экспериментальной микологии в научно-исследовательском технологическом институте антибиотиков и ферментов медицинского назначения (ВНИТИ-АФ). Под его руководством сотрудники лаборатории провели испытания ряда противогрибковых средств, внедренных в медицинскую практику России.

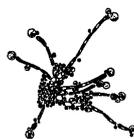
Роальд Александрович, занимаясь изучением клеточных защитных реакций при микотических инфекциях и диагностикой микозов, по этой проблеме в 1978 г. защитил докторскую диссертацию.

В 70-80-е гг. был разработан оригинальный метод цитоспектрометрического определения полиеновых антибиотиков в тканях организма, исследована динамика амфотерицина В в клетках инфекционного очага.

В 1993-1996 гг. Р.А. Аравийский руководил научно-исследовательским отделом глубоких микозов СПбМАПО, с 1996 года работал ведущим научным сотрудником, а с 2004 года – также и профессором кафедры лабораторной микологии на базе НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина в составе Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова.

Р.А. Аравийский плодотворно трудился в области медицинской микологии 47 лет. За это время им подготовлено 6 кандидатов и 6 докторов наук, опубликовано более 150 научных трудов, в том числе: 4 монографии, 1 учебник, 4 учебных пособия.

Коллеги и ученики Роальда Александровича всегда будут помнить его как замечательного специалиста-миколога, тонкого ценителя искусства, а также мудрого, доброго и отзывчивого человека.



КОНГРЕССЫ И КОНФЕРЕНЦИИ

ESCMID (EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES)

2ND CONFERENCE ON INVASIVE FUNGAL INFECTIONS

16-18 JANUARY 2013

ROME, ITALY

ЕВРОПЕЙСКОЕ ОБЩЕСТВО КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

2 КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ИНВАЗИВНЫМ ГРИБКОВЫМ ИНФЕКЦИЯМ

16-18 ЯНВАРЯ, 2013

РИМ, ИТАЛИЯ

Conference Objectives: Participants attending the second conference will learn about the microbiological aspects, pathophysiology, clinical presentations and treatment of common and emerging invasive fungal infections.

Цели Конференции: Участники, посетившие конференцию, узнают о микробиологических аспектах, патофизиологии, клинических представлениях и лечении общих и появляющихся инвазивных грибковых инфекций.

Conference Secretariat

ICO, Marco Moschin, Via Lorenzo Marcello 32, 30126 Lido di Venezia, Italy

Phone +39 041 52 62 530; Fax +39 041 52 71 129

<http://www.escmid.org>

ESCMID (EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES)

2ND CONFERENCE ON THE IMPACT OF VACCINES ON PUBLIC HEALTH

22 - 24 MARCH 2013

PRAGUE, CZECH REPUBLIC

ЕВРОПЕЙСКОЕ ОБЩЕСТВО КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

2 КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ВАКЦИН В ЗДРАВООХРАНЕНИИ

22 - 24 МАРТА 2013

ПРАГА, ЧЕШСКАЯ РЕСПУБЛИКА

Conference Secretariat

ICO, Marco Moschin, Via Lorenzo Marcello 32, 30126 Lido di Venezia, Italy

Phone +39 041 52 62 530; Fax +39 041 52 71 129

<http://www.escmid.org>

Scientific Programme

- The role of WHO-Europe
- The role of ECDC
- Pneumococcal vaccines and their implementation strategy
- Vaccines for adults
- Paediatric and adolescent vaccination
- Vaccines and women: more than a gender issue
- Hepatitis
- Vaccines for viral haemorrhagic fevers
- Novel vaccine targets
- Innovative vaccines for old diseases
- Developing countries
- Technological challenges
- Vaccine policies

Научная Программа

- Роль Европейской ВОЗ
- Роль Европейского центра по предотвращению и контролю болезней
- Пневмококковые вакцины и стратегия их постановки
- Вакцины для взрослых
- Вакцинация детей и юношей
- Вакцины и женщины
- Гепатит
- Вакцины для вирусных геморрагических лихорадок
- Новые мишени для вакцин
- Инновационные вакцины при хронических заболеваниях
- Развивающиеся страны
- Технологические вызовы
- Политика вакцинации

**PRACTICAL COURSE «STATE-OF-THE-ART INFECTION MODELS
FOR HUMAN PATHOGENIC FUNGI»**

FEBRUARY 17 – MARCH 2, 2013

JENA, GERMANY

**ПРАКТИЧЕСКИЙ КУРС «СОВРЕМЕННЫЕ МОДЕЛИ ГРИБОВЫХ
ИНФЕКЦИЙ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА»**

17 ФЕВРАЛЯ - 2 МАРТА 2013

ЙЕНА, ГЕРМАНИЯ

This course is designed to train graduate students, post-docs, and young independent investigators in state-of-the-art infection models to study human fungal pathogens. Training is provided through laboratory exercises and demonstrations, lectures by resident faculty and visiting seminar speakers, and informal discussions.

Этот курс разработан для студентов, постдокторов и молодых независимых исследователей на современных моделях грибковых инфекций изучать микромицеты-патогены человека. Обучение обеспечивается на лабораторных занятиях и лекциях, факультативах, семинарах, а также на неофициальных обсуждениях.

Organisation Office

Department of Microbial Pathogenicity Mechanisms

Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology

- Hans Knöll Institute - Beutenbergstr. 11a, 07745 Jena, Germany

Fon +49 (0) 3641 532-14 00

Fax +49 (0) 3641 532-08 10

<http://www.isham.org>

**23RD EUROPEAN CONGRESS OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND
INFECTIOUS DISEASES**

27-30 APRIL, 2013

BERLIN

**23-Й ЕВРОПЕЙСКИЙ КОНГРЕСС ПО КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И
ИНФЕКЦИОННЫМ БОЛЕЗНЯМ**

27 - 30 АПРЕЛЯ 2013

БЕРЛИН

Organiser:

ECCMID 2013, c/o Congrex Switzerland Ltd., Peter Merian-Strasse 80, 4002 Basel, Switzerland

Tel +41 61 686 77 77; Fax +41 61 686 77 88

Email: basel@congrex.com

Web: www.congrex.com

6TH TRENDS IN MEDICAL MYCOLOGY

1-14 OCTOBER 2013

COPENHAGEN, DENMARK

6 КОНФЕРЕНЦИЯ «ТЕНДЕНЦИИ В МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»

1-14 ОКТЯБРЯ 2013

КОПЕНГАГЕН, ДАНИЯ

Abstract submission will be open as of 1 December 2012.

The deadline for submission of abstracts is 1 June 2013.

Срок подачи тезисов – с 1 декабря 2012.

Крайний срок для подачи тезисов - 1 июня 2013.

Congress Care

Reitscheweg 5A, 5232 BX 's-Hertogenbosch

Mail address: P.O. Box 440, 5201 AK 's-Hertogenbosch, The Netherlands

Tel: +31-73-690 1415; Fax: +31-73-690 1417

info@congresscare.com; www.congresscare.com

**ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
(XVI КАШКИНСКИЕ ЧТЕНИЯ)**

19 - 21 ИЮНЯ 2013

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ, РОССИЯ

Место проведения конференции: Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41.

Оргкомитет Конференции:

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина

ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России

<http://www.mycology.spbmapo.ru>

e-mail: mycoconference@spbmapo.ru

194291, Россия, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28.



**Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)
Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н.Кашкина (НИИ ММ) СЗГМИ им. И.И. Мечникова**

Адрес редакции: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28. Тел.: (812) 303-51-45, факс (812) 510-62-77

E-mail: mycobiota@spbmapo.ru. Заведующая редакцией: Е.С.Гукова.

**North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
Kashkin Research Institute of Medical Mycology**

Address of Editorial Office: Santiago-de-Cuba str., 1/28, Saint Petersburg, 194291, RUSSIA. Tel.: (812) 303-51-45, Fax (812) 510-62-77

E-mail: mycobiota@spbmapo.ru. Manager of Editorial Office: E.S.Gukova

«ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»

Per. № 77-1396 от 20.12.1999 г. ISSN 1999-6780

Журнал включен в реферативный журнал и базы ВИНТИ.

Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной системе по периодическим и продолжающимся изданиям

«Ulrich's Periodicals Directory».

Оригинал-макет — НИИ «Медицинской микологии им. П. Н. Кашкина СЗГМУ».

Подписано в печать 28.12.2012. Формат 60×90 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 18. Тираж 999 экз.

*Редколлегия журнала
«Проблемы медицинской микологии»
поздравляет наших читателей
с Новым годом и Рождеством!*



*Новый год, новый год!
К нам идет и вот...
Станем мы на год взрослей,
Станем лучше и добрей.*

*Год змеи премного значит
Пусть удачей одарит,
Ум пытливый озадачит,
Свежей мыслью опалит.*

*Желаем в Новый год Змеи
Стать чище и мудрей,
Умножить ценности земли
И сохранить друзей!*