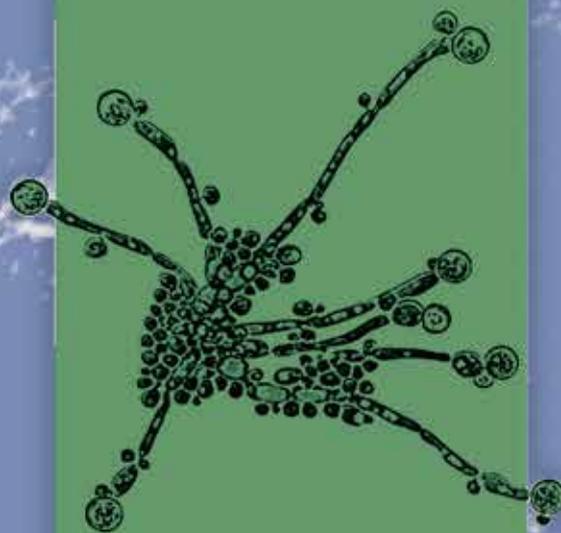


# ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

---

Том 18 №3



---

Problems in medical mycology

Vol.18 №3

**2016**

# ЛОЦЕРИЛ®

КЛИНИЧЕСКИ ДОКАЗАНО,  
ЧТО ЛОЦЕРИЛ СПОСОБЕН  
УБИВАТЬ ГРИБОК **ДАЖЕ ПОД**  
**КОСМЕТИЧЕСКИМ ЛАКОМ.**<sup>1</sup>



ЛОЦЕРИЛ – ПУСТЬ МИР ЛЮБУЕТСЯ ВАШИМИ НОГТЯМИ!

Спрашивайте в аптеках

1. Сигургеирссон Б. и др. Нанесение косметического лака для ногтей не снижает фунгицидное действие лака для ногтей Лоцерил® аморолфина 5% при лечении дистального подногтевого онихомикоза. Микозы. 2016 Май; 59(5):319–26. 2. Внутренние расчеты на основе данных MIDAS MAT декабрь 2014 в категории D1A1.3. Инструкция по медицинскому применению препарата Лоцерил®.

ООО «Галдерма»

125284, г. Москва, Ленинградский проспект, д. 31А, стр. 1, 21 этаж. Телефон/факс: +7 (495) 540-50-17 www.galderma.ru

**GALDERMA**

ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ. ПЕРЕД ПРИМЕНЕНИЕМ  
НЕОБХОДИМО ПРОКОНСУЛЬТИРОВАТЬСЯ СО СПЕЦИАЛИСТОМ

ПТ N012558/01

L\_08.16/001

#### 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

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., prof. (Russia), V.I. Golubev — Ph.D. (Russia), Z.O. Karayev — M.D., prof. (Azerbaijan), K.P. Kashkin — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), V.G. Kornisheva — M.D., prof. (Russia), V.G. Kubas' — 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), S.M. Ozerskaya — Ph.D. (Russia), I. Polachek — M.D. (Israel), Ye.V. Pronina — 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. 18, № 3, 2016*

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

## ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

*Том 18, № 3, 2016*

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

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. Вивiani — доктор  
медицины (Италия), В.И. Голубев — д.б.н., вед.н.с.  
(Россия), Б. Дюпон — доктор медицины (Франция),  
З.О. Караев — д.м.н., профессор (Азербайджан),  
К.П. Кашкин — д.м.н., академик РАМН, профессор  
(Россия), В.Г. Корнишева — д.м.н., профессор  
(Россия), В.Г. Кубас' — 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),  
С.М. Озерская — д.б.н. (Россия), И. Полачек —  
доктор медицины (Израиль), Е.В. Пронина — д.м.н.,  
профессор (Россия), К.И. Разнатовский — 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.И. Титц — доктор  
медицины (Германия), Т.Н. Трофимова — д.м.н.,  
профессор (Россия), О.Г. Хурцилава — д.м.н., проф.  
(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

<i>Тилабердиев Ш.А., Климко Н.Н., Деннинг Д.В.</i> Использование модели Life program для оценки распространенности тяжелых и хронических микотических заболеваний в республике Узбекистан	3
---	---

## КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

<i>Козлова Я.И., Учеваткина А.Е., Бычкова Н.В., Филиппова Л.В., Аак О.В., Пятакова А.В., Фролова Е.В., Давыдова Н.И., Климко Н.Н.</i> Тест активации базофилов в диагностике аллергического бронхолегочного аспергиллеза	7
<i>Шадризова О.В., Шевяков М.А., Десятник Е.А., Пятакова А.В., Богомолова Т.С., Игнатьева С.М., Зюзгин И.С., Успенская О.С., Терскова Т.В., Луфт А.В., Авдеенко Ю.Л., Попова М.О., Волкова А.Г., Зубаровская Л.С., Афанасьев Б.В., Климко Н.Н.</i> Инвазивный аспергиллез органов пищеварения: описание клинического случая и результаты проспективного исследования	12
<i>Подковальников С.Л., Шадризова О.В., Хостелиди С.Н., Десятник Е.А., Борзова Ю.В., Волкова А.Г., Попова М.О., Богомолова Т.С., Зубаровская Л.С., Афанасьев Б.В., Васильева Н.В., Климко Н.Н., Артюшкин С.А.</i> Инвазивный аспергиллез околоносовых пазух у больных в Санкт-Петербурге	16
<i>Котрехова Л.П., Разнатовский К.И., Васильева Н.В., Чилина Г.А., Цурупа Е.Н.</i> Дифлюкан в терапии онихомикоза стоп у больных пожилого и старческого возрастов	20

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

<i>Степанова А.А., Ямагучи М., Чабана Х., Васильева Н.В.</i> Ультраструктурные аспекты миграции клеточных компонентов в ходе почкования <i>Cryptococcus laurentii</i>	24
<i>Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Иванова Л.В., Гоик В.Г., Баранцевич Е.П.</i> Чувствительность к антибиотикам энтеробактерий различного происхождения в многопрофильном стационаре	30
<i>Куварица А.Е., Кураков А.В., Садькова В.С., Громовых Т.И.</i> Нерибосомальные пептиды грибов: биологическая активность и их перспективы в медицине	36
<i>Косевенко А.С., Ананьева Е.П., Яковлев И.П., Юсковец В.Н.</i> Антифунгальная активность новых производных 1,3,4-тиадиазола	42
<i>Степанов А.С., Васильева Н.В.</i> Оценка распространенности механизмов устойчивости <i>Staphylococcus</i> spp. среди изолятов, выделенных из клинического материала	45
<i>Афиногенова А.Г., Околов И.Н., Афиногенов Г.Е., Хинтуба Т.С., Тахтаев Ю.В., Мадай Д.Ю.</i> Перспективы использования полигексанида и глазных капель антибиотиков фторхинолонового ряда в отношении резистентных <i>Staphylococcus epidermidis</i>	49
<i>Заславская М.И., Александрова Н.А., Лукова О.А., Карасева А.Б., Суворов А.Н.</i> Влияние продуктов метаболизма энтерококков на адгезию <i>Candida albicans</i> (Berkhout) к буккальным эпителиоцитам in vitro	55
<i>Шаталова Е.В., Парачина О.В., Чугуев А.С.</i> Экспериментальное обоснование влияния иммунотерапии на механизм формирования госпитальных штаммов – возбудителей гнойно-воспалительных процессов смешанной <i>Candida</i> -бактериальной природы	60

## ХРОНИКА И ИНФОРМАЦИЯ

<i>Елинов Н.П., Рябинин И.А.</i> Аспергиллы в секции Circumdati – новые продуценты оригинального охратоксина А	63
К 75-летию со дня рождения Афиногенова Г.Е.	67

# CONTENTS

## PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

<i>Tilavberdiev Sh.A., Klimko N.N., Denning, D.V.</i> Using of Life program model for evaluation of prevalence of severe and chronic mycotic diseases in republic of Uzbekistan	3
---	---

## CLINICAL MYCOLOGY

<i>Kozlova Y.I., Uchevatkina A.E., Bychkova N.V., Filippova L.V., Aak O.V., Pyatakova A.V., Frolova E.V., Davydova N.I., Klimko N.N.</i> Basophil activation test in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis	7
<i>Shadrivova O.V., Shevyakov M.A., Desyatnik E.A., Pyatakova A.V., Bogomolova T.S., Ignatyeva S.M., Zjuzgin I.S., Uspenskaya O.S., Terskova T.V., Luft A.V., Avdeenko Y.L., Popova M.O., Volkova A.G., Zuborovskaya L.S., Afanasyev B.V., Klimko N.N.</i> Invasive aspergillosis of the digestive system: clinical case and prospective study results	12
<i>Podkovalnikov S.L., Shadrivova O.V., Khostelidi S.N., Desyatnik E.A., Borzova Y.V., Volkova A.G., Popova M.O., Bogomolova T.S., Ignatyeva S.M., Zubarovskaya L.S., Afanasev B.V., Vasilyeva N.V., Klimko N.N., Artyushkin S.A.</i> Invasive aspergillosis of the paranasal sinuses at patients in St. Petersburg	16
<i>Kotrehkova L.P., Raznatovskiy K.I., Vasilyeva N.V., Chilina G.A., Tsurupa E.N.</i> Diflucan in the treatment of feet onychomycosis in patients of elderly and senile age	20

## EXPERIMENTAL MYCOLOGY

<i>Stepanova A.A., Yamaguchi M., Chibana H., Vasilyeva N.V.</i> Ultrastructural aspects of cell components migration during budding in the yeast <i>Cryptococcus laurentii</i>	24
<i>Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Ivanova L.V., Goik V.G., Barantsevich E.P.</i> Sensitivity to antibiotics of different origin enterobacteriaceae in a multidisciplinary hospital	30
<i>Kuvarina A.E., Kurakov A.V., Sadykova V.S., Gromovych T.I.</i> Non-ribosomal peptides of fungi: biological activity and their future potential in medicine	36
<i>Koshevenko A.S., Ananyeva E.P., Yakovlev I.P., Yuskovets V.N.</i> Antifungal activity of new derivatives of 1,3,4-thiadiazole	42
<i>Stepanov A.S., Vasilyeva N.V.</i> Widespread of <i>Staphylococcus</i> spp. resistance mechanisms in isolates from clinical specimens	45
<i>Afinogenova A.G., Okolov I.N., Afinogenov G.E., Hintuba T.S., Takhtaev Yu.V., Maday D. Yu.</i> Perspectives of polihexanide and fluoroquinolone antibiotics eye drops against resistant <i>Staphylococcus epidermidis</i>	49
<i>Zaslavskaya M.I., Aleksandrova N.A., Lukova O.A., Karaseva A.B., Suvorov A.N.</i> Influence of enterococci metabolites on <i>Candida albicans</i> (Berkhout) adhesion to buccal epithelial cells in vitro	55
<i>Shatalova E.V., Parachina O.V., Chuguev A.S.</i> Experimental study of immunotherapy influence of the mechanism of formation of hospital strains – causative agents of purulent-inflammatory processes of mixed <i>Candida</i> -bacterial nature	60

## CHRONICLE AND INFORMATION

<i>Yelinov N.P., Pyabinin I.A.</i> Aspergillus in section Circumdati – a new original producers of ochratoxin A	63
To the 75 <sup>th</sup> anniversary of Afinogenov G.E.	67

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДЕЛИ LIFE PROGRAM ДЛЯ ОЦЕНКИ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ТЯЖЕЛЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ МИКОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В РЕСПУБЛИКЕ УЗБЕКИСТАН

**<sup>1</sup>Тилавбердиев Ш.А. (руководитель научного гранта)\*, <sup>2</sup>Климко Н.Н. (зав. кафедрой), <sup>3</sup>Деннинг Д.В. (директор национального образовательного и исследовательского центра по аспергиллезу при университетском госпитале)**

<sup>1</sup> Республиканский центр по борьбе со СПИДом, Ташкент, Республика Узбекистан; <sup>2</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова (кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии), Санкт-Петербург, Россия; <sup>3</sup> Университет г. Манчестера, Великобритания

© Коллектив авторов, 2016

*Цель работы – предварительная оценка распространенности тяжелых и хронических микотических заболеваний в Республике Узбекистан с помощью модели, предложенной организацией LIFE (Leading International Fungal Education). Расчет проводили по состоянию на 2014 г. Были изучены опубликованные результаты исследований микозов в Узбекистане, при отсутствии официальных данных учитывали сведения из научной литературы о частоте микозов у конкретных групп риска развития грибковых инфекций. Согласно проведенным расчетам, количество больных с тяжелыми и хроническими микотическими заболеваниями составило 535640 человек, острых микотических заболеваний – 12351 случаев, хронических – 523289. С наибольшей частотой выявляли хронический рецидивирующий кандидозный вульвовагинит (513600 случаев), трихофитию волосистой части головы (6414) и рецидивирующий кандидоз полости рта (4950). По результатам исследования установили значительную распространенность микозов в Республике Узбекистан, что обуславливает необходимость более глубокого изучения их эпидемиологических и клинических особенностей и совершенствование мер профилактики.*

**Ключевые слова:** LIFE PROGRAM, микозы, микотические заболевания, Республика Узбекистан

## USING OF LIFE PROGRAM MODEL FOR EVALUATION OF PREVALENCE OF SEVERE AND CHRONIC MYCOTIC DISEASES IN REPUBLIC OF UZBEKISTAN

**<sup>1</sup>Tilavberdiev Sh.A. (head of research grant), <sup>2</sup>Klimko N.N. (head of the chair), <sup>3</sup>Denning, D.V. (Director of the national education and research center for aspergillosis at University hospital)**

<sup>1</sup> Republican Center of AIDS Control, Tashkent, Republic of Uzbekistan; <sup>2</sup> North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov (Chair of clinical mycology, allergology and immunology), St. Petersburg, Russia; <sup>3</sup> The University of Manchester, UK

© Collective of authors, 2016

\* Контактное лицо: Тилавбердиев Шухрат Артыкович, e-mail: shuxrat.tilavberdiev@mail.ru

*Our work was aimed at preliminary estimation of severe and chronic mycotic diseases in Republic of Uzbekistan by dint of a model proposed by LIFE (Leading international fungal education) organization. Calculation was carried out on conditions of 2014. Published results of studying mycoses in Uzbekistan were investigated, in absence of official data information from scientific literature about frequency of mycoses in concrete groups of risk development of fungal infections were taken into account. According accounts performed a number of patients with severe and chronic mycotic diseases formed 535640 people. There were 12 351 cases of acute mycotic diseases, and chronic – 523389. The most frequency was revealed in chronic recurrent candidal vulvovaginitis (513600 cases), scalp trichophytosis (6414) and relapsed oral candidosis (4950). Results of investigation indicate significant prevalence of mycoses in the Republic of Uzbekistan that causes a necessity of a deeper research of their epidemiologic and clinical peculiarities and perfection of preventive measures.*

**Key words:** LIFE PROGRAM, mycoses, mycotic diseases, Republic of Uzbekistan

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы актуальность микозов во всем мире неуклонно растет. Быстрыми темпами возрастают как их частота, так и обусловленная ими летальность [1-5]. Вместе с тем, распространенность различных вариантов микотических поражений, их эпидемиологические особенности остаются малоизученными. С целью международной координации исследований в этом направлении была создана специализированная организация LIFE (Leading International Fungal Education) [6]. С помощью предложенной ею методики определяют предварительные эпидемиологические показатели для микозов во многих странах мира. Мы также попытались использовать данную модель расчета для оценки распространенности микозов в Республике Узбекистан.

Цель данной работы – предварительная оценка распространенности тяжелых и хронических микотических заболеваний в Республике Узбекистан с помощью модели LIFE PROGRAM.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Расчет по методике LIFE проводили по показателям 2014 г. Были изучены опубликованные результаты исследований микозов в Узбекистане. Если официальных данных не существовало, то определяли размеры конкретных групп риска развития грибковых инфекций, а затем для оценки национальной распространенности и заболеваемости использовали данные из научной литературы о частоте микозов у этих групп больных. Кроме того, ориентировались на методические подходы, использованные при аналогичной оценке микозов в Российской Федерации (РФ) [3]. Статистические данные о численности и составе населения Узбекистана получали из органов государственной статистики [7, 8].

При оценке заболеваемости микозами волосистой части головы основывались на данных Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра дерматологии и венерологии (РСНПМЦ).

Число женщин репродуктивного возраста в Узбекистане в 2014 г. составило 8,56 млн. чел. [7]. Количество больных хроническим рецидивирующим кандидозным вульвовагинитом рассчитывали по данным международных эпидемиологических исследований, согласно которым это заболевание возникает у 6% женщин [3].

Сведения о количестве пациентов с ВИЧ/СПИД

**Микотические заболевания в Республике Узбекистан  
(заболеваемость и распространенность по данным за 2014 г.)**

Микотические заболевания		Заболеваемость на 100000 чел.	Распространенность
Острые	Инвазивный аспергиллез	4,80	1477
	Инвазивный кандидоз	5,93	1825
	Криптококковый менингит	0,21	65
	Мукороз	0,08	27
	Пневмоцистная пневмония	5,37	1650
	Микроспория волосистой части головы	2,90	893
	Трихофития волосистой части головы	20,85	6414
			12351
Хронические	Хронический рецидивирующий кандидозный вульвовагинит	3339	513600
	Рецидивирующий кандидоз полости рта	16,09	4950
	Рецидивирующий кандидоз пищевода	6,72	2066
	Хронический аспергиллез легких	2,10	647
	Аллергический бронхолегочный аспергиллез	2,86	879
	Бронхиальная астма с микогенной сенсibilизацией	3,73	1147
			523289
Всего:			535640

#### **Микозы волосистой части головы**

По данным РСНПМЦ, общее количество больных с микроспорией волосистой части головы в 2014 г. составило 893 человека, с трихофитией аналогичной локализации – 6414; заболеваемость из расчета на 100 000 чел. населения – 2,90 и 20,85 больных соответственно. Аналогичные данные по РФ – 40,8 и 1,8 больных соответственно [8]. При сравнении показателей можно отметить не только существенные различия, но и разнонаправленность: если в Узбекистане чаще выявляют трихофитию, то в РФ – микроспорию.

#### **Кандидоз слизистых оболочек**

Хронический рецидивирующий кандидозный вульвовагинит (ХРКВ) – наиболее распространенное микотическое заболевание у женщин. Его особенностью являются весьма частые рецидивы [3]. Число женщин репродуктивного возраста в Узбекистане в 2014 г. – 8,56 млн. человек [9]. По данным международных эпидемиологических исследований, ХРКВ возникает у 6% женщин [6]. Отсюда, количество женщин с этим заболеванием составило 513600 человек, или 3339 случаев на 100 000 населения. Эти данные сравнимы с соответствующими показателями в РФ (2900/100 000) [3].

В 2014 г. в Узбекистане зарегистрировано 30315 пациентов с ВИЧ/СПИД [9] (99,41 чел. на 100 000 населения). Соответственно, число больных ВИЧ с орофарингеальным кандидозом составило 4950 чел. (16,09 случаев на 100 000 населения), с кандидозным эзофагитом – 2066 чел. (6,72). Представленные показатели заболеваемости примерно в два раза ниже аналогичных показателей РФ (42, 4 и 9,42 соответственно) [3].

#### **Инвазивный кандидоз**

Общее количество пациентов в стационарах Узбекистана в 2014 г. составило 4932249 чел. [8], из них с инвазивным кандидозом – 1825 чел. (5,93 случаев на 100 000 населения). Эти данные ниже аналогичного показателя РФ (8,29/100 000 населения) и соответствуют средневропейским показателям [3].

в Узбекистане получили из отчета Республиканского центра по борьбе со СПИДом [9]. По данным научной литературы [3], орофарингеальный кандидоз выявляют у 90% ВИЧ-инфицированных больных, кандидозный эзофагит – у 20% [6].

По результатам исследований Климко Н.Н. с соавторами (2014), частота кандемии и кандидозного перитонита составляет 0,37 на 1000 госпитализированных в стационар больных [3]. Сведения об общем количестве госпитализированных лиц в 2014 г. получили из органов государственной статистики [8].

При оценке гематологических заболеваний ориентировались на данные научно-исследовательского института гематологии и переливания крови (НИИГиПК) МЗ Республики Узбекистан. Риск развития инвазивного аспергиллеза (ИА) у больных с гематологическими заболеваниями определяли по методике Климко Н.Н. с соавт. (2014) [3].

Частоту развития мукороза в общей популяции рассматривали, используя данные о распространенности острого миелоидного лейкоза НИИГиПК МЗ РУз.

Сведения о заболеваемости туберкулезом получали из отчетов органов государственной статистики [8] и документов ВОЗ [10]. Расчет возможных случаев хронического аспергиллеза легких (ХАЛ) проводили по формуле, предложенной Denning D.W. и соавт. [3, 11]. Количество ежегодно возникающих случаев туберкулеза легких с наличием полостей ( $\approx 12\%$  от общего количества)  $\times$  риск развития ХАЛ (22%) + число возникающих случаев туберкулеза без наличия полостей ( $\approx 88\%$  от общей заболеваемости)  $\times$  риск возникновения ХАЛ у этих пациентов (2%).

Предполагаемое число пациентов с аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (АБЛА) определяли по формуле, предложенной Denning D.W. и соавт.: 2,5% количества больных бронхиальной астмой (БА) + 15% взрослых больных муковисцидозом [12]. Число пациентов с БА получали из отчетов органов государственной статистики [8]. Для оценки больных тяжелой БА с микогенной сенсibilизацией (БАМС) учитывали, что 10% пациентов с БА имеют тяжелое течение, из них 33% – микогенную сенсibilизацию [13]. Данные о заболеваемости муковисцидозом получали расчетным путем, исходя из данных научной литературы. При этом учитывали, что количество взрослых пациентов составляет примерно 21% от всех больных муковисцидозом [3, 14].

Для расчета уровня заболеваемости криптококковым менингитом использовали данные Климко Н.Н. с соавт. (2014), согласно которым криптококковый менингоэнцефалит развивается у 0,44 больных с ВИЧ-инфекцией [3].

Число случаев пневмоцистной пневмонии определяли, основываясь на рекомендациях LIFE. По данным этой организации, заболевание развивается у 60% пациентов с ВИЧ, получающих антиретровирусную терапию [6].

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Население Республики Узбекистан в 2014 г. составило 30759,2 тысяч человек: взрослых – 65,3%, женщин – 50,1% [8]. Полученные результаты по количественной оценке микотических заболеваний в республике представлены в таблице.

**Аспергиллез органов дыхания**

Гематологические заболевания, в частности, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), являются важным фактором риска развития инвазивного аспергиллеза (ИА). По среднеевропейским показателям, риск возникновения ИА у этой категории пациентов равен примерно 10% [3]. По данным НИИГиПК, в республике в 2014 г. насчитывали 189 больных с ОМЛ, и, по крайней мере, у 19 из них был ИА. Учитывая то, что в анализируемом году в стране практически не проводили трансплантации органов, общее количество случаев ИА рассчитывали по редуцированной формуле, предложенной Denning D.W.: 10% от количества больных острым миелоидным лейкозом + такое же количество больных без острого миелоидного лейкоза + 1,3% от количества пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), госпитализированных в стационар [3, 11]. В оценке частоты ХОБЛ ориентировались на статистические данные [8] и работы отечественных авторов [15]. В итоге получили 1477 больных ИА (4,80 случаев на 100 000 населения). Этот показатель более чем в два раза превышает данные по РФ (2,27/100000 населения) [3].

Хроническим аспергиллезом легких (ХАЛ) обычно поражаются больные, страдающие хроническими легочными заболеваниями (туберкулезом, саркоидозом, ХОБЛ, муковисцидозом). Общая заболеваемость туберкулезом в Узбекистане в 2014 г. составила 14702 чел. (47,8 /100 000) [8]. Расчет возможных случаев хронического аспергиллеза легких (ХАЛ) проводили по формуле, предложенной Denning D.W. и соавт. [11], в результате получили 647 больных с ХАЛ (2,10 случая на 100 000 населения). В РФ данный показатель был значительно выше (126,12 случая на 100 000 населения) [3].

**Мукороз**

Частоту мукороза в Узбекистане в 2014 г. рассчитывали, используя данные НИИГиПК о заболеваемости ОМЛ. При этом ориентировались на сведения о том, что частота мукороза у больных с ОМЛ составляет 3,6% [3]. Учитывая то, что в Узбекистане в 2014 г. выявлено 189 случаев ОМЛ, 3,6% от этого количества составило 7 случаев мукороза. Но, по данным Климко Н.Н. с соавт. [3], ОМЛ является фактором риска развития мукороза лишь в 25% случаев, в результате общее количество больных мукорозом составило 27 человек (0,08/10000).

**Аллергический бронхолегочный аспергиллез**

При расчете частоты АБЛА учитывали следующие исходные данные: количество больных с бронхиальной астмой в 2014 г. составило 34758 чел., с муковисцидозом – 308 чел., из них 65 взрослых. В итоге выявили 879 пациентов с АБЛА (2,86/100 000), больных БАМС – 1147 чел. (3,73/100 000). Показатели заболеваемости

АБЛА и БАМС оказались значительно ниже таковых по РФ (122,52 и 161,65 на 100 000 населения, соответственно) [3].

**Пневмоцистная пневмония и криптококковый менингит**

Пневмоцистная пневмония и криптококковый менингит – одни из основных оппортунистических инфекций у пациентов с ВИЧ-инфекцией. В Узбекистане, по нашим расчетам, в 2014 г. было 1650 больных пневмоцистной пневмонией, заболеваемость составила 5,37 случая на 100 000 населения, что сопоставимо с аналогичной заболеваемостью в РФ (5,65 случаев на 100 000 населения) [3]. Общая заболеваемость криптококковым менингоэнцефалитом в Узбекистане в 2014 г. составила 65 случаев (0,21/100 000). В России уровень заболеваемости данным микозом оказался идентичным (0,21/100 000) [3].

Высокие показатели заболеваемости пневмоцистной пневмонией и криптококковым менингитом в Узбекистане, как и РФ, безусловно, связаны с достаточно большим количеством больных ВИЧ-инфекцией. Несмотря на внедрение в лечебную практику антиретровирусной терапии, число пациентов, выявляемых на поздних стадиях болезни с тяжелыми вторичными поражениями, продолжает расти [3].

Это первое подобное исследование в республике, где показано, что микозы в Узбекистане, как и во многих других странах, включая РФ, весьма распространены. При этом необходимо уточнить, что мы оценивали не все микотические заболевания, а только те, которые охватываются использованной единой моделью исследования LIFE. Это важно для последующего сравнения полученных результатов с данными по другим странам. Представленные результаты – предварительные и в последующем, по мере интенсификации эпидемиологических исследований, несомненно, будут уточнены и дополнены.

**ВЫВОДЫ**

1. Согласно проведенным расчетам, в 2014 г. в Республике Узбекистан количество больных с тяжелыми и хроническими микотическими заболеваниями составило 535 640 человек.

2. Острых микотических заболеваний насчитывали 12351 случаев, хронических – 523289. С наибольшей частотой выявляли хронический рецидивирующий кандидозный вульвовагинит ((513600 случаев), трихофитию волосистой части головы (6414) и рецидивирующий кандидоз полости рта (4950).

3. По результатам исследования установили значительную распространенность микозов в Республике Узбекистан, что обуславливает необходимость более глубокого изучения их эпидемиологических и клинических особенностей и совершенствование мер профилактики.

**ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА**

1. Борзова Ю.В., Богомолова Т.С. Инвазивные микозы в Санкт-Петербурге// Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, №1. – С. 355.
2. Васильева Н.В., Н.Н. Климко Н.Н., Цинзерлинг В.А. Диагностика и лечение инвазивных микозов: современные рекомендации// Вестник СПбМАПО. – 2010. – №4. – С. 5-18.
3. Климко Н.Н., Козлова Я.И., Хостелиди С.Н. и др. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели LIFE PROGRAM// Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, №1. – С. 3-8.
4. Тилавбердиев Ш.А., Мавлянова Ш.З. Микозы и ВИЧ-инфекция// Мед. журнал Узбекистана. – 2015. – №5. – С. 67-71.

5. *Brown G.D., Denning D.W., Gow N.A., et al.* Hidden killers: human fungal infections // *Sci. Transl. Med.* – 2012. – Vol. 19, №4 (165). – P. 165rv13.
6. *LIFE (Leading international fungal education)*. Официальный сайт организации – [www.LIFE-worldwide.org](http://www.LIFE-worldwide.org)
7. Аналитическая справка по основным демографическим показателям. <https://www.minzdrav.uz/news/detail.php?ID=36535>
8. *Статистические материалы* о деятельности учреждений здравоохранения Республики Узбекистан в 2014 году. – Ташкент, 2015. – 296 с.
9. *Национальный доклад* о ходе выполнения декларации о приверженности делу борьбы с ВИЧ/СПИД специальной сессии генеральной ассамблеи ООН. Республика Узбекистан. Отчетный период: январь – декабрь 2014. – Ташкент, 2015. – 24 с.
10. *Узбекистан: профиль страны по туберкулезу*. ВОЗ. [https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=/WHO\\_HQ\\_Reports/G2/PROD/EXT/TBCountryProfile&ISO2=UZ&outtype=html&LAN=RU](https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=/WHO_HQ_Reports/G2/PROD/EXT/TBCountryProfile&ISO2=UZ&outtype=html&LAN=RU)
11. *Denning D.W., Pleuvry A., Cole D.C.* Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis // *Bull World Health Organ.* – 2011. – Vol. 1, №89(12). – P. 864-72.
12. *Denning D.W., Pleuvry A., Cole D.C.* Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults // *Med. Mycol.* – 2012. – Vol. 4. – P. 1-10.
13. *Denning D.W., O'Driscoll B.R., Hogaboam C.M., et al.* The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence // *Eur. Respir. J.* – 2006. – Vol. 3. – P. 615-26.
14. *Муковисцидоз: болезнь, лечение, надежды/* Под ред. С. А. Красовского. – М., 2013. – 127 с.
15. *Ахмедов Б.Р., Гиясов Х.З., Таикулов М.М.* Хроническая обструктивная болезнь легких: компьютерная томография высокого разрешения в диагностике эмфиземы и облитерирующего бронхолита // *Молодой ученый.* – 2014. – №3. – С. 137-142.

Поступила в редакцию журнала 28.06.2016

Рецензент: В.М. Волжанин



## ТЕСТ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ В ДИАГНОСТИКЕ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО БРОНХОЛЕГОЧНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА

<sup>1</sup>Козлова Я.И. (доцент кафедры)\*, <sup>2</sup>Учеваткина А.Е. (с.н.с.), <sup>3</sup>Бычкова Н.В. (с.н.с.), <sup>2</sup>Филиппова Л.В. (с.н.с.), <sup>2</sup>Аак О.В. (в.н.с.), <sup>1</sup>Пятакова А.В. (старший лаборант кафедры), <sup>2</sup>Фролова Е.В. (зав. лаб.), <sup>3</sup>Давыдова Н.И. (зав. лаб.), <sup>1</sup>Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: <sup>1</sup>Кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии и <sup>2</sup>НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина; <sup>3</sup>Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2016

Аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА) – заболевание легких, возникающее у больных бронхиальной астмой или муковисцидозом, вызванное гиперчувствительностью к антигенам *Aspergillus spp.* АБЛА характеризуется плохо контролируемым течением фоновой патологии и развитием дыхательной недостаточности. Кожные и провокационные пробы с грибковыми аллергенами как методы диагностики АБЛА *in vivo* не всегда обладают достаточной надежностью результатов, при этом провокационные пробы могут привести к опасному осложнению в виде анафилактического шока. В статье описано первое в России использование теста активации базофилов для выявления микогенной аллергии в качестве метода диагностики гиперчувствительности 1 типа *in vitro*. Установлено, что применение этого теста позволяет дифференцировать АБЛА и атопическую бронхиальную астму без микогенной сенсibilизации и открывает новые возможности для диагностики аллергического бронхолегочного аспергиллеза.

**Ключевые слова:** аллергический бронхолегочный аспергиллез, *Aspergillus spp.*, микогенная аллергия, тест активации базофилов

## BASOPHIL ACTIVATION TEST IN THE DIAGNOSIS OF ALLERGIC BRONCHOPULMONARY ASPERGILLOSIS

<sup>1</sup>Kozlova Y.I. (associate professor of the chair), <sup>2</sup>Uchevatkina A.E. (senior scientific collaborator), <sup>3</sup>Bychkova N.V. (senior scientific collaborator), <sup>2</sup>Filippova L.V. (senior scientific collaborator), <sup>2</sup>Aak O.V. (leading scientific collaborator), <sup>1</sup>Pyatakova A.V. (senior laboratorian of the chair), <sup>2</sup>Frolova E.V. (head of the laboratory), <sup>3</sup>Davydova N.I. (head of the laboratory), <sup>1</sup>Klimko N.N. (head of the chair)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: <sup>1</sup>Chair of clinical mycology, allergology and immunology and, <sup>2</sup>Kashkin Research Institute of Medical Mycology; <sup>3</sup>All-Russian Center of Extremal and Radiation Medicine, Russian Ministry of Extreme Situations, St. Petersburg, Russia

\* Контактное лицо: Козлова Яна Игоревна,  
Тел.: (812) 303-51-46

©Collective of authors, 2016

Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) is a lung disease arising in patients with bronchial asthma or cystic fibrosis caused by the hypersensitivity against antigens of *Aspergillus spp.* ABPA is characterized by poorly controlled over background pathology and the development of respiratory failure. Skin and provocation tests with fungal allergens as methods of diagnosis of ABPA *in vivo* do not always have sufficient reliability of results, while provocative tests can cause dangerous complications in the form of anaphylactic shock. The first in Russia use of basophil activation test for the detection of fungal sensitization as a method of diagnosis of hypersensitivity type 1 *in vitro* have been described in this article. It was found that the use of this test allows us to differentiate ABPA and atopic asthma without fungal sensitization and opens up the new opportunities for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis.

**Key words:** allergic bronchopulmonary aspergillosis, *Aspergillus spp.*, basophil activation test, fungal sensitization

## ВВЕДЕНИЕ

Аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА) – заболевание легких, обусловленное гиперчувствительностью к *Aspergillus spp.*, которое осложняет течение бронхиальной астмы и муковисцидоза [1, 2]. Развитие АБЛА утяжеляет течение фоновой патологии и способствует прогрессированию дыхательной недостаточности [3]. По данным D.W. Denning и соавт., вероятное количество больных АБЛА составляет около 4,8 млн. пациентов среди общего количества (193 млн.) больных бронхиальной астмой по всему миру [4]. В Российской Федерации расчетное количество больных АБЛА – 175 тысяч человек [5]. Своевременная диагностика АБЛА очень важна, поскольку помогает предупредить прогрессирование этого хронического инвалидизирующего заболевания легких и начать специфическую антимикотическую терапию [6].

Микогенная сенсibilизация – значимый патогенетический компонент АБЛА. Важно выявление сенсibilизации именно к *Aspergillus spp.*, так как, по мнению многих авторов, она ассоциирована с более высокой частотой развития бронхоэктазов и тяжелым течением бронхиальной астмы [7-10]. На сегодняшний день в качестве средств специфической диагностики гиперчувствительности к грибковым аллергенам врачи располагают только кожными тестами и определением специфических IgE-антител (sIgE). Ингаляционный провокационный тест с антигенами *Aspergillus spp.* не рекомендуют в связи с возможностью развития фатального бронхоспазма [3, 11]. К недостаткам кожного тестирования относят риск развития побочных реакций организма на дополнительную антигенную нагрузку, а также возможность возникновения ложноположительных и ложноотрицательных результатов [12]. Несмотря на большой прогресс в современной аллергодиагностике, определение sIgE связано с рядом трудностей. Иммуноглобулины этого класса характеризуются низким содержанием в сыворотке крови, могут отсутствовать в циркуляции, но быть фиксированными на клетках-мишенях – базофилах и тучных клетках [13]. Таким образом, в рутинной практике специалисты часто сталкиваются с проблемой подтверждения неясных результатов кожных тестов и определения sIgE независимым методом.

В настоящее время ведут поиск новых тестов, которые помогут выявить патогенетические механизмы аллергии, диагностировать и дифференцировать псевдоаллергические реакции. Одно из наиболее перспективных направлений аллергодиагностики *in vitro* – тест активации базофилов специфическими аллергенами с

помощью проточной цитометрии [14-17].

Базофилы периферической крови и тканевые тучные клетки являются ключевыми эффекторными клетками в реакциях гиперчувствительности немедленного типа. Они важны в дифференцировке Т-хелперов 2-го типа (Th2) путем секреции цитокинов и антигенной презентации, что имеет большое значение в развитии IgE-опосредованного хронического аллергического воспаления, и играют ключевую роль в IgG-опосредованной системной анафилаксии [18]. Кроме того, базофилы и тучные клетки также могут быть вовлечены и в другие типы аллергического и неаллергического ответов, в основе которых лежат иные механизмы реакции: активация комплемента, не-IgE-опосредованная стимуляция и прямое цитотоксическое (неиммунологическое) воздействие. Поэтому изучение функциональной активности базофилов имеет важное диагностическое значение [19]. Принцип теста активации базофилов сводится к тому, что при контакте аллергена с молекулами фиксированных на базофилах IgE запускается каскад ферментных реакций, приводящих к дегрануляции и появлению на клеточной поверхности дополнительных молекул. К таким молекулам относятся, например, маркер дегрануляции CD63 и активационные молекулы CD203c, CD13, CD107a, CD643 [20]. В настоящее время наиболее изученными и перспективными в аллергодиагностике маркерами активации базофилов считают CD63 и CD203c [21, 22].

Тест активации базофилов как провокационный тест *in vitro* рекомендуют для диагностики аллергических реакций I типа в дополнение к традиционным способам определения sIgE и кожным пробам. Кроме того, этот тест можно использовать для контроля десенсибилизации и специфической иммунотерапии [21, 23, 24]. Опубликованы, в том числе и нашей стране, результаты применения теста активации базофилов в диагностике инсектной, пищевой, пыльцевой, лекарственной аллергии, а также хронической крапивницы [14-17, 25, 26]. В 2012 г. Gernez и соавторы представили результаты применения теста активации базофилов для диагностики АБЛА у больных муковисцидозом [27], где показали, что тест активации базофилов дает возможность дифференцировать колонизацию дыхательных путей больных муковисцидозом и сенсбилизацию к *Aspergillus*. Ряд исследователей считает, что тест активации базофилов, в сочетании с определением sIgE к *Aspergillus* и общего IgE, способствует своевременному выявлению всех случаев АБЛА у больных муковисцидозом и в дальнейшем может быть использован у больных бронхиальной астмой [27-29]. Данных об использовании теста активации базофилов с грибковыми аллергенами в России не найдено.

Цель работы – изучить возможности применения теста активации базофилов с аллергенами *Aspergillus fumigatus in vitro* методом проточной цитометрии для выявления микогенной аллергии у больных аллергическим бронхолегочным аспергиллезом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 136 больных бронхиальной астмой различной степени тяжести. Медиана возраста – 32 года (от 5 до 71 года). Использовали клинические, аллергологические, иммунологические и инструмен-

тальные методы исследования. При подозрении на АБЛА выполняли компьютерную томографию органов грудной клетки.

Аллергологическое обследование включало кожные прик-тесты с шестью грибковыми аллергенами: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Candida* («Allergopharma», Германия). С помощью иммуноферментного анализа определяли уровень общего IgE (ООО «Полигност», Россия) и sIgE к грибковым, бытовым и эпидермальным аллергенам (панель биотинилированных аллергенов «Алкор Био», Россия) в сыворотке крови.

Уровень контроля симптомов и степень тяжести бронхиальной астмы выявляли в соответствии с критериями «Глобальной стратегии лечения и профилактики бронхиальной астмы» (GINA, 2014). Для обнаружения микогенной сенсбилизации применяли критерий, предложенный международными экспертами ISHAM [30]: положительный кожный прик-тест ( $\geq 3$  мм) и/или выявление в сыворотке крови уровня специфического IgE к грибковому аллергену, соответствующего классу 1 и выше ( $\geq 0,35$  МЕ/мл). Диагноз АБЛА устанавливали на основании критериев Agarwal R. et al., 2013 г [31].

Тест активации базофилов выполняли на базе лаборатории клинической иммунологии Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России. Кровь для исследования забирали натошак из кубитальной вены. В качестве антикоагулянта использовали гепарин. Постановку исследуемых проб осуществляли в течение 1-2 часов от момента забора крови. Изучение активации базофилов проводили в многоцветном анализе методом проточной цитометрии с применением набора Allergenicity Kit (Cellular Analysis of Allergy, BECKMAN-COULTER) в соответствии с инструкцией производителя. Базофилы идентифицировали с помощью маркеров CD3-CRTH2+CD203c+ (CRTH2 – хемоаттрактантный рецептор, который экспрессируется на нескольких типах клеток крови, в том числе базофилах, Th2), а выявление активации базофилов – по увеличению содержания клеток с высокой экспрессией CD203c. Методика теста активации базофилов Allergenicity Kit: 100 мкл цельной периферической крови окрашивали тройным коктейлем моноклональных антител CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7 в присутствии буферного раствора (отрицательный контроль), анти-IgE антител – антител к комплексу IgE с высокоаффинным рецептором для IgE (FcεR1) (положительный контроль) и аллергенов *A. fumigatus* в течение 15 минут при 37 °C на водяной бане в темноте. Далее проводили лизис эритроцитов лизирующим фиксирующим реагентом, входящим в набор Allergenicity Kit. В каждой пробе оценивали 500 базофилов методом проточной цитометрии в мультипараметрическом протоколе с многоэтапным гейтированием.

Таким образом, у каждого пациента исследовали спонтанную активацию базофилов – долю клеток CD3-CRTH2+CD203c++ от общего количества базофилов в пробе с буферным раствором, что дает возможность разграничить уровень экспрессии молекул покоящихся клеток по сравнению с состоянием активации клетки. Оценку положительного контроля, обеспечивающего имитацию связывания аллергена с комплексом

sIgE/FcεR1 на мембране базофилов, применяли для анализа способности базофилов к активации. Для стимуляции базофилов в работе использовали аллергены *A. fumigatus* двух производителей: «BUEHLMANN», Flou-CAST-Allergens, BAG-M3 (Швейцария) и «Алкор-Био» (Россия).

Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA for Windows (версия 6.0). Оценивали значимость различий количественных показателей в независимых выборках по U-критерию Манна-Уитни. Достоверными различиями сравниваемых параметров считали значения  $p < 0,05$ . Степень зависимости между показателями определяли с помощью ранговой корреляции Спирмена.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, плесневые микроорганизмы являются широко распространенными источниками аллергенов в окружающей среде. В многочисленных исследованиях показана высокая частота микогенной сенсибилизации у больных бронхиальной астмой. По данным Agarwal R. и соавт., которые провели мета-анализ 21 исследования, у больных БА частота сенсибилизации к *Aspergillus* spp. составила 28%, а развитие АБЛА – 12,9% [11].

В микологической клинике СЗГМУ им. И.И. Мечникова в Санкт-Петербурге при обследовании 136 больных бронхиальной астмой микогенную сенсибилизацию выявили у 57 человек, что составило 42% от общего числа обследованных. Результаты аллергологического обследования сопоставимы с другими исследованиями. Самую высокую частоту микогенной сенсибилизации отмечали к *Aspergillus* spp. (25,7%). Частота сенсибилизации к другим микроорганизмам составила: *Penicillium* spp. – 22,6%, *Alternaria* spp. – 17,1%, *Mucor* spp. – 13,8%, *Cladosporium* spp. – 12,7%, *Rhizopus* spp. – 1,6%. На основании результатов углубленного микологического и рентгенологического обследований АБЛА выявили у 7 (5,1%) больных бронхиальной астмой.

В данное исследование включили 5 пациентов с АБЛА в возрасте от 34 до 63 лет, (медиана – 41). Контрольную группу составили 5 больных атопической

бронхиальной астмой без микогенной сенсибилизации в возрасте от 22 до 63 лет (медиана – 45). Пациентам обеих групп в дополнение к стандартному аллергологическому обследованию провели тест активации базофилов с аллергенами *A. fumigatus* (табл.).

Установлено, что спонтанная активация базофилов не различалась у больных АБЛА и БА и колебалась в пределах от 1,4% до 8,6%. Активация базофилов анти-IgE антителами (положительный контроль) у пациентов с АБЛА была выше, чем у больных БА.

Отметим, что для оценки уровня активации базофилов по экспрессии CD203c в ответ на инкубацию с аллергеном используют не только определение количества активированных базофилов, но и индекс стимуляции (ИС). ИС – отношение процента активированных базофилов в пробе с аллергеном к проценту их спонтанной активации в нестимулированном контроле. Для выявления сенсибилизации к *Aspergillus* spp. у больных муковисцидозом Mirković B. и соавторы рассматривают диагностически значимым ИС более 1,36 [29]. В нашем исследовании тест с аллергеном считали положительным при ИС 1,1 и более.

При использовании в тесте активации базофилов аллергенов *A. fumigatus* различных производителей получены сопоставимые данные. В крови больных АБЛА определено от 9,2 до 93,8% базофилов, активированных аллергеном *A. fumigatus* («Алкор Био», Россия), и от 15,2 до 95,4% – стимулированных аллергеном *A. fumigatus* BAG-M3 («BUEHLMANN», Швейцария). ИС колебался от 1,1 до 18,0 и от 1,8 до 48,6 соответственно. Данные теста активации базофилов пациента с АБЛА представлены на рисунке.

В группе сравнения установлено достоверно более низкое количество сенсибилизированных базофилов. После внесения в пробу специфических аллергенов уровни активированных базофилов были не выше фоновых значений и колебались в пределах от 2,6 до 7,6% и от 1,4 до 8,0% при использовании для стимуляции аллергенов различных производителей. ИС не превышал значения 0,9 в первом случае и 1,05 – во втором. Следовательно, в группе пациентов с бронхиальной астмой при выполнении аллерген-индуцированной активации клеток сенсибилизации к *A. fumigatus* не выявили.

Таблица

Показатели теста активации базофилов с аллергенами *A. fumigatus*

Пациенты	Уровень sIgE <i>Aspergillus</i> (МЕ/мл)	Спонтанная активация базофилов, %	Активация базофилов анти-IgE антителами, %	Кол-во активированных базофилов, % «Алкор Био»	ИС	Кол-во активированных базофилов, % «Buehlmann»	ИС
<i>Группа 1. Аллергический бронхолегочный аспергиллез</i>							
Пац. 1	1,3	8,6	71,0	9,2	1,1	15,2	1,8
Пац. 2	6,5	1,4	41,0	11,2	8,0	68,0	48,6
Пац. 3	6,6	6,4	41,2	41,6	6,5	52,6	8,2
Пац. 4	1,0	4,5	67,0	76,2	16,9	83,0	18,5
Пац. 5	18,0	5,2	87,8	93,8	18,0	95,4	18,3
Me	6,47	5,2	67	41,6	6,5	68	18,3
Iq-Hq	1,25-6,60	4,5-6,4	41,2-71	11,2-76,2	3,7-16,9	52,6-83,0	8,8-18,5
<i>Группа 2. Бронхиальная астма</i>							
Пац. 6	0,01	4,2	9,6	2,6	0,8	1,4	0,3
Пац. 7	0,01	6,6	45,0	5,6	0,9	1,6	0,2
Пац. 8	0,01	8,0	37,0	4,8	0,6	5,2	0,7
Пац. 9	0,02	8,3	21,0	7,6	0,9	8	0,96
Пац. 10	0,03	3,8	32,6	3,2	0,8	4	1,05
Me	0,01	6,6	32,6	4,8	0,8	4	0,7
Iq-Hq	0,01-0,02	4,2-8,0	21,0-37,0	3,2-5,6	0,8-0,9	1,6-5,2	0,3-0,96
p	0,01	0,75	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01

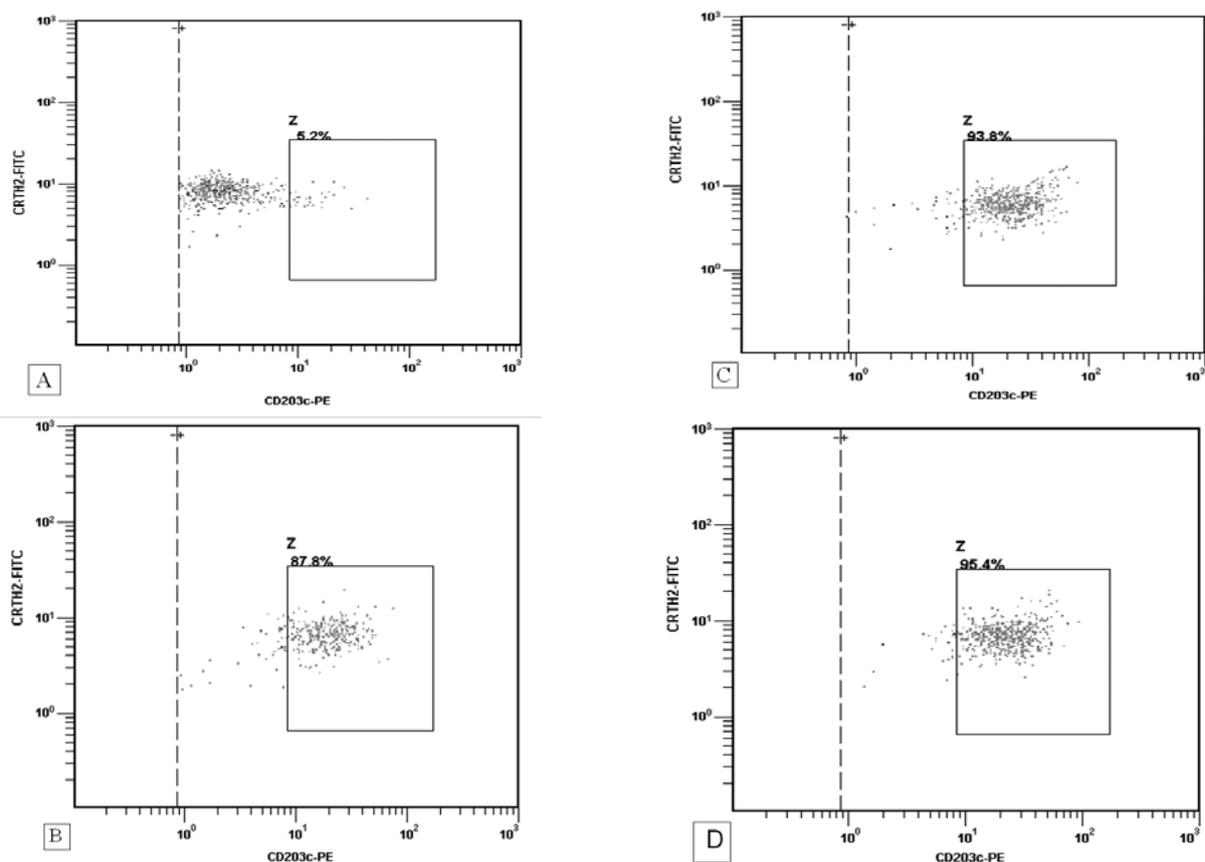


Рис. Данные теста активации базофилов (АБЛА, пациент 5): А – спонтанная активация базофилов (отрицательный контроль); В – активация базофилов анти-IgE антителами (положительный контроль); С – активация базофилов аллергеном *A. fumigatus* «Алкор-Био», Россия; D – активация базофилов аллергеном *A. fumigatus* «Buelmann», Швейцария.

Установлены достоверные различия по уровням sIgE к *A. fumigatus* у больных АБЛА и атопической БА. Таким образом, исследованные группы пациентов различались как по содержанию sIgE к *A. fumigatus* в сыворотке крови, так и по количеству активированных аллергенами базофилов, что подтверждено данными корреляционного анализа. Определена прямая положительная корреляционная связь между уровнями sIgE к *A. fumigatus* и количеством базофилов, активированных аллергенами *A. fumigatus* («Алкор Био»), и ВAG-M3 ( $r=0,73$ ;  $r=0,76$  соответственно, при  $p<0,05$ ).

При анализе полученных данных установили, что тест активации базофилов выявил сенсibilизацию к *A. fumigatus* у всех обследованных больных АБЛА. В то же время, у пациентов с БА без микогенной сенсibilизации результаты теста *in vitro* с использованными аллергенами были отрицательными. Итоги теста соответствовали данным анамнеза, положительным результатам кожных проб и sIgE к *A. fumigatus*, что может быть показателем высокой специфичности и чувствительности предложенного метода. Тест активации базофилов может быть рекомендован для использования в алгоритме диагностики микогенной аллергии. Преимуществом метода являются безопасность для пациента и возможность стандартизации. Кроме того, он может быть использован как экспресс-тест, так как учет результатов проводят через один час от начала исследования, при этом возможна количественная оценка степени сенсibilизации организма.

Диагностика микогенной аллергии – актуальная задача современной медицины. Гиперчувствительность к

грибковым аллергенам играет важную роль в патогенезе не только АБЛА, но и тяжелой бронхиальной астмы с микогенной сенсibilизацией, аллергического микотического риносинусита и других хронических заболеваний органов дыхания [1-4, 8, 9, 32]. Своевременное выявление этих заболеваний необходимо для назначения адекватной противовоспалительной и антимикотической терапии. В том случае, когда выполнение провокационных исследований связано с риском развития системных реакций, а для проведения кожных проб имеются противопоказания, особенно важны методы диагностики *in vitro*. Тест активации базофилов с помощью проточной цитометрии – доступный и перспективный метод исследования гиперчувствительности немедленного типа. В настоящее время тест может быть использован в качестве дополнительного метода диагностики микогенной аллергии.

## ВЫВОДЫ

1. У больных бронхиальной астмой частота сенсibilизации к *Aspergillus* spp. составила 25%, частота развития аллергического бронхолегочного аспергиллеза – 5,1%.
2. У всех больных АБЛА с помощью теста активации базофилов была подтверждена сенсibilизация к *A. fumigatus*.
3. Тест активации базофилов – перспективный метод для лабораторной диагностики микогенной аллергии и оценки ее влияния на степень поляризации иммунного ответа по Th2 типу.

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Agarwal R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis // *Chest*. – 2009. – Vol. 135. – P. 805-826.
2. Hogan C., Denning D.W. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and related allergic syndromes // *Semin Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – Vol. 32. – P. 682-692.
3. Agarwal R., Chakrabarti A., Shah A., et al. For the ABPA complicating asthma ISHAM working group Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria // *Clinical & Experimental Allergy*. – 2013. – Vol. 43. – P. 850-873.
4. Denning D.W., Pleuvry A., Cole D.C. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults // *Med Mycol.* – 2013. – Vol. 51. – P. 361-370.
5. Климко Н.Н., Козлова Я.И., Хостелиди С.Н. и др. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели LIFE program // *Проблемы медицинской микологии*. – 2014. – № 1. – С.3-9.
6. Agarwal R. What is the current place of azoles in allergic bronchopulmonary aspergillosis and severe asthma with fungal sensitization // *Expert Rev Respir Med.* – 2012. – Vol. 6. – P. 363-371.
7. Fairs A., Agbetile J., Hargadon B. et al. IgE sensitisation to *Aspergillus fumigatus* is associated with reduced lung function in asthma // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2010. – Vol. 182. – P. 1362-1368.
8. Menzies D., Holmes L., McCumesky G. et al. *Aspergillus* sensitization is associated with airflow limitation and bronchiectasis in severe asthma // *Allergy*. – 2011. – Vol. 66. – P. 679-685.
9. Agarwal R., Noel V., Aggarwal A.N. et al. Clinical significance of *Aspergillus* sensitization in bronchial asthma. – *Mycoses*. – 2011. – Vol. 54. – P. 531-538.
10. Agbetile J., Fairs A., Desai D. et al. Isolation of filamentous fungi from sputum in asthma is associated with reduced post-bronchodilator FEV(1) // *Clin Exp Allergy*. – 2012. – Vol. 42. – P.782-791.
11. Agarwal R., Aggarwal A.N., Gupta D., Jindal S.K. *Aspergillus* hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma: systematic review and metaanalysis // *Int J Tuberc Lung Dis.* – 2009. – Vol.13. – P. 936-944.
12. Oppenheimer J., Nelson H.S. Skin testing // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2006. – Vol. 96. – P. 6-12.
13. Karasuyama H., Tsujimura Y., Obata K., Mukai K. Role for basophils in systemic anaphylaxis // *J Anaphylaxis. Chem Immunol Allergy*. – 2010. – Vol. 95. – P. 85-97.
14. Бычкова Н.В. Применение метода проточной цитометрии для диагностики аллергических заболеваний // *Справочник заведующего КДЛ*. – 2016. – №4. – С.21-29.
15. Hausmann O.V., Gentinetta T., Bridts C.H., Ebo D.G. The basophil activation test in immediate-type drug allergy // *J. Immunol. Allergy Clin. North Am.* – 2009. – Vol.29, №3. – P. 555-566.
16. Potapińska O., Górska E., Zawadzka-Krajewska A. The usefulness of CD203c expression measurement on basophils after activation with grass pollen and *Dermatophagoides pteronyssinus* antigens // *Preliminary study. Pneumonol. Alergol. Pol.* – 2009. – Vol. 77, № 2. – P. 138-144.
17. Peternej A., Šilar M., Eržen R. Basophil activation test (BAT) in «in vitro» diagnosis of hymenoptera venom hypersensitivity // *Zdravn. Vest.* – 2008. – Vol. 77. – P.183-187.
18. Karasuyama H., Tsujimura Y., Obata K., Mukai K. Role for basophils in systemic anaphylaxis // *J Anaphylaxis. Chem Immunol Allergy*. – 2010. – Vol. 95. – P. 85-97.
19. Kang M.G., Song W.J., Park H.K. et al. Basophil Activation Test with Food Additives in Chronic Urticaria Patients // *Clinical Nutrition Research*. – 2014. – Vol. 3. – P. 9-16.
20. Boumiza R., Debarb A.L., Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent development in clinical studies, standardization and emerging perspectives // *Clin Mol Allergy*. – 2005. – Vol. 3. – P. 9-13.
21. Chirumbolo S., Vella A., Ortolani R. et al. Differential response of human basophil activation markers: a multiparameter flow cytometry approach // *Clin and Molec Allergy*. – 2008. – Vol.6. P. 12.
22. Mikkelsen S., Bibby B.M., Dolberg M.K.B. et al. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy // *Clin and Molec Allergy*. – 2010. – P. 8-12.
23. Eberlein B., Suarez I.L., Darson U. et al. A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics // *Clin et Experim Allergy*. – 2010. – P. 1-8.
24. Lund G., Jacobi H., Skov P.S. et al. Effect on cell surface markers following allergen-induced desensitization of human whole-blood basophils // *Int Arch Allergy Immunol.* – 2010. – Vol. 153. – P. 323-334.
25. Ebo D.G., Bridts C.H., Hagendorens M.M. et al. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology // *Clinical Cytometry*. – 2008. – Vol. 74 B. – P. 201-210.
26. Синельникова Н.А., Бычкова Н.В., Калинина Н.М. Особенности иммунного ответа и активации базофилов у детей с хронической крапивницей // *Медицинская иммунология*. – 2015. – Т. 17, № 1. – С. 39-46.
27. Gernez Y, Dunn CE, Everson C, et al. Blood basophils from cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis are primed and hyper-responsive to stimulation by *Aspergillus* allergens // *J Cyst Fibros.* – 2012. – Vol. 11. – P. 502-510.
28. Gernez Y, Walters J, Mirković B, et al. Blood basophil activation is a reliable biomarker of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis // *Eur Respir J.* – 2016. – Vol. 47. – P. 177-185.
29. Mirković B., Lavelle G.M., Azim A.A. et al. The Basophil surface marker CD203C identifies *Aspergillus* species sensitization in patients with cystic fibrosis // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2016. – Vol. 137. – P. 436-443.
30. Denning D.W., Pashley C., Hartl D. et al. Fungal allergy in asthma—state of the art and research needs // *Clinical and Translational Allergy*. – 2014. – Vol. 4. – P.14.
31. Agarwal R.A., Chakrabarti A., Shah D. et al. For the ABPA complicating asthma ISHAM working group 2013. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria // *Clinical & Experimental Allergy*. – 2013. – Vol. 43. – P. 850-873.
32. Glass D., Amedee R.G. Allergic fungal rhinosinusitis A Review // *The Ochsner Journal*. – 2011. – Vol. 11. – P. 271-275.

Поступила в редакцию журнала 06.09.2016

Рецензент: В.С. Митрофанов

# ИНВАЗИВНЫЙ АСПЕРГИЛЛЕЗ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРЕНИЯ: ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ И РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОСПЕКТИВНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

<sup>1</sup>Шадривова О.В. (ассистент кафедры)\*, <sup>1</sup>Шевяков М.А. (профессор кафедры), <sup>1</sup>Десятник Е.А. (врач-миколог), <sup>1</sup>Пятакова А.В. (старший лаборант кафедры), <sup>1</sup>Богомолова Т.С. (зав. лаб.), <sup>1</sup>Игнатьева С.М. (в.н.с.), <sup>2</sup>Зюзгин И.С. (зав. отд.), <sup>3</sup>Успенская О.С. (зав. отд.), <sup>3</sup>Терскова Т.В. (зав. отд.), <sup>3</sup>Луфт А.В. (зав. отд.), <sup>1</sup>Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.), <sup>4</sup>Попова М.О. (врач-гематолог), <sup>4</sup>Волкова А.Г. (врач-пульмонолог), <sup>4</sup>Зубаровская Л.С. (зам. директора), <sup>4</sup>Афанасьев Б.В. (директор), <sup>1</sup>Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

<sup>1</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии; <sup>2</sup> НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова; <sup>3</sup> Ленинградская областная клиническая больница; <sup>4</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2016

*Поражение органов пищеварения развивается у 1,5% больных инвазивным аспергиллезом, из них первичное поражение возникает у 10%, вследствие гематогенной диссеминации – у 90%. Основными факторами риска являются длительная и выраженная лимфоцитопения и нейтропения, лечение глюкокортикостероидами, а также пребывание в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) и сопутствующая бактериальная или вирусная инфекция. Основная локализация: печень – 50%, селезенка – 50%, кишечник – 20%, пищевод – 10%; возбудители – *Aspergillus fumigatus* и *A. niger*. Характерна высокая летальность в течение 12 недель – 50%. Показана терапия вориконазолом и хирургическое удаление пораженных тканей.*

**Ключевые слова:** *Aspergillus*, инвазивный аспергиллез, микоз органов пищеварения, острый миелоидный лейкоз

## INVASIVE ASPERGILLOSIS OF THE DIGESTIVE SYSTEM: CLINICAL CASE AND PROSPECTIVE STUDY RESULTS

<sup>1</sup>Shadrivova O.V. (assistant of the chair), <sup>1</sup>Shevyakov M.A. (professor of the chair), <sup>1</sup>Desyatnik E.A. (physician-mucologist), <sup>1</sup>Pyatakova A.V. (senior laboratorian of the chair), <sup>1</sup>Bogomolova T.S. (head of the laboratory), <sup>1</sup>Ignatyeva S.M. (leading scientific collaborator), <sup>2</sup>Zuzgin I.S. (head of the department), <sup>3</sup>Uspenskaya O.S. (head of the department), <sup>3</sup>Terskova T.V. (head of the department), <sup>3</sup>Luft A.V. (head of the department), <sup>1</sup>Avdeenko Y.L.

\* Контактное лицо: Шадривова Ольга Витальевна, тел.: (812) 303-51-46

(senior scientific collaborator), <sup>4</sup>Popova M.O. (physician-hematologist), <sup>4</sup>Volkova A.G. (physician-pulmonologist), <sup>4</sup>Zuborovskaya L.S. (deputy director), <sup>4</sup>Afanasyev B.V. (director), <sup>1</sup>Klimko N.N. (head of the chair)

<sup>1</sup> North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Chair of clinical mycology, allergology and immunology;

<sup>2</sup> Scientific Research Institute named after N.N. Petrov;

<sup>3</sup> Leningrad Regional Clinical Hospital; <sup>4</sup> I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2016

*The damage of the digestive tract develops in 1,5% of patients with invasive aspergillosis; of which the primary lesion occurs in 10%, due to hematogenous dissemination – in 90%. The main risk factors are prolonged and severe lymphopenia and neutropenia, glucocorticosteroid therapy, as well as stay in intensive care units and intensive care unit (ICU) and concomitant bacterial or viral infection. The main localization: liver – 50%, spleen – 50%, intestine – 20%, esophagus – 10%. The main pathogens are *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. Characterized by high mortality within 12 weeks – 50%. Condition requires treatment with voriconazole and surgical removal of the lesion.*

**Key words:** acute myeloid leukemia, *Aspergillus*, fungal infection of the digestive system, invasive aspergillosis

## ВВЕДЕНИЕ

Микозы органов пищеварения давно не считают казуистикой гастроэнтерологии. Широкое применение в современной медицине иммуносупрессивных препаратов, эпидемия СПИД, возрастающая частота онкологических заболеваний и сахарного диабета привели к появлению большого количества микотических поражений ротоглотки, пищевода, печени, кишечника и др. В то же время микозы органов пищеварения чаще представлены кандидозом слизистых оболочек, а также инвазивным кандидозом с поражением печени и селезенки. В научной литературе хорошо представлены клиника, диагностика и лечение кандидоза органов пищеварения, более того, имеются международные и национальные рекомендации по лечению этих вариантов кандидоза. О поражениях пищеварительного тракта и органов брюшной полости плесневыми грибами известно гораздо меньше.

Цель нашего исследования – представление клинического случая, результатов проспективного исследования и анализ литературы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мы провели проспективное исследование и ретроспективный анализ случаев аспергиллеза за период 1998-2016 гг. В исследование включали случаи «доказанного» или «вероятного» инвазивного аспергиллеза по критериям Европейской организацией по исследованию и лечению рака (EORTC/MSG, 2008) [3]. Пациентам выполняли компьютерную томографию (КТ) легких в режиме высокого разрешения, магнитную резонансную томографию, фибробронхоскопию (ФБС) с забором бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), плевральные и люмбальные пункции, а также биопсию тканей и патоморфологические исследования. Лабораторная диагностика ИА включала серологическое, микроскопическое, культуральное и гистологическое исследования. Наличие галактоманна в сыворотке крови и БАЛ оценивали иммуноферментным методом с использованием специфической диагностической тест-системы PLATELIA® *Aspergillus* (BIO-RAD

Laboratories, США). Диагностически значимым считали индекс оптической плотности (ИОП) выше «0,5» в сыворотке крови и БАЛ. Из операционного, биопсийного и аутопсийного материала готовили гистологические препараты, окрашивая срезы гематоксилином-эозином, проводили PAS-реакцию и окраску по методу Гомори-Грокотта для выявления элементов гриба.

Полученные данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA for Windows. Также мы проанализировали данные из научной литературы в базах PubMed и www.aspergillus.org.uk. При поиске информации использовали следующие ключевые слова: *invasive aspergillosis, gastrointestinal tract, aspergillosis of digestive tract*.

#### Описание клинического случая.

42-летний пациент поступил в отделение гематологии №2 Ленинградской областной клинической больницы (ЛОКБ) с рецидивом острого монобластного лейкоза в декабре 2015 г.

Анамнез заболевания: в начале января 2015 г. впервые заметил увеличение шейных лимфоузлов, в течение следующего месяца отмечал повышение температуры тела до субфебрильных значений, профузную потливость по ночам и в течение дня, нарастание слабости и сонливость. При обследовании в ЛОКБ в апреле 2015 г. в клиническом анализе крови выявили лейкоцитоз ( $19,2 \cdot 10^9/\text{л}$ ) и наличие бластов (10%). При осмотре обнаружили увеличение подчелюстных, шейных, надключичных и подмышечных лимфоузлов от 3,0 до 6,0 см, а также лейкомиды на коже туловища и конечностей, гиперпластический гингивит. В миелограмме: миелокарициты –  $300 \cdot 10^9/\text{л}$ , бласты – 59,8%. При КТ-исследовании органов брюшной полости выявили поражение висцеральных лимфоузлов. На основании иммунофенотипирования, молекулярно-генетического и цитогенетического анализа костного мозга установлен диагноз «острый монобластный лейкоз, М5 вариант по FAB классификации». Курсы индукции ремиссии («7+3», «НАМ» и «НАI») были осложнены развитием постцитостатической панцитопении – агранулоцитоз продолжительностью 15 суток, анемия и тромбоцитопения тяжелой степени, а также повторными эпизодами нейтропенической лихорадки с ответом на комбинированную антибактериальную терапию. В контрольной миелограмме от мая 2015 г.: бласты – 4,8% на фоне достаточной клеточности костного мозга. На фоне лечения достигнута клинико-гематологическая ремиссия с сохранением очагов экстрамедуллярного поражения (периферическая и висцеральная лимфоаденопатия). 02.09.2015 г. провели алло-ТГСК. Восстановление показателей периферической крови: лейкоциты  $>1 \cdot 10^9/\text{л}$  - Д + 24; нейтрофилы  $>0,5 \cdot 10^9/\text{л}$  - Д + 20; тромбоциты  $>20 \cdot 10^9/\text{л}$  - Д + 20 от алло-ТГСК. КТ органов грудной полости – без патологии. Проявления острой РТПХ с поражением кожи купировали применением такролимуса и топическими стероидами. Сохранялась полная ремиссия ОМЛ, донорский химеризм  $>97\%$ .

С ноября 2015 г. пациент заметил появление плотных безболезненных образований на шее справа. В ЛОКБ диагностировали экстрамедуллярный рецидив. С 01.12.2015 г. прекращена проводимая до этого иммуносупрессивная терапия для купирования «реакции трансплантат против хозяина» (РТПХ) и начата

цитостатическая терапия «IdaFLAG». Для стимуляции гемопоэза применяли филграстим. Постцитостатический период осложнился развитием агранулоцитоза, анемии и тромбоцитопении тяжелой степени. На фоне аплазии кроветворения развилась фебрильная нейтропения, резистентная к многокомпонентной антибактериальной терапии, появились клинические признаки пневмонии. При компьютерной томографии (КТ) органов грудной клетки определяли фокусы мелкоочаговой инфильтрации в легких. Тест на галактоманнан в промывной жидкости из бронхов – отрицателен. Тем не менее, с учетом факторов риска, клинических и рентгенологических признаков, диагностировали «возможный» ИА с поражением легких. Проводили терапию амфотерицином В (АМВ) 0,3 мг/кг/сут с клиническим эффектом.

30.12.2015 г. возник рецидив фебрильной нейтропении, лихорадка носила упорный характер с резистентностью к многокомпонентной антибактериальной терапии в сочетании с антимикотической. При посевах крови не получено роста гемокультур. На КТ ОГК от 02.01.2016 г. – выраженная отрицательная динамика в виде появления новых очагов в обоих лёгких, появление гидроторакса и гидроперикарда. Провели коррекцию антимикотической терапии: АМВ отменили, к лечению добавили вориконазол в первые сутки – 800 мг, далее – 400 мг/сут. Продолжили терапию антибиотиками широкого спектра действия, введения колониестимулирующего фактора (КСФ). Наблюдали клинический ответ на лечение и положительную КТ-динамику. Однако сохранялась гипофункция трансплантата с тенденцией к нейтропении после повторных введений Г-КСФ. С 16.01.2016 г. у пациента возобновилась лихорадка, прогрессировала дыхательная недостаточность. При посеве крови получена культура *Klebsiella pneumoniae*, чувствительная к имипенему. По данным КТ ОГК: нарастание количества очагов с образованием полостей, гидронефроторакс, пневмомедиастинум, свищевой ход между пищеводом и правой плевральной полостью (Рис. 1).

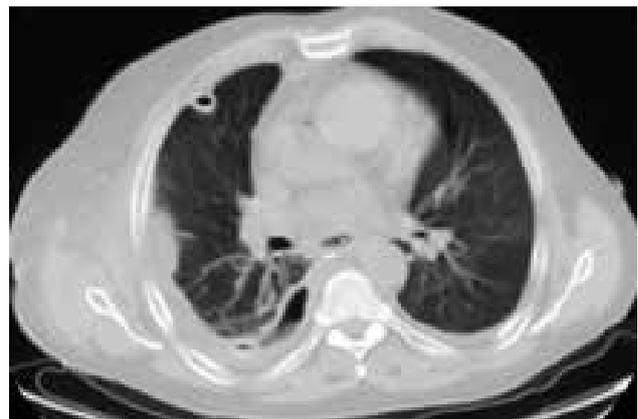


Рис. 1. КТ органов грудной полости (январь, 2016 г.).

По жизненным показаниям выполнено оперативное вмешательство. Торакотомия справа. Резекция грудного отдела пищевода. Лапаротомия. Гастростомия по Витцелю. Постоперационный диагноз: сегментарный некроз пищевода, осложнившейся перфорацией, пиотораксом справа, задним медиастинитом. При гистологическом исследовании послеоперационного материала в пищеводе обнаружили септированный

мицелий, сходный с аспергиллами. При повторном серологическом исследовании тест на галактоманнан – положителен, ИОП=7,18. При исследовании плевральной жидкости наблюдали рост грибов *Aspergillus* spp. и *Saccharomyces cerevisiae*, чувствительных к вориконазолу, а также рост *Enterococcus faecium*. Диагностировали: смешанный бактериально-грибковый сепсис; сегментарный некроз пищевода с перфорацией, обусловленный *Aspergillus* spp.; инвазивный микоз с поражением легких, плевры, обусловленный *Aspergillus* и *Saccharomyces cerevisiae*; задний медиастинит, эмпиема плевры. Продолжили лечение вориконазолом 400 мг/сутки, многокомпонентную антибактериальную трансфузионную и симптоматическую терапию. Пациент переведен на парентеральное питание.

Несмотря на проводимое лечение, нарастала дыхательная недостаточность, рецидивировала фебрильная лихорадка, появилась неврологическая симптоматика. Через 1,5 месяца от начала антимикотической терапии, наступил летальный исход. При исследовании аутопсийного материала в тканях легких, плевре, пищеводе был обнаружен септированный мицелий, ветвящийся под острым углом, и скопления дрожжевых клеток (Рис. 2).

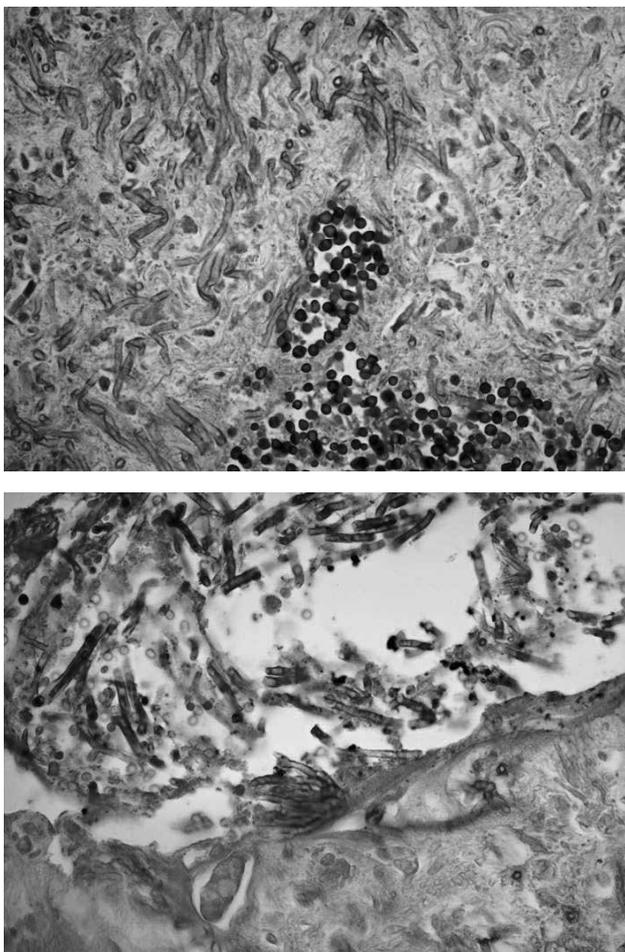


Рис. 2. Гистологическое исследование аутопсийного материала.

**Анализ данных регистра.** В настоящее время в регистр больных ИА насчитывает 620 пациентов из различных стационаров Санкт-Петербурга, из них, преимущественно, взрослые – 79%, подростки и дети – 21%, мужского пола – 57%. Основным очагом инфек-

ционного процесса при ИА являются легкие (изолированное поражение или в сочетании с другими локализациями) – 93%.

Аспергиллез пищеварительного тракта и органов брюшной полости выявили у 10 больных, что составляет примерно 1,5%, возраст – от 5 до 67 лет, из них 8 взрослых и двое детей. Среди фоновых заболеваний преобладали острый миелоидный (40%) и острый лимфобластный лейкоз (20%). Негематологические заболевания составили 40%. Основными факторами риска были: продолжительная лимфоцитопения – 80% (медиана дней – 19); нейтропения – 70% (медиана дней – 11), нахождение в ОРИТ – 60%; глюкокортикостероиды получали 60% пациентов, у 40% больных развитию аспергиллеза органов пищеварения сопутствовала тяжелая бактериальная или вирусная инфекция, у двух – в анамнезе был сахарный диабет.

В большинстве случаев (90%) поражение органов пищеварения возникло вследствие гематогенной диссеминации, первичным очагом инфекции преимущественно были легкие (80%). Экстрапульмональные очаги инфекции наиболее часто обнаруживали в печени (50%), селезенке (50%), поражение центральной нервной системы наблюдали у 40% больных, реже поражался кишечник (20%) и пищевод (10%). Изолированный аспергиллез желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) диагностировали лишь у одного пациента.

Клинические признаки аспергиллеза органов пищеварительного тракта были неспецифичны. Лихорадку наблюдали у 100% пациентов; 60% больных имели септическое состояние, перитонеальные симптомы выявили у 40%, кишечное кровотечение – у 20%.

«Доказанный» аспергиллез с поражением пищеварительного тракта и органов брюшной полости был установлен у 70% пациентов (50% – гистологическое исследование биоптатов и 20% – исследование аутопсийного материала). Тест на галактоманнан был положителен в сыворотке крови у 50% больных. При посеве биоптатов и послеоперационного материала *Aspergillus* spp. обнаружили у 20% пациентов. Возбудителями были *A. fumigatus* и *A. niger*.

Антимикотическую терапию проводили 80% больных, преимущественно применяли вориконазол (76%), реже использовали каспофунгин (12%) и АМВ (12%). Хирургическое лечение выполнили у 30% пациентов.

Общая выживаемость больных аспергиллезом в течение 12 недель составила 50%, в течение года – 40% (Рис. 3).

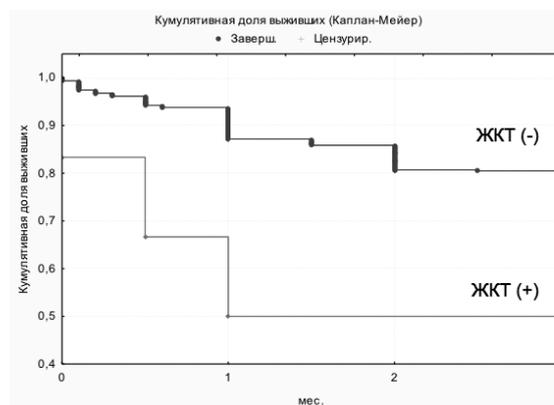


Рис. 3. Сравнение выживаемости больных ИА в зависимости от поражения ЖКТ.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Споры грибов *Aspergillus*, как правило, не выживают на поверхности слизистой оболочки ЖКТ. В случае нарушения механизмов врожденного иммунитета, дисфункции клеточных факторов защиты или нарушения целостности слизистых оболочек, становится возможным инвазивный рост грибов. Аспергиллез пищеварительного тракта и органов брюшной полости наблюдаются редко и, в основном, он является результатом гематогенной диссеминации у больных с выраженным иммунодефицитом. По нашим данным, поражение 2-х и более органов отмечают от 7% до 9% случаев у различных категорий пациентов [2]. Как правило, первичным очагом поражения являются легкие.

Изолированное поражение ЖКТ описано в единичных публикациях. Летальность широко варьирует и, в среднем, по данным европейских исследователей, составляет от 47 до 60% [3]. Характерной особенностью при данной локализации аспергиллезной инфекции является вовлечение в процесс мезентериальных сосудов, внутрисосудистый тромбоз с последующей ишемией и некрозом тканей [4].

Клинические признаки аспергиллеза органов пищеварения неспецифичны, основными проявлениями могут быть лихорадка и желудочно-кишечное кровотечение, нередко приводящие к летальному исходу. При анализе данных из научной литературы выявили, что для большинства пациентов характерно появление перитонеальных симптомов [3-5]. В связи с этим, у всех пациентов с факторами риска при появлении симптомов поражения органов пищеварения необходимо проводить диагностические мероприятия для исключения микотической инфекции.

Ранняя диагностика ИА с поражением пищеварительного тракта и органов брюшной полости является

трудной задачей ввиду тяжести состояния пациентов и невозможности выполнения инвазивных процедур, КТ-признаки неспецифичны. «Золотой стандарт» диагностики ИА – гистологическое исследование биоптатов, также применяют прямую микроскопию, культуральный и серологический методы.

Препаратом выбора для лечения ИА ЖКТ является вориконазол; альтернативные препараты – липидный АМВ и каспофунгин, кроме того, показано хирургическое удаление очага поражения [6, 7].

## ВЫВОДЫ

1. Поражение органов пищеварения при инвазивном аспергиллезе возникает у 1,5% пациентов, из них первичное поражение – у 10%, вследствие гематогенной диссеминации – у 90%.

2. Факторы риска: продолжительная лимфоцитопения, нейтропения, лечение глюкокортикостероидами, длительное пребывание в ОРИТ и сопутствующая тяжелая бактериальная или вирусная инфекция.

Возбудители – *A. fumigatus* и *A. niger*.

3. Локализация: печень – 50%, селезенка – 50%, кишечник – 20%, пищевод – 10%. Клинические и радиологические признаки неспецифичны, для диагностики необходимо исследование биоптата из пораженного органа.

4. Инвазивный аспергиллез органов пищеварения характеризуется высокой летальностью – 50%. Прогностически неблагоприятные факторы – персистирующая иммуносупрессия и аплазия кроветворения, а также сопутствующая тяжелая бактериальная или вирусная инфекция.

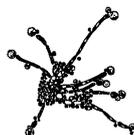
5. Для успешного лечения необходимо раннее хирургическое вмешательство и антимикотическая терапия, препаратом выбора является вориконазол.

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. 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 // Clin. Infect. Diseases. – 2008. – Vol. 46, №12. – P. 1813-21.
2. Клишко Н.Н., Шадривова О.В., Хостелиди С.Н. и др. Инвазивный аспергиллез: результаты многоцентрового исследования // Онкогематология. – 2014. – № 2. – С. 13-19.
3. Eggimann P., Chevrolet J.-C., Starobinski M., et al. Primary invasive aspergillosis of the digestive tract: Report of two cases and review of the literature // Infection. – 2006. – Vol. 34, №6. – P. 333-338.
4. Bizet J., Cooper C.J., Zuckerman M.J., et al. A bleeding colonic ulcer from invasive *Aspergillus* infection in an immunocompromised patient: a case report // J. of Med. Case Reports. – 2014. – Vol. 8, №407. – <http://www.jmedicalcasereports.com/content/8/1/407>.
5. Шадривова О.В., Хостелиди С.Н., Зюзгин И.С. и др. Случай успешного лечения изолированного инвазивного микоза толстой кишки у больной острым лимфобластным лейкозом // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Vol. 14, №1. – P. 25-30.
6. Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Российские рекомендации / ред. Н. Н. Клишко – М: Фармтек. – 2015. – 95 с.
7. Patterson T.F., Thompson G.R., Denning D.W. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America // Clin. Infect. Dis. – 2016. – Vol. 63, №6. – DOI: 10.1093/cid/ciw326.

Поступила в редакцию журнала 08.09.2016

Рецензент: Е.Б. Авалуева



## ИНВАЗИВНЫЙ АСПЕРГИЛЛЕЗ ОКОЛОНОСОВЫХ ПАЗУХ У БОЛЬНЫХ В САНКТ- ПЕТЕРБУРГЕ

<sup>1</sup>Подковальников С.Л. (аспирант)\*, <sup>1</sup>Шадривова О.В. (ассистент кафедры), <sup>1</sup>Хостелиди С.Н. (доцент кафедры), <sup>1</sup>Десятик Е.А. (миколог), <sup>1</sup>Борзова Ю.В. (главный врач), <sup>2</sup>Волкова А.Г. (пульмонолог), <sup>2</sup>Попова М.О. (врач-гематолог), <sup>1</sup>Богомолова Т.С. (зав. лаб.), <sup>2</sup>Зубаровская Л.С. (зам. директора), <sup>2</sup>Афанасьев Б.В. (директор), <sup>1</sup>Васильева Н.В. (директор НИИ, зав. кафедрой), <sup>1</sup>Климко Н.Н. (зав. кафедрой), <sup>1</sup>Артюшкин С.А. (зав. кафедрой)

<sup>1</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии, кафедра оториноларингологии; <sup>2</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова: институт детской гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачёвой, Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2016

По данным регистра больных инвазивным аспергиллезом, созданного в Санкт-Петербурге (1998-2016), пациенты с поражением околоносовых пазух составляют 7%. Инвазивный аспергиллез околоносовых пазух развивается преимущественно у гематологических больных (63%). Основные возбудители – *A. fumigatus* (37%), *A. flavus* (32%), *A. niger* (21%). Поражение легких и околоносовых пазух сочеталось в большинстве случаев (56%). Общая 12-недельная выживаемость больных – 75%. Положительным прогностическим фактором общей выживаемости было применение вориконазола ( $p=0,04$ ).

**Ключевые слова:** *Aspergillus*, инвазивный аспергиллез, околоносовые пазухи носа, противогрибковая терапия

## INVASIVE ASPERGILLOSIS OF THE PARANASAL SINUSES AT PATIENTS IN ST. PETERSBURG

<sup>1</sup>Podkovaalnikov S.L. (postgraduate student), <sup>1</sup>Shadrivova O.V. (assistant of the chair), <sup>1</sup>Khostelidi S.N. (associate professor of the chair), <sup>1</sup>Desyatik E.A. (mycologist), <sup>1</sup>Borzova Y.V. (head of the clinic), <sup>2</sup>Volkova A.G. (pulmonologist), <sup>2</sup>Popova M.O. (hematologist), <sup>1</sup>Bogomolova T.S. (head of the laboratory), <sup>1</sup>Ignatyeva S.M. (leading scientific collaborator), <sup>2</sup>Zubarovskaya L.S. (deputy director), <sup>2</sup>Afanasev B.V. (director), <sup>1</sup>Vasilyeva N.V. (director, head of the chair), <sup>1</sup>Klimko N.N. (head of the chair), <sup>1</sup>Artyushkin S.A. (head of the chair)

<sup>1</sup>North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology, Chair of clinical mycology allergy and immunology, Chair of otorhinolaryngology; <sup>2</sup>Pavlov First Saint Petersburg State Medical University: R. Gorbacheva Memorial Institute of Children Hematology and Transplantation, St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2016

\* Контактное лицо: Подковальников Сергей Леонидович, тел.: (812) 303-51-41

According to the register of patients with invasive aspergillosis in St. Petersburg (1998-2016), patients with lesions of the paranasal sinuses account for 7%. Invasive aspergillosis of the paranasal sinuses develops predominantly in hematological patients (63%). The main pathogens – *A. fumigatus* (37%), *A. flavus* (32%), *A. niger* (21%). The Lung lesions and paranasal sinuses combined in most cases (56%). Total 12-week survival rate of patients was 75%. Positive prognostic factor of overall survival was the use of voriconazole ( $p = 0,04$ ).

**Key words:** antifungal therapy, *Aspergillus*, invasive aspergillosis, paranasal sinuses

## ВВЕДЕНИЕ

Плесневые грибы *Aspergillus* spp. составляют 50-85% микозов околоносовых пазух (ОНП) [1; Stammberger H. //Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. – 1989. – Vol. 93]. При этом инвазивный аспергиллез (ИА) околоносовых пазух – недостаточно изученная проблема, сообщения по этой теме в литературе единичны и основаны на малом количестве наблюдений.

Цель нашего исследования – изучить демографические показатели, фоновые заболевания, этиологию, факторы риска, особенностей клиники, диагностики и антимикотической терапии больных инвазивным аспергиллезом околоносовых пазух в Санкт-Петербурге.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проводили проспективное исследование в нескольких стационарах Санкт-Петербурга в период 1998-2016 гг.

Инвазивный аспергиллез классифицировали как «доказанный» и «вероятный», используя критерии Европейской организации по изучению и лечению рака и Национального института здоровья США 2008 г. (EORTC/MSG) [2].

Материал для культурального исследования (промывные воды околоносовых пазух носа, бронхоальвеолярный лаваж /БАЛ/, мокроту, аспират плевральной полости и пр.) засеивали на среду Сабуро, посеивали инкубировали при 37 °С в течение 10 дней. Полученные культуры *Aspergillus* идентифицировали по морфологическим признакам. Забор материала для исследования из ОНП производили трехкратно при пункции или интраоперационно до начала антибактериальной и антимикотической терапии. При микроскопии использовали нативный препарат или окраску калькофлюором белым, отмечали наличие септированного мицелия, ветвящегося под углом 45°. Биопсийный, секционный или операционный материал после фиксации раствором формалина подвергали обезвоживанию и заливали в парафиновые блоки, из которых изготавливали тонкие срезы толщиной 4 мкм, которые в дальнейшем окрашивали гематоксилин-эозином, проводили окраску PAS-методом или по методу Гомори-Грокотта для выявления элементов мицелия в тканях.

Содержание галактоманна в сыворотке крови, БАЛ и спинномозговой жидкости больных определяли методом ELISA «Platelia *Aspergillus*», положительным считали коэффициент оптической плотности более 0,5 [2].

Для диагностики инвазивного аспергиллеза применяли инструментальные методы исследования – компьютерную томографию околоносовых пазух носа и легких, рентгенографию ОНП и легких, а также ЛОР-осмотр и оптическую риноскопию [2].

Статистическую обработку результатов осуществ-

вляли с помощью прикладных программ для ПК: «Statistica 6.1» и «Microsoft Office Excel 2003».

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы обследовали 43 больных ИА ОНП из 5 стационаров Санкт-Петербурга в возрасте от 1 до 83 лет (медиана – 36), из них 35 взрослых (81%) и 8 детей (19%), женщин – 29 (64%), мужчин – 14 (36%).

При анализе фоновых заболеваний выявили, что ИА ОНП чаще всего возникал у гематологических пациентов – 63%: острый миелоидный лейкоз – 25%, острый лимфобластный лейкоз – 23%, неходжкинская лимфома – 5%, хронический лимфобластный лейкоз – 5%, хронический миелоидный лейкоз – 5%. Другими фоновыми состояниями были: хронический синусит – 31%, злокачественные новообразования – 4%, прочие – 2% (табл.1).

Таблица 1.

### Фоновые заболевания у больных инвазивным аспергиллезом околоносовых пазух носа

ИА ОНП (n=43)	
Нозология (МКБ-10)	n%
Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ)	11 (25%)
Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ)	10 (23%)
Неходжкинская лимфома (НХЛ)	2 (5%)
Хронический лимфобластный лейкоз	2 (5%)
Хронический миелоидный лейкоз	2 (5%)
Хронический синусит	13 (31%)
Злокачественные новообразования	2 (4%)
Прочие	1 (2%)

Основными факторами риска были агранулоцитоз – 59%, применение системных глюкокортикостероидов – 46%, трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток – 33%, реакция «трансплантат против хозяина» – 26%, хирургические вмешательства – 12% (табл. 2).

Таблица 2.

### Факторы риска развития инвазивного аспергиллеза околоносовых пазух носа

Факторы риска	n%
Агранулоцитоз	59%
Системные глюкокортикостероиды (СГКС)	46%
Аллогенная трансплантация кровяных стволовых клеток (алло-ТКСК)	33%
Реакция «трансплантат против хозяина»	26%
Хирургические вмешательства	12%

Наиболее часто ИА ОНП развивается при диссеминации микотического процесса – в 58% случаев. Изолированный аспергиллез ОНП диагностировали у 44% пациентов, в сочетании с поражением легких – у 56%. Чаще всего мы наблюдали одностороннее поражение верхнечелюстных пазух – 91% случаев, в сочетании с клетками решетчатого лабиринта – 9%.



Рис. КТ-картина микотического поражения левой верхнечелюстной пазухи (ВЧП).

«Доказанный» ИА диагностировали у 38% больных, «вероятный» ИА – у 62% (по классификации EORTC/MSG, 2008).

Положительный тест на галактоманнан методом «Platelia Aspergillus» в сыворотке крови или БАЛ определяли у 54% пациентов.

При прямой микроскопии аспиратов из ОНП, мокроты, БАЛ и других биосубстратов наличие нитей септированного мицелия, делящегося под острым углом, отмечали у 33% больных.

Установлены особенности этиологии ИА ОНП. *Aspergillus* spp. были выделены в культуре в 44% случаев. Возбудителями ИА были: *A. fumigatus* (37%), *A. flavus* (32%), *A. niger* (21%), *A. ustus* (5%) и *A. ochraceus* (5%). Два и более видов *Aspergillus* spp. были выделены от 5% пациентов (табл. 3).

Таблица 3.

### Возбудители инвазивного аспергиллеза околоносовых пазух

Возбудитель	ИА ОНП
<i>A. fumigatus</i>	37%
<i>A. flavus</i>	32%
<i>A. niger</i>	21%
<i>A. ustus</i>	5%
<i>A. ochraceus</i>	5%
Два и более	5%

Всем больным проводили антимиотическую терапию, за исключением 1 пациента (диагноз был установлен посмертно). Для лечения ИА ОНП использовали вориконазол (32%), итраконазол (30%), амфотерицин В деоксихолат (21%), каспофунгин (12%) и позаконазол (5%). У 38% больных применяли два и более антимиотических препарата. Хирургическое лечение выполняли у 32% пациентов; у 68% – были серьезные противопоказания к хирургическому лечению, связанные с гематологической патологией (табл. 4).

Таблица 4.

### Антифунгальная терапия инвазивного аспергиллеза околоносовых пазух

Антифунгальная терапия	n%
Вориконазол	32%
Итраконазол	30%
Амфотерицин В деоксихолат	21%
Каспофунгин	12%
Позаконазол	5%
Два и более антимиотиков	32%
Хирургическое лечение	32%

Общая выживаемость больных ИА ОНП в течение 12 недель составила 75%. Положительным прогностическим фактором было применение вориконазола ( $p=0,03$ ), отрицательным – развитие РТПХ ( $p=0,01$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Внедрение в клиническую практику новых медицинских технологий (трансплантация органов, системная иммуносупрессивная терапия, инвазивные диагностические и лечебные процедуры), распространение ВИЧ-инфекции, а также широкое применение антибактериальных препаратов привело к увеличению популяции иммунокомпрометированных больных с высоким риском развития инвазивных микозов [3, 4; *Елинов Н.П. и др. // Проблемы медицинской микологии. – 2002. – №1; Ruhnke M. // Проблемы медицинской микологии. – 2000. – №1*]. Одной из наиболее тяжело протекающих микотических инфекций с высокой летальностью является ИА [4, 5]. При диагностике инвазивных микозов клиницисты и врачи-лаборанты часто испытывают большие затруднения.

В регистр больных ИА мы включили 620 пациентов с ИА, госпитализированных в период с 1998 по 2015 г. в 19 многопрофильных стационаров Санкт-Петербурга. Регистр содержит более 150 показателей (пол, возраст, факторы риска, основное заболевание, эмпирическая терапия, локализация микотической инфекции, клинические и биохимические показатели крови, данные рентгенографии, КТ, МРТ, микроскопическое, культуральное, гистологическое исследование биосубстратов, выживаемость и пр.).

При анализе фоновых заболеваний выявили, что наиболее часто ИА ОНП имел место у онкогематологических больных (63%) на фоне выраженной иммуносупрессии. Наши результаты совпадают с данными других авторов [*Елинов Н.П. и др. // Проблемы медицинской микологии. – 2002. – №1; Ruhnke M. // Проблемы медицинской микологии. – 2000. – №1; Stevens D.A., et al. // Clin. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 30; Yeo S.F., Wong B. // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15*].

Анализируя демографические показатели, установили, что ИА ОНП развивался преимущественно у взрослых пациентов (медиана возраста – 36 лет), что сходно с данными других авторов [6].

В результате микологического обследования мы выявили широкий спектр возбудителей ИА ОНП. В 37% случаев мы выделили *A. fumigatus*, вторым по частоте изолятом был *A. flavus* (32%), третьим – *A. niger* (21%), что также сходно с сообщениями других авторов [7; *Ruhnke M. // Проблемы медицинской микологии. – 2000. – №1; Kameswaran M., et al. // J. Laryngol. Otol. – 1992. – Vol. 126*].

В этом исследовании мы отметили, что в большинстве случаев (56%) ИА ОНП сочетался с ИА легких.

По нашим данным, выживаемость больных с ИА ОНП в течение 12 недель составила 75%, что связано с применением вориконазола ( $p=0,04$ ), также его эффективность подтверждена многими исследователями у разных категорий больных с иммуносупрессией [8; *Herbrecht R., et al. // N. Engl. J. Med. – 2002. – Vol. 347; Hoffman H.L., Rathbun R.C. // Exp. Invest. Drugs. – 2002. – Vol. 11, №3*]. Согласно последним рекомендациям Американского общества инфекционных болезней (IDSA), препаратом выбора для лечения инвазивного аспергиллеза является вориконазол, альтернативными препаратами – амфотерицин В дезоксихолат, липидный комплекс амфотерицина В и каспофунгин. В начале вориконазол используют в/в 12 мг/кг в 1-й день, затем – 8 мг/кг/сут или per os 800 мг в 1-й день, затем – 400 мг/сут в 2 приема; у детей (2-12 лет): в/в 18 мг/кг в 1-й день, затем – 16 мг/кг/сут или per os 18 мг/кг/сут (максимально = 700 мг/сут). Каспофунгин применяют в/в 70 мг в 1-й день, затем – по 50 мг/сут; липидный комплекс амфотерицина В – в/в 5 мг/кг/сут.

В случае неэффективности стартовой терапии, назначают вориконазол или липидный комплекс амфотерицина В в сочетании с эхинокандином или позаконазол per os 800 мг/сут. В качестве вторичной профилактики рецидива заболевания рекомендуют использовать вориконазол или позаконазол. Антифунгальную терапию продолжают до исчезновения клинических признаков заболевания, эрадикации возбудителя из очага инфекции, купирования или стабилизации радиологических признаков. Средняя продолжительность лечения составляет 20-60 суток, однако у пациентов с сохраняющейся иммуносупрессией необходимо более длительное лечение. Обязательным условием успешного лечения инвазивного аспергиллеза ОНП является радикальная операция с целью удаления пораженных тканей. Однако достаточно часто из-за общего тяжелого состояния пациента не удается провести хирургическое лечение [9, 10].

## ВЫВОДЫ

1. Инвазивный аспергиллез околоносовых пазух развивается преимущественно у гематологических больных (63%).
2. Основные возбудители – *A. fumigatus* (37%), *A. flavus* (32%), *A. niger* (21%).
3. Поражение легких и ОНП сочетается в большинстве случаев (56%).
4. Общая 12-недельная выживаемость больных – 75%. Положительным прогностическим фактором является применение вориконазола ( $p=0,04$ ).

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Крюков А.И., Кунельская В.Я., Шадрин Г.Б.* Эпидемиология грибковых заболеваний верхних дыхательных путей и уха // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, №1. – С. 28-31.
2. *De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly 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 // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 46. – P.1813-21.
3. *Климко Н.Н.* Принципы лечения микозов // Микозы: диагностика и лечение: руководство для врачей. – М., 2007. – С. 30-90.
4. *Аравийский Р.А., Климко Н.Н., Васильева Н.В.* Диагностика микозов. – СПб.: СПбМАПО, 2004. – С. 180-190.
5. *Климко Н.Н.* Инвазивный аспергиллез у гематологических и онкологических больных // Онкогематология. – 2006. – Т.1, №2. – С. 97-107.
6. *Denning D.W.* Aspergillosis. – UK: UK Copyright, 2007. – P. 77.

7. Akhaddar A., Gazzaz M., Albouzidi A., et al. Invasive *Aspergillus terreus* sinusitis with orbitocranial extension: case report // Surg. Neurol. – 2008. – Vol. 69. – P. 490-496.
8. Hoenigl M., Zollner-Schwetz I., Sill H., et al. Epidemiology of invasive fungal infections and rationale for antifungal therapy in patients with haematological malignancies // Mycoses. – 2011. – Vol. 54, №5. – P. 454-459.
9. Patterson T.F., Thompson III G.R., Denning D.W., et al. Practice Guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America // Clin. Inf. Dis. – 2016. – Vol. 63, №4. – P. 2-53.
10. Климко Н.Н. Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Российские рекомендации. – М.: Фарматек, 2015. – С. 73-81.

Поступила в редакцию журнала 19.09.2016

Рецензент: Волжанин В.М.



## ДИФЛЮКАН В ТЕРАПИИ ОНИХОМИКОЗА СТОП У БОЛЬНЫХ ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТОВ

Котрехова Л.П. (доцент кафедры)\*, Разнатовский К.И. (зав. кафедрой), Васильева Н.В. (директор НИИ, зав. кафедрой), Чилина Г.А. (зав. лаб.), Цурупа Е.Н. (врач-дерматовенеролог, аспирант)

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

©Коллектив авторов, 2016

*Представлены результаты ретроспективного одноцентрового клинического исследования эффективности и безопасности лечения флуконазолом (Дифлюканом) онихомикоза стоп у больных пожилого и старческого возрастов. В исследование были включены данные 95 больных онихомикозом стоп в возрасте от 60 до 85 лет. Полная эффективность комбинированной терапии флуконазолом и аморолфином была выше в группе больных пожилого возраста (54%; 29 из 54), чем у пациентов старческого возраста (46%; 19 из 41).*

**Ключевые слова:** больные пожилого и старческого возрастов, онихомикоз стоп, флуконазол (Дифлюкан)

## DIFLUCAN IN THE TREATMENT OF FEET ONYCHOMYCOSIS IN PATIENTS OF ELDERLY AND SENILE AGE

Kotrekhova L.P. (associate professor of the chair), Raznatovskiy K.I. (head of the chair), Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the chair), Chilina G.A. (head of the laboratory), Tsurupa E.N. (dermatologist, postgraduate student)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology, Chair of dermatovenerology and Chair of medical microbiology, St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2016

*The results of a retrospective monocenter clinical study of the efficacy and safety of treatment with fluconazole (Diflucan) of feet onychomycosis in patients of elderly and old age have been presented in the article. In the study was included data from 95 patients with feet onychomycosis from age 60 to 85 years. The full effectiveness of the combination therapy with fluconazole and amorolfine was higher in the group of older patients (54%; 29 of 54) than in patients of senile age (46%; 19 of 41).*

**Key words:** fluconazole (Diflucan), feet onychomycosis, patients of elderly and senile age

Онихомикоз (ОМ) стоп – одна из наиболее часто встречающихся клинических форм грибковой инфекции кожи и ее придатков; заболеваемость в общей популяции земного шара колеблется от 8% до 13% [1] и зависит от возраста пациентов. Реже всего грибковой инфекции ногтей подвержены дети в возрасте до 16 лет. ОМ стоп у них диагностируют менее чем в 1% слу-

чаев, причем у детей он составляет всего 5% от числа всех патологических состояний ногтей (ониходистрофий) [2]. С возрастом риск развития ОМ, особенно стоп, возрастает: у пациентов старше 60 лет его наблюдают в 25% случаев, а у лиц старше 70 лет – более чем в 50% [3, 4].

Основными возбудителями онихомикоза стоп в 85-90% случаев становятся дерматомицеты – кератинофильные грибы; при поражении кистей они утрачивают свое первенство. Грибковое поражение ногтей кистей чаще обусловлено дрожжевыми грибами рода *Candida* [5]. Редко становятся причиной грибковой инфекции нитчатые недерматомицеты (плесени) как при поражении кистей, так и при поражении стоп. При онихомикозе их выделяют приблизительно в 1-5% случаев [1]. В лечении онихомикоза применяют противогрибковые препараты местного и/или системного действия (пероральные антимикотики). Выбор местной или системной антифунгальной терапии определяют площадью и распространенностью поражения, вовлечением в патологический процесс матрикса ногтя и/или наличием противопоказаний к системной терапии. Современные системные противогрибковые препараты для лечения онихомикоза представлены 3 антимикотиками: тербинафином, итраконазолом и флуконазолом [6, 7]. Однако в стандарте медицинской помощи больным с микозом ногтей (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 11.12.2007 г. №747) задекларировано назначение только двух препаратов: тербинафина (частота назначения – 0,6) и итраконазола (частота назначения – 0,4). Флуконазола в перечне противогрибковых препаратов системного действия нет. Вместе с тем, в инструкции к флуконазолу показаниями для его назначения при онихомикозе указано поражение ногтей дерматомицетами, грибами рода *Candida* и некоторыми нитчатыми недерматомицетами (*Scopulariopsis brevicaulis*). Также применение флуконазола показано больным с поражением ногтей, вызванным дерматомицетами, в тех случаях, когда им противопоказано лечение тербинафином или итраконазолом из-за наличия у них патологии гепатобилиарной системы, приема сопутствующей терапии и других проблем, при которых существует высокий риск развития нежелательных явлений. Отметим, что в более раннее издание стандарта медицинской помощи больным с микозом ногтей (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.11.2004 г. №264) флуконазол входит (разовая доза – 150 мг/неделю, курсовая доза – 3600 мг, частота назначения – 0,1). В соответствии с данным стандартом, в микологической клинике СЗГМУ им. И.И. Мечникова прошли лечение 328 больных в возрасте от 18 до 87 лет (средний – 58,6 года, 95% доверительный интервал /ДИ/ 55,8 – 61,4 года).

Наибольшую сложность при лечении онихомикоза стоп представляют длительно протекающие, распространенные формы онихомикоза с поражением матрикса ногтей, развитием онихолизиса, онихогрифоза и дерматофитом. Эти клинические проявления онихомикоза чаще наблюдают у пациентов пожилого и старческого возрастов. Наличие у них коморбидных состояний, недостаточности кровообращения в дистальных отделах конечностей, метаболического синдрома, ожирения и сахарного диабета считают «плохими» прогностическими признаками, приводящими

\* Контактное лицо: Котрехова Любовь Павловна, тел.: (812) 303-51-47

к низкой эффективности антифунгального лечения онихомикоза [5]. Декомпенсация соматических заболеваний, прием сопутствующей терапии обуславливают высокий риск развития нежелательных явлений при назначении системных антимикотиков, таких как тербинафин и итраконазол. Поэтому флуконазол благодаря его высокому профилю безопасности в лечении онихомикоза у больных старших возрастных групп часто становится препаратом выбора. Известно, что флуконазол в некоторой мере уступает по своей эффективности тербинафину и итраконазолу, поэтому с целью повышения результативности антифунгальной терапии в микологической клинике СЗГМУ им. И.И. Мечникова применяют комбинированный способ лечения, подразумевающий одномоментное назначение антимикотиков системного и местного действия, помогающий увеличить эффективность на 10-15% [8-10].

Цель исследования – для подтверждения гипотезы, что комбинированное лечение онихомикоза стоп антимикотиками системного и местного действия в сочетании с аппаратной чисткой ногтей стоп является действенным и безопасным у больных пожилого и старческого возрастов, нами было проведено одноцентровое, ретроспективное, открытое, сравнительное исследование эффективности и безопасности терапии флуконазолом и лаком аморолфин онихомикоза у пациентов старших возрастных групп.

## МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Исследование проводили в рамках диссертационных работ Л.П. Котреховой на соискание ученой степени доктора медицинских наук и Е.Н. Цурупы на соискание ученой степени кандидата медицинских наук с июня по август 2016 г.; протокол был одобрен на заседании Локального этического комитета СЗГМУ им. И.И. Мечникова в декабре 2016 года.

По дизайну исследование было одноцентровым, ретроспективным, открытым и сравнительным. Место проведения: кафедра дерматовенерологии, микологическая клиника и научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н. Кашкина Северо-Западного государственного университета им. И.И. Мечникова. Объектами изучения были истории болезни и амбулаторные карты больных онихомикозом стоп, проходивших и закончивших лечение в микологической клинике в период с декабря 2008 г. по май 2016 г.

Критерии включения: наличие информированного согласия, утвержденного Приказом ректора СЗГМУ им. И.И. Мечникова установленного образца; возраст больных от 60 лет и старше; наличие доказанного в начале лечения онихомикоза стоп, обусловленного дерматомицетами и подтвержденного положительными результатами микологических исследований (прямой микроскопией с применением 10% раствора КОН и посева на среду Сабуро); наличие документированных данных о порядке, продолжительности терапии (флуконазолом /Дифлюканом/ – 150 мг/неделю и аморолфином – 1 раз/неделю сроком 6 месяцев), нежелательных явлениях, оценке эффективности лечения, подтвержденного результатами микологического исследования.

Критерии исключения: отсутствие информированного согласия; возраст больных меньше 60 лет; отсутствие лабораторного подтверждения онихомикоза; не-

соблюдение больными режима назначенной терапии.

Были проанализированы все истории болезни и амбулаторные карты, удовлетворяющие критериям включения/исключения.

После первичного анализа документации было отобрано из их числа 54 (истории болезни и амбулаторные карты) больных онихомикозом стоп в возрасте от 60 до 74 лет и 41 документ пациентов в возрасте от 75 лет и старше.

В ходе исследования применяли следующие методы статистического анализа: определение числовых характеристик переменных; оценку соответствия закону нормального распределения по критерию Колмогорова-Смирнова; сопоставление частотных характеристик качественных показателей с помощью непараметрических методов Хи-квадрат Пирсона, двусторонний точный тест Фишера (Fisher Exact Test). Сравнение количественных параметров в изучаемых группах осуществляли с использованием критериев Манна-Уитни. Различия величин считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было проанализировано 453 истории болезни и амбулаторные карты больных онихомикозом стоп в возрасте 60 и старше лет. Из них 95 полностью удовлетворяли критериям включения и исключения: 54 документа пациентов пожилого возраста (от 60 до 74 лет включительно) и 41 документ больных старческого возраста (от 75 и старше лет). Данные отобранных документов были подвергнуты статистическому анализу.

Пациентов в возрасте от 60 лет до 85 лет распределили в 2 группы: 1 – пожилого возраста (54 человек) и 2 – старческого возраста (41 человек). Базовая характеристика групп представлена в таблице 1. Группы больных оказались сопоставимы по демографическим характеристикам (полу, весу), длительности течения онихомикоза, количеству пораженных ногтей, видовому составу возбудителей онихомикоза, сопутствующим заболеваниям. Статистически значимых различий по этим параметрам в группах не наблюдали ( $\chi^2$ ,  $p > 0,05$ ; t-Test,  $p > 0,05$ ; критерий Манна-Уитни U,  $p > 0,05$ ).

Таблица 1

Показатели	Базовые характеристики исследуемых групп		
	Группа пожилого возраста (n=54)	Группа старческого возраста (n=41)	Итого (n=95)
Средний возраст (года), 95% ДИ	67,4 66,2 - 68,6	79,6 78,4 - 80,8	72,7 71,2 - 44,2
Мужчины, n (%)	18 (33)	19 (46)	37 (39)
Средний вес, кг	72,1	72,6	72,3
Выявление <i>Trichophyton rubrum</i> , n (%)	52 (97)	39 (96)	91 (96)
Среднее количество пораженных ногтей, 95% ДИ	6,1 5,6 - 6,6	6,0 5,5 - 6,5	6,1 5,8 - 6,2
Средняя длительность онихомикоза, месяцы, 95% ДИ	79,4 67,3 - 91,5	86,5 71,7 - 101,4	85,7 79,9 - 91,6
Сахарный диабет, n (%)	15 (28)	16 (39)	31 (33)
Заболевания гепатобилиарной системы, n (%)	8 (15)	7 (17)	15 (16)
Сердечнососудистые заболевания, n (%)	32 (59)	28 (68)	60 (63)
Прием иммуносупрессивных препаратов, n (%)	5 (9)	4 (10)	9 (9)

В первой группе из сопутствующих заболеваний выявили 32 случая (59% из 54) сердечнососудистых

заболеваний, из них 14 – недостаточность периферического кровообращения (26% из 54 и 44% из 32); сахарный диабет второго типа наблюдали у 15 пациентов (28% из 54), заболевания гепатобилиарной системы – у 8 (15% из 54); 5 человек (9% из 54) принимали иммуносупрессивные препараты.

Во второй группе из сопутствующих заболеваний отмечали 28 случаев (68% из 41) сердечнососудистых заболеваний, из них 16 – недостаточность периферического кровообращения (39% из 41 и 57% из 28); сахарный диабет второго типа – у 16 больных (39% из 41), заболевания гепатобилиарной системы – у 7 (17% из 41); 4 человека (10% из 41) принимали иммуносупрессивные препараты. Статистически значимых различий по сопутствующим заболеваниям между группами не установили ( $\chi^2$ ,  $p > 0,05$ ).

Результаты лечения в группах исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

## Результаты лечения в группах исследования

Группы	n	Микологическое выздоровление, n (%)	Клиническое выздоровление, n (%)	Полное выздоровление, n (%)
Группа 1: больные пожилого возраста	54	29 (54)	32 (59)*	29 (54)
Группа 2: больные старческого возраста	41	23 (56)	20 (49)	19 (46)
Итого	95	52 (55)	52 (55)	48 (51)

Примечание: \*  $\chi^2$ ;  $p=0,027$

Как видно из таблицы 2, полная эффективность комбинированной терапии флуконазолом и аморолфином была выше в группе больных пожилого возраста (54%; 29 из 54), чем у пациентов старческого возраста (46%; 19 из 41), однако эти различия не были статистически достоверны ( $\chi^2_{df=1}$ ;  $p=0,068$ ). Микологическое выздоровление у лиц пожилого возраста наблюдали в 54% случаев (29 из 54), старческого – в 56% (23 из 41). Были выявлены статистически достоверные различия клинической эффективности между исследуемыми группами: у больных пожилого возраста она была выше и составила 59% (32 из 54), старческого возраста – 49% (20 из 41) ( $\chi^2_{df=1}$ ;  $p=0,027$ ).

Во время приема лекарственных препаратов было зарегистрировано 3 (3%) случая развития нежелательных явлений, ни одно из которых не было связано с применением исследуемых препаратов (флуконазола или аморолфина). У 2 пациентов развился гипертонический криз. Также отмечали 1 случай острой респираторной инфекции. Нежелательные явления не потребовали отмены лечения и исключения пациентов из исследования. Отметим, что при совместном приеме флуконазола и противодиабетических препаратов (производных сульфонилмочевины) не выявили ни одного случая развития гипогликемии у пациентов сахарным диабетом. Также мы не наблюдали подъема уровня печеночных ферментов и билирубина в крови у больных с патологией гепатобилиарной системы.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Ни один из существующих на сегодняшний день методов антифунгальной терапии не гарантирует излечения онихомикоза стоп в 100% случаях, поскольку это обусловлено многими факторами. Особенности анатомического строения ногтя и структура плотного кератина ногтевой пластинки не позволяют антифун-

гальным препаратам местного действия поступать в достаточном количестве, необходимом для полного уничтожения гриба, в глубокие отделы ногтя – матрикс и ногтевое ложе. Медленный рост ногтей, обусловленный возрастом больных, нарушением микроциркуляции из-за нарушения периферического кровообращения, сахарного диабета, нейротрофических расстройств, а также иммунодефицитные состояния не дают системным препаратам достигнуть фунгицидного эффекта, который они демонстрируют в исследованиях, проводимых *in vitro* [6]. В выполненном более 10 лет назад исследовании L.I.O.N. (The Lamisil vs Itraconazole in Onychomycosis Study) показано преимущество лечения онихомикоза стоп тербинафином (Ламизилом) продолжительностью 12 и 16 недель над интермиттирующей терапией итраконазолом (3 или 4 пульса по 400 мг/сут в течение недели каждого месяца). Полная и микологическая эффективность оказалась вдвое выше у больных, получавших тербинафин, нежели у пациентов, применявших итраконазол [Sigurgeirsson B., et al. // Arch. Dermatol. – 2002. – Vol. 138]. Многим авторам кажется неоспоримым преимущество тербинафина над другими антимикотиками, однако у лиц старших возрастных групп потенциальный риск развития нежелательных явлений при приеме тербинафина превышает его пользу и ограничивает его применение у этой категории пациентов. Именно для лечения онихомикоза у возрастных пациентов видится возможным более широкое применение флуконазола.

Флуконазол (Дифлюкан), относящийся к производным азолов, оказывает фунгистатическое действие за счет ингибирования 14 $\alpha$ -диметилазы, зависимой от цитохрома P-450, катализирующей превращение ланостерола в эргостерол – основной компонент клеточной мембраны грибов. Флуконазол обладает среди азолов наибольшей 90% биодоступностью и имеет низкую степень связываемости с белками плазмы. Препарат в высоких концентрациях равномерно распределяется в органах, тканях и секретах, хорошо проникает через гематоэнцефалический барьер. В отличие от итраконазола и тербинафина, он лишь частично метаболизируется в печени и преимущественно выводится почками практически в неизмененном виде. Это свойство делает возможным применение флуконазола у больных с патологией гепатобилиарной системы, в том числе и при вирусных гепатитах [6]. В нашем исследовании ни у одного из пациентов с патологией гепатобилиарной системы нежелательных явлений в виде изменений нормальных показателей функции печени не отмечали. Препарат активен по отношению к большинству видов грибов рода *Candida* и дерматомицетам – основным возбудителям онихомикоза. Через 2 недели после начала приема флуконазола в ногтевых пластинках кистей и стоп создается его устойчивая концентрация [11]: в ногтях кистей она равна 5,0  $\mu\text{g/g}$  и обеспечивает клиническую эффективность в 63% случаев, в ногтях стоп – 7,5  $\mu\text{g/g}$  (36%). По всей видимости, эти различия можно объяснить более быстрым ростом ногтевых пластинок кистей, чем стоп. Отметим, что концентрация флуконазола в ногтях пропорционально зависит от принимаемой дозы препарата. Максимум концентрации флуконазола достигается при приеме 450 мг в неделю [Savin R.C., et al. // J. Am. Acad. Dermatol. – 1998. – Vol. 38. – P.110-116; Rich P., et al. // J. Am Acad Dermatol. – 1998. – Vol. 38. – P. 103-109], однако в инструкции

к препарату указана доза 150 мг/неделю. Именно эту дозу мы назначали нашим больным при проведении исследования.

Эффективность флуконазола при лечении онихомикоза стоп уступает таковой при использовании тербинафина и итраконазола. Сравнение действенности тербинафина с флуконазолом было проведено в рандомизированном двойном слепом исследовании в 6 центрах Финляндии в течение 60 недель. Сравнили эффективность тербинафина (12-недельная продолжительность лечения) с результативностью применения флуконазола (150 мг/сут в течение 12 или 24 нед.) в терапии больных онихомикозом кистей и стоп. Полное и микологическое излечение было на четверть выше в группе приема тербинафина, чем флуконазола. Интересен тот факт, что число пациентов, не ответивших на лечение, в группе приема тербинафина, было значительно меньше (11%), чем в группе приема флуконазола (56%). [Havu, Heikkila, Kuokkanen, et al // Br. J. Dermatol. – 2000. – Vol. 142].

Одним из способов повышения эффективности антифунгальной терапии является применение комбинированных методов терапии, подразумевающих одномоментное назначение двух антимикотиков системного и местного действия. В качестве противогрибкового средства системного действия обычно применяют один из трех антимикотиков – тербинафин, итраконазол или флуконазол. Для местного лечения используют один из антифунгальных лаков, содержащих аморолфин или циклопирокс. Лекарственная форма (лак для ногтей и вспомогательные вещества этих препаратов) обеспечивает их фиксацию на ногте, способствует эффективному проникновению в ногтевую пластинку и созданию необходимой МИК для большинства возбудителей онихомикоза. Эффективность применения антифунгальных лаков была доказана многоцентровыми рандомизированными клиническими испытаниями, в отличие от эффективности участвовавшего в России использования других лекарственных форм

антифунгальных препаратов (растворов, кремов и мазей). Полная санация ногтевой пластинки (микологическое и клиническое выздоровление) предупреждает развитие рецидивов после окончания лечения. Так, добавление лака аморолфин к системным антимикотикам (итраконазолу или тербинафину) помогает увеличить действенность терапии на 25-35% [9, 10]. В проведенном нами исследовании флуконазол показал достаточно высокую эффективность у больных старших возрастных групп. Его высокий профиль безопасности дает возможность использовать его у пациентов из групп риска развития нежелательных явлений при таких сопутствующих патологиях, как сахарный диабет и заболевания гепатобилиарной системы.

Таким образом, применение комбинированной терапии флуконазолом и 5% лаком с аморолфином нам видится перспективным у больных онихомикозом старших возрастных групп, а также у пациентов, которым противопоказано назначение более эффективных антимикотиков (тербинафина или итраконазола) из-за высокого риска развития нежелательных явлений. В таких случаях флуконазол можно рассматривать как препарат резерва, а одновременное с ним назначение наружной терапии (антифунгального лака) может повысить эффективность терапии онихомикоза стоп.

## ВЫВОДЫ

1. Эффективность (микологическая, клиническая, полная) комбинированной терапии, включающей аппаратную подчистку ногтей, прием системного антимикотика – флуконазола (Дифлюкана), нанесение лака аморолфина (Лоцерила) выше, чем монотерапия системным антимикотиком флуконазолом (Дифлюканом) у больных онихомикозом стоп, протекающим с прогностически неблагоприятными клиническими проявлениями.

2. Высокий профиль безопасности флуконазола (Дифлюкана) позволяет назначать его для лечения онихомикоза стоп пациентам с высоким риском развития нежелательных явлений.

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Ameen M., Lear J.T., Madan V., et al. British Association of Dermatologists guidelines for the management of onychomycosis 2014 // British J. of Dermatology. – 2014. – №171. – P. 937-958.
2. Rodrigues Pazos L., Pereira Ferreiros M., Pereira M., Toribio J. Onychomycosis observed in children over a 20-year period // Mycosis. – 2011. – Vol. 54. – P. 450-453.
3. Richardson M.D., Warnock D.W. Fungal infection: Diagnosis and Management, 4<sup>th</sup> end. – Chichester: Wiley-Blackwell, 2012.
4. Baran R. The nail in the elderly // Clin. Dermatol. – 2011. – №29. – P. 54-60.
5. 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.
6. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. – М.: Премьер МТ, 2007. – 336 с.
7. Chang C-H., et al. The safety of oral antifungal treatments for superficial dermatophytosis and onychomycosis: meta-analysis// Am. J. Med. – 2007. – Vol. 120. – P. 791-798.
8. 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. – №19. – P. 21-29.
9. Jaiswal A., Sharma R.P., Carg A.P. An open randomized comparative study to test the efficacy and safety of oral terbinafine pulse as a monotherapy and in combination with topical ciclopirox olamine 8% or topical amorolfine hydrochloride 5% in the treatment of onychomycosis // Indian J. Dermatol. Venerol. Leprol. – 2007. – Vol. 73. – P. 393-396.
10. Котрехова Л.П., Разнатовский К.И., Пуруна Е.Н. Флуконазол в терапии больных онихомикозом стоп, протекающего с прогностически неблагоприятными проявлениями // Клиническая дерматология и венерология. – 2015. – Т. 14, №3. – С. 46-51.
11. Barchiesi F., Silvestri C., Arzeni D. In vitro susceptibility of dermatophytes to conventional and alternative antifungal agents// Med. Mycol. – 2009. – Vol. 47. – P. 321-326.

Поступила в редакцию журнала 27.09.2016

Рецензент: М.М. Хобейш

# УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ МИГРАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ХОДЕ ПОЧКОВАНИЯ *CRYPTOCOCCUS LAURENTII*

<sup>1</sup>Степанова А.А. (зав. лаб.), <sup>2</sup>Ямагучи М. (адъюнкт-профессор), <sup>2</sup>Чабана Х. (ассистент профессора), <sup>1</sup>Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой)

<sup>1</sup>НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>Центр Исследований по медицинской микологии, Университет г. Чива, Япония

© Коллектив авторов, 2016

В статье представлены цитологические данные о миграции клеточных компонентов в ходе почкования дрожжевых клеток *Cryptococcus laurentii* в экспоненциальной стадии роста *in vitro*. В материнской клетке выявлены: интерфазное ядро с низким уровнем конденсированного хроматина, крупная вакуоль, плотный цитозоль, многочисленные свободные рибосомы, умеренное количество митохондрий, цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума (ЭР) и секреторных пузырьков. На этой стадии запасные вещества, одиночные цистерны Гольджи и микротельца отсутствовали. В ходе почкования материнской клетки мы обнаружили увеличение размеров ядра и возрастание стелени его хроматизации, а также размеров ядрышка, количества митохондрий с формированием гигантской органеллы. С началом почкования ядро материнской клетки мигрировало из базальной части в латеральную, а затем в апикальную часть, где оно располагалось напротив рубчика. Вначале в области рубчика возникла вырост цилиндрической формы, который претерпевал изодиаметрический рост с формированием сферической почки. До митоза цитозоль, свободные рибосомы, небольших размеров митохондрии, мелкие вакуоли, короткие цистерны ЭР и несколько секреторных пузырьков мигрировали из материнской клетки в растущую почку. После перемещения ядра из материнской клетки в содержимое почки и последующего его деления, в области перешейка формировалась септа, по которой происходило отделение материнской клетки от дочерней.

**Ключевые слова:** замораживание-замещение, *in vitro*, *Cryptococcus laurentii*, почкование, ультраструктура, электронная микроскопия

## ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF CELL COMPONENTS MIGRATION DURING BUDDING IN THE YEAST *CRYPTOCOCCUS LAURENTII*

<sup>1</sup>Stepanova A.A. (head of the laboratory), <sup>2</sup>Yamaguchi M. (grand-fellow), <sup>2</sup>Chibana H. (assistant professor), <sup>1</sup>Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the chair)

<sup>1</sup>Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Medical Mycology Research Center, Chiba University, Japan

© Collective of authors, 2016

\* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна, тел.: (812)303-51-40

In this article the cytological data of the cell components migration during budding of the *Cryptococcus laurentii* yeast cells in exponential stage of *in vitro* growth were presents. In the mother cells we revealed the interphase nucleus with lower level of condensed chromatin, large vacuole, dense cytosol, numerous free ribosomes, moderate amount of mitochondria, cisterns of granular endoplasmic reticulum (ER) and secretory vesicles. In this stage, the storage substances, single Golgi cisterns and microbodies were absent. During budding of the mother cells we revealed the increasing of the sizes of nucleus with increasing the level of its chromatinization and nucleolus sizes, the number of mitochondria with formation of giant organelle. At the beginning of budding, the nucleus in mother cell migrated from basal part to lateral and finally in apical area and localized near opposite scar. At first, in scar region the cylindrical protrusion was formed, which then undergo the isodiametrical growth with formation of spherical bud. Before mitosis, cytosol, free ribosomes, small mitochondria and vacuoles, short cistern of ER, several secretory vesicles migrated from mother cell to growing bud. After nucleus transition from mother cell in bud content and its mitotic division, the septum was formed in region of isthmus along which the separation of mother cell from daughter occur.

**Key words:** budding, *Cryptococcus laurentii*, electron microscopy, freeze-substitution, *in vitro*, ultrastructure

## INTRODUCTION

*Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner – is basidiomycetous yeast, which was distributed in soil, air, seawater and contaminated wine, wheat, maize, grape, deep-frozen beans, phyllosphere of grasses, leaves of tropical plants and etc. Also *C. laurentii* reported from droppings and cloacae of pigeons. It was isolated as the etiologic agent of human skin infection, keratitis, endophthalmitis, lung abscess, chronic pneumonia, peritonitis, meningitis and catheter-associated fungemia [1-4; Banerjee P, et al. // Case Report. – 2013. – Vol. 31, Is.1, etc.]. *C. laurentii* was isolated from the blood of a patient given the diagnosis of ganglioblastoma [Averbuch D., et al. Med. Mycol. – 2002. – Vol. 40, №5]. This species was revealed in the dog with panniculitis and osteomyelitis, in the stomach of aborted equine fetuses. The purpose of this study was, first, on the example *in vitro* growing yeast cells of *C. laurentii* provide the ultrastructural investigations of organelle migration during the cardinal stage of morphogenesis – budding and, second, compare this data with the same obtained before for another species from genus *Cryptococcus* – *C. neoformans* [Kopecká M., et al. // Scripta Medica (Brno). – 2000. – Vol. 73, №6], *C. albidus* [5] and another genus of basidiomycetous yeast – *Malassezia pachydermatis* [6].

## MATERIALS AND METHODS

We investigated cultures of two *C. laurentii* strains (PKIIY-1014/B-292 from Russian collection of pathogenic fungi and IFM 50262 from Culture Collection of the Research Center of Pathogenic Fungi, Chiba University, Japan). The first strain was cultivated 10 days on solid wort agar at 28° C. For scanning electron microscopy, the part of fungal colonies with nutrient medium was fixed in 3% glutaraldehyde (on 0,1 M cacodylate buffer) for 3 hour, post-fixed overnight in 1% osmium tetroxide in same buffer, dehydrated by ethanol series, critical-point dried (HCP-2) for 15 min, coated with gold and observed in JSM 35 (JEOL, Tokyo, Japan). The second strain was cultivated for 24 hour in YPD medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) bacto-pepton and 2% (w/v) glucose on shaker at 30° C. For investigation of the living cells of cultures, we made the temporary preparation and investigation under the phase-contrast microscope (Olympus BH-2RFCA). For transmission electron microscopy (TEM), the cells were collected by centrifugation and sandwiched between two copper grids. Samples were then freeze-substituted in 2% osmium

tetroxide/acetone at - 80° C for 48 hour and embedded in epoxy resin according to the method described before [7]. Ultrathin sections (70 nm thick) were cut with diamond knife then stained (uranyl acetate and lead citrate) and covered with Super Support Films (Nissin EM, Tokyo, Japan) then observed with JEM-1400EX transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Phase-contrast microscopy.** After 24 hour of growth on YPD medium, yeast cells were spherical or ellipsoidal (2-5 x 3-7  $\mu\text{m}$ ), single or in small groups (Fig. 1 a) with monopolar budding. Hyphae and pseudohyphae were absent [1].

**Scanning electron microscopy.** Under the lower magnifications, the yeast cells in culture form the specific massive variable in size spherical and irregular yeast cells aggregations (Fig. 1 b, c, arrows). The developing yeast cells covered with polysaccharide capsule for which typical the slightly irregular surfaces textures (Fig. 1 d, arrows).

**Transmission electron microscopy. Mother cells before budding.** In central part of cell, we revealed the interphase nucleus and large vacuole, which were similar in size and occupied the main its volume (Fig. 1 e, 3 a). The nucleus localized in distal part of cell between vacuole and cell wall, was spherical (2,0  $\mu\text{m}$ ) in form, contained moderate level of randomly distributed condensed chromatin. Nucleolus also spherical, large (0,5  $\mu\text{m}$ ), composed with similar amount of granular and fibrillar components (Fig. 1 f). On the outer nuclear membrane the moderate number of ribosomes were revealed.

Large vacuole localized opposite budding scar and was characterized with the presence of specific tightly localized thin-fibrillar material (Fig. 1 e). The cells on this and another stage of development were not different among themselves in vacuolar content structure, which significantly distinguished this species from previously investigated strain of the *C. albidus* [5].

Mitochondria were in the periphery of cells near cell wall (Fig. 1 e). The number of organelles varied from 4 to 6. They were spherical (0,6  $\mu\text{m}$ ) and ellipsoidal (0,5 x 0,6  $\mu\text{m}$ ) in form and had moderate electron density matrix which was identical electron density with cytosol.

The storage substances in this and another stage of development were absent. This peculiarity was also typical for budding yeast of *C. albidus* [5], which cultivated for 24 hour in same conditions. It was interesting, that for yeast cells of *M. pachydermatis* [6], which grows in similar condition, were typical presence the single large lipid inclusion situated opposite the budding scar. The presence of large amount of different storage substances were typical for cells of *C. neoformans* with different virulence after 7 days of its sowing on the Sabraud's agar [8].

Cytosol with moderate electron density was rich with free ribosomes. Small number (from 3 to 6 on median cell section) single or in small groups (Fig. 1 f) small (60 - 70 nm) secretory vesicles with thin-fibrillar content were distributed in cytosol. Single cisterns of Golgi and microbodies were not found on all developmental stages. The cisterns of granular ER on this and subsequent stages of budding were rare, short, straight or slightly curved, localized near cell wall (Fig. 1 f). The small amount of granular ER were typical for mother cells of another basidiomycetous yeast species [*C. albidus*: 5; *M.*

*pachydermatis*: 6; *C. neoformans*: 8, 9]. For comparison, microbodies appeared in the yeast cells *C. neoformans* after 7 days of beginning of infection in mouse lung and brain independent of its virulence [8].

Plasma membrane was in close contact with the electron-transparent thin (0,17  $\mu\text{m}$ ) light cell wall (Fig. 1 e, f) which supply with single budding scar (with mean diameter 0,6  $\mu\text{m}$ ).

**Budding.** The process of budding was started by development in the scar region evagination of plasma membrane and cell wall, which contain cytosol and free ribosomes (Fig. 1 g, arrow). Later in this places was formed a cylindrical protrusion (Fig. 1 h, i, arrow, 3 b). For comparison, the budding of yeast cells in *C. neoformans* [Kopecká M., et al. // Scripta Medica (Brno). – 2000. – Vol. 73, №6; Yamaguchi M., et al. // J. of Electron Microscopy. – 2002. – Vol. 21, №1] also start with formation of similar protrusion. But we did not revealed its in budding yeast cells of *C. albidus* [5] and *M. pachydermatis* [6]. At this time, the nucleus migrated from basal part of mother cell in its median part (Fig. 1 h) and localized near vacuole. In this period several small vacuoles were appear in cytosol. Soon during isodiametrical growth of this cylindrical protrusion, the spherical bud was formed (Fig. 1 g, k, 3 c). In mother cell, the numbers of mitochondria were increased before 10 - 17 on median section (Fig. 1 j). They formed around nucleus and small vacuole distinctive «sheath» composed from closely contacted organelles (Fig. 2 a, 3 c). Perhaps, increasing the number of mitochondria and peculiarity of its topography in this early stage of budding was the evidence of development of giant organelle so called «mitochondrial reticulum». Formation of giant organelle around nucleus was revealed for budding cells *C. albidus* [5] and for strong virulent strains of *C. neoformans* growing in vivo (mouse brain after seven days of experiments [9]). Contrary, in the yeast cells of *M. pachydermatis* [6], the number of mitochondria, peculiarity of its topography and ultrastructure during budding were constant.

During subsequent stages of bud formation, the sizes of nucleus and level of condensed chromatin were increased (Fig. 2 c). Also the activation of nucleolus was revealed (increasing its size and volume of granular components). We obtained similar data for in vitro growing budding yeast cells of *C. albidus* [5] and *M. pachydermatis* [6]. The activation of nucleolus and chondriome correlated with synthesis of cell wall and polysaccharide capsule in developing bud and also cytosol, free ribosomes and another cell components, which migrate in the developing bud.

According the lower amount of secretory vesicles concentration in cytosol, the budding yeast cells of *C. laurentii* possible compared with similar of *C. albidus* [5] and *C. neoformans* [8, 9]. For comparison, in *M. pachydermatis* [6] these components of endomembrane system were not revealed.

During the bud growth, the cytosol, numerous free ribosomes, several single small mitochondria, small vacuoles (Fig. 2 b, c, d, 3 d), rare short ER cisterns and several secretory vesicles were pass in its content from mother cell cytosol. Directly in the isthmus cytosol, near nuclear outer membrane and vacuolar tonoplast possible revealed the single short microtubules (Fig. 2 d). This cytoskeleton components were also revealed in actively in vitro growing cells of *C. albidus* [5], *M. pachydermatis* [6]

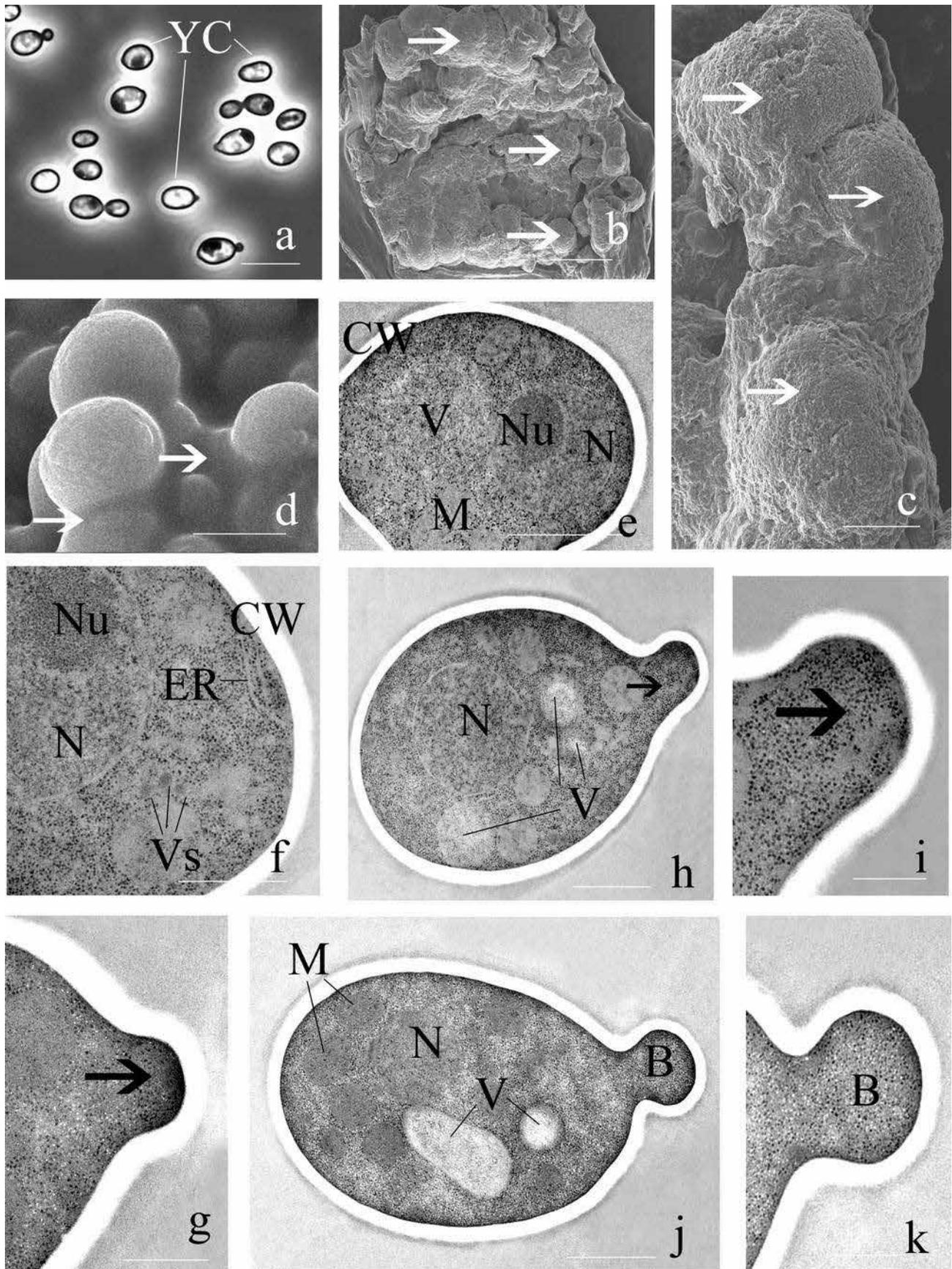


Fig. 1. Phase-contrast (a), scanning (b - d) and transmission electron microscopy (e - k) of in vitro growing *C. laurentii* cells. Explanation for this and another figures: B – bud, CP – cylindrical protusion; DC – daughter cell, CW – cell wall, ER – endoplasmic reticulum; M – mitochondrium(ia), MC – mother cell, Mt – microtubule, N – nucleus, Nu – nucleolus, S – septum; Sc – scar; V – vacuole, Vs – vesicles. Scale: a – 6  $\mu\text{m}$ , b – 500  $\mu\text{m}$ , c – 100  $\mu\text{m}$ , d – 3  $\mu\text{m}$ , e – 2  $\mu\text{m}$ , g, k – 0,5  $\mu\text{m}$ , i – 0,4  $\mu\text{m}$ , f, h, j – 1  $\mu\text{m}$ .

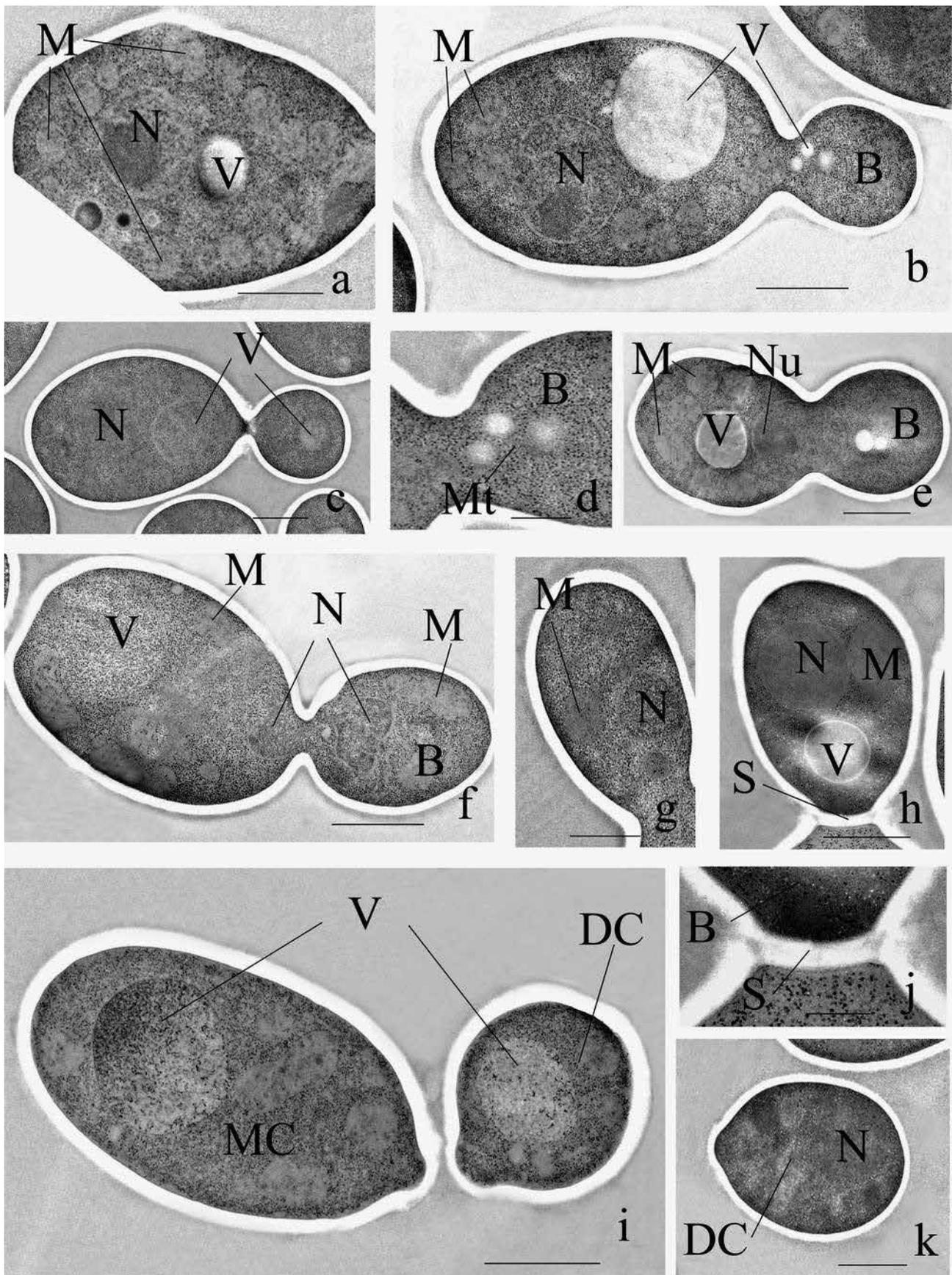


Fig. 2. Ultrastructure of in vitro growing *C. laurentii* cells during (a - g) and after budding (h - k).  
Scale: a, b, c, e, f, l, k - 2 μm, d, g, h - 1 μm, j - 0,2 μm.

and *C. neoformans* [9; Yamaguchi M., et al. // J. of Electron Microscopy. – 2002. – Vol. 21, №1]. Previously, the detailed investigations of cell cytoskeleton system (microtubules and F-actin) during budding yeast cells of *C. laurentii* was carried out by Marek D., Gabriel M. and Kopecká M. [10]. These authors demonstrated, that cytoskeleton components play important role during budding of yeast cells of this fungal species and undergo the regular changes during this cardinal time of morphogenesis and are similar to those in *C. neoformans*.

When the bud is about half size of the mother cells, the nucleus situated near isthmus and then directly passes from its (Fig. 2 e, 3 e). At this time, the isthmus was more wide (1,25  $\mu\text{m}$ ), and large nucleolus (0,75  $\mu\text{m}$ ) was visible in the part of nucleus which localized in mother cell cytosol. According the data in literature [10], during of *C. laurentii* yeast cells budding, the nucleus was revealed in the bud content and undergo mitosis in isthmus after which one nucleus stay in bud and another return in mother cell. Similar pattern of nucleus behavior was typical for the budding cells of another species of pathogenic fungus – *C. neoformans* [11].

After division completion, we observed one strongly chromatized irregular in form and small sized (1,0 x 0,8  $\mu\text{m}$ ) nucleus in mother cell and another in bud cytosol (1,4 x 0,8, fig. 2 f, 3 f). Later the size of nucleolus in bud (Fig. 2 g) and mother cell gradually increased and their forms became spherical.

**The mother and daughter cell during and after separation.** Soon after mitosis and during cytokinesis in middle part of isthmus, thick (0,17) light septum was formed (Fig. 2, h, j, 3 g). Cell separation passed through middle layer of septa. After this process (Fig. 2 i, 3 h), the mother cells ultrastructure, topography and number of organelles returned in condition before budding.

In central part of daughter cell revealed was spherical nucleus (1,5  $\mu\text{m}$ ), one light median in size spherical vacuole (Fig. 2 i) with and thin-fibrillar material in its content. The number of spherical (0,6  $\mu\text{m}$ ) mitochondria varied from 2 to 3. The number of free ribosomes, cisterns of ER and secretory vesicles was similar with the mother cells after budding. After separation from mother cell, the daughter cell undergo isodiametrical growth (Fig. 2 k), which was accompanied with formation in its apical part the central vacuole which localized apposite scar. In this stage synthesis of the cell wall, cytosol, free ribosomes and proliferation of mitochondria take a place. Simultaneously, the nucleus size was increase and level of chromatization decrease. Finally, they localized near cell wall in basal part of cell.

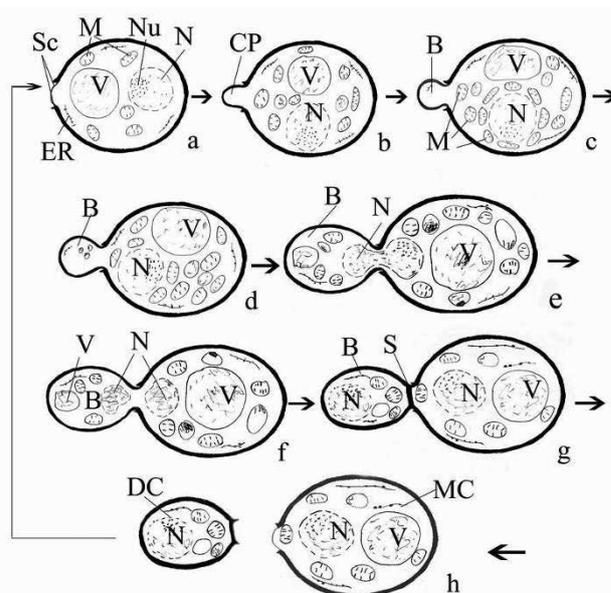


Fig. 3. Diagram showing the organelles migration during *C. laurentii* budding. a – mother cell before budding, b – g – mother cell during budding, h – mother and daughter cell after separation.

## RESUME

Ultrastructural comparison of mother cell in cultures of two species from genus *Cryptococcus* – *C. laurentii* and *C. albidus* [5] in exponential phase of growth demonstrated the common peculiarity in internal topography before (nucleus in basal part and vacuole opposite the scar) and during (migration of the nucleus from distal to lateral and opposite the scar and, contrary, transition of nuclei from apical part in distal one) budding. Another topography was typical for interphase nucleus in mother cell of *M. pachydermatis* [6] – central-lateral. For mother cells of all compared four yeast species were typical the high level of vacuolization, moderate number of mitochondria and cistern of rough ER, abundance of free ribosomes, absence of single cisterns of Golgi and microbodies. Only for mother and budding cells of *M. pachydermatis* was specific the presence of storage lipid inclusion, which localized opposite scar (as vacuole in another species). According our opinion, isolation in mother cell the nucleus from scar with the «using» of vacuole in *C. albidus* [5], *C. laurentii* and large lipid inclusion in *M. pachydermatis* [6] block the budding process and subsequent changes in interrelations between nucleus → vacuole and storage lipid was the first signal for starting of this process.

For interphase nucleus of all investigated yeast species, were typical lower level of chromatization, which was typical for fungi [5, 6, 11, 12 etc.] and correlated with lower number of chromosome. In all investigated species, transition of mother cells to bud formation were accompanied by increasing of nucleus and nucleolus sizes and level of chromatization. In our opinion, nucleus activation correlated, first, with grounding to mitosis and, second, with necessity activation of synthetic processes and organelles proliferation.

Budding in all species were accompanied by the synthesis of cytosol and free ribosomes. For all investigated species, for exclusion *M. pachydermatis*, were typical specific proliferation of mitochondria, changes in its topography, including formation of a «sheath» around

the nuclear envelope, which we associate with formation of one giant organelle. For comparison, during mother cell development of natural [13] and clinical [9] isolates of *C. neoformans* giant mitochondria were not developed. Thus, in general, in investigated pathogenic yeast species giant mitochondria developed during budding, but the *M. pachydermatis* [6] distinctly differ from this species by absence of chondriome proliferation in mother cells, which undergo the same process.

In mature and budding mother cell of all investigated yeast species, for exclusion of *R. minuta* [7], the number of secretory vesicles was small. As a rule, they not revealed near cells wall in developing bud and separated septa between the mother and daughter cell. Thus, in the yeast cells of this species its participation in cell wall synthesis and construction was questionable. Also not clear the source of secretory vesicles, so that the single cisterns Golgi we not revealed. Our data support the opinion of Vasilyev A. E. [Vasilyev A.E. // Bot. Journal – 1985. – Vol. 70, №9] that fungal cell was «mesocaryotic» and we often find the presence of prokaryotic and eucaryotic pattern of cell functioning. It was obvious, that in our objects all morphogenetic process may pass as in bacteria only with participation of plasma membrane, cytosol and free ribosomes. For conformation: the yeast cell budding in *M. pachydermatis* [6] pass only on the base of nucleus activation and without chondriome proliferation. Revealed abundance of secretory vesicles in budding yeast cells of *R. minuta* [7] may be demonstrated its differences from another investigated species in rate and quality of synthesis

and secretion of ferments and secondary metabolites.

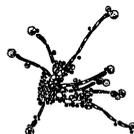
Unfortunately, but we not observed directly process of division, but according the data another authors in *C. neoformans* [11, 12], *M. pachydermatis* [14] and *R. glutinis* [McCully E.K., Robinow C.F. // J. Cell Sci. – 1972. – Vol. 11] it was took places during nucleus moving through isthmus. During budding the yeast cells in *C. albidus* [5], nucleolus separate on equal parts during in isthmus region during nucleus migration. Previously we [5] mentioned, that the behavior and the fate of nucleolus during budding of yeast cells constant for member of one genus and, perhaps, may indicate the level of its evolutional advances and relations. In all four investigated yeast species after mitosis, one nucleus revealed in mother and another in bud. It was important, that exactly after mitosis the nucleus in mother and daughter cell posses with one nucleolus.

Our data demonstrated that, first, we revealed the similar pattern of changes in mother cells budding on example of two species from one genus *Cryptococcus* and, second, differences between this species and members of another genus of basidiomycetous yeast – *Malassezia*. It was obvious, that the data relative to the pattern of changes during budding of mother cells was very important and perspective for taxonomical investigations and actually continue its. In contrast, the regularity of organelles transition during budding in system mother cell → bud and ultrastructure of developing bud was identical for all investigates yeast species in depending of its taxonomical position.

## REFERENCES

1. Hoog G.S. de, et al. Atlas of clinical fungi (a recent electronic version 3.1, 2011).
2. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. The yeasts a taxonomy study// Elsevier. – 2011. – Vol. 3. – 2080 p.
3. Khawcharoenporn T., Apisarnthanarak A., Mundy L.M. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review // Infection. – 2007. – Vol. 35, Is. 2. – P. 51-58.
4. Banerjee P., Haider M., Trehan V., et al. *Cryptococcus laurentii* fungemia // Case Report. – 2013. – Vol. 31, Is. 1. – P. 75-77.
5. Yamaguchi M., Shimizu K., Kawamoto S., et al. Dynamics of cell components during budding of *Cryptococcus albidus* yeast cells // Problems in Med. Mycol. – 2014. – Vol. 16, №1. – P. 29-35.
6. Yamaguchi M., Shimizu K., Kawamoto S., et al. Ultrastructural patterns of cellular components during budding in the yeast *Malassezia pachydermatis* // Problems in Med. Mycol. – 2014. – Vol. 16, №4. – P. 13-18.
7. Stepanova A.A., Yamaguchi M., Chibana H., Vasilyeva N.V. Electron microscopic investigation of cell components kinetics during budding in the yeast *Rhodotorula minuta* // (In press).
8. Yamaguchi M., Okada H. and Namiki Y. Smart specimen preparation for freeze substitution and serial ultrathin sectioning of yeast cells // J. Electron Microsc. – 2009. – Vol. 58. – P. 261-266.
9. Vasilyeva N.V., Stepanova A.A., Sinitskaya I.A. Peculiarities of *Cryptococcus neoformans* cell morphogenesis of in dependence on strain's virulence // Problems in Medical Mycology. – 2007. – Vol. 9, №4. – P. 23-30.
10. Marek D., Gabriel M., Kopecká M. Cytoskeletal structures, ultrastructural characteristics and the capsule of the basidiomycetous yeast *Cryptococcus laurentii* // Antonie van Leeuwenhoek. – 2007. – Vol. 92, Is. 1. – P. 29 - 36.
11. Yamaguchi M., Ohkusu M., Biswas S.K., Kawamoto S. Cytological study of cell cycle of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* // Jpn. J. Med. Mycol. – 2007. – Vol. 48. – P. 147-152.
12. Kozubowski L., Yadav V., Chatterjee G., et al. Ordered konetochore assembly in the human-pathogenic basidiomycetous yeast *Cryptococcus neoformans* // 2013. – Vol. 4, №5: Doi:10.1128/mBio. 800614-13.
13. Stepanova A.A., Bosac I.A., Sinitskaya I.A. The ultrastructure of natural strains of *Cryptococcus neoformans* cells // Problems in Medical Mycology. – 2010. – Vol. 12, №4. – P. 35-41.
14. David M., Gabriel M., Kopecká M. Microtubular and actin cytoskeletons and ultrastructural characteristics of the potentially pathogenic basidiomycetous yeast *Malassezia pachydermatis* // Cell Biology International. – 2007. – Vol. 31. – P. 16-23: doi: 10.1016/j.cellbi. 2006.09.001.

Поступила в редакцию журнала 15.06.2016  
Рецензент: Богомолова Т.С.



## ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В МНОГОПРОФИЛЬНОМ СТАЦИОНАРЕ

<sup>1</sup>Козлова Н.С. (доцент кафедры)\*, <sup>2</sup>Баранцевич Н.Е. (н.с.), <sup>2</sup>Иванова Л.В. (н.с.), <sup>2</sup>Гоик В.Г. (с.н.с.), <sup>2</sup>Баранцевич Е.П. (зав. ЦНИЛ)

<sup>1</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова (кафедра медицинской микробиологии); <sup>2</sup>Северо-Западный Федеральный медицинский исследовательский центр, Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2016

Методом серийных разведений определена чувствительность к 16 антибактериальным препаратам 315 штаммов энтеробактерий, выделенных из респираторного тракта и мочи пациентов многопрофильного стационара. Выявили большое разнообразие спектров антибиотикорезистентности энтеробактерий с высоким удельным весом полирезистентных культур. Наибольшую активность в отношении энтеробактерий в данном стационаре проявляли карбапенемы. Фосфомицин, амикацин и ингибитор-защищенные пенициллины сохраняли активность в отношении эшерихий. У штамма *Klebsiella pneumoniae*, выделенного из мочи, устойчивого к карбапенемам, обнаружили карбапенемазу NDM-1. Установлены различия в антибиотикорезистентности энтеробактерий различного происхождения, которые были наиболее выражены у эшерихий.

**Ключевые слова:** антибактериальные препараты, антибиотикорезистентность, карбапенемаза NDM-1, клебсиеллы, моча, респираторный тракт, энтеробактерии, эшерихии

## SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS OF DIFFERENT ORIGIN ENTEROBACTERIACEAE IN A MULTIDISCIPLINARY HOSPITAL

<sup>1</sup>Kozlova N.S. (associate professor of the chair), <sup>2</sup>Barantsevich N.E. (scientific collaborator), <sup>2</sup>Ivanova L.V. (scientific collaborator), <sup>2</sup>Goik V.G. (senior scientific collaborator), <sup>2</sup>Barantsevich E.P. (head of scientific research laboratory)

<sup>1</sup>North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (chair of medical microbiology); <sup>2</sup>North-Western Federal Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2016

By the serial dilution method the sensitivity to 16 antimicrobials of 315 strains of Enterobacteriaceae, isolated from the respiratory tract and urine of patients in multidisciplinary hospital has been determined. A great variety of antibiotic resistance spectra of Enterobacteriaceae with a high proportion of multidrug resistant crops was revealed. Sensitivity to carbapenems was observed in the majority of Enterobacteriaceae. Fosfomycin, amikacin and inhibitor-protected penicillins retained the activity against *Escherichia coli*. In *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from urine and resistant to carbapenems was found a carbapenemase NDM-1. The differences in the antibiotic resistance of different origin Enterobacteriaceae, which were most pronounced in *E. coli*, have been installed.

\* Контактное лицо: Козлова Надежда Сергеевна,  
Тел.: (812) 543-19-20

**Key words:** antibiotics, Enterobacteriaceae, *Escherichia*, *Klebsiella*, NDM-1 carbapenemase, resistance to antibiotics, respiratory tract, urine

## ВВЕДЕНИЕ

Распространение антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов приняло в настоящее время характер эпидемии. В большинстве стран устойчивость возбудителей инфекционных заболеваний к антимикробным препаратам (АМП) неизменно растет. Предотвращение формирования и распространения антимикробной резистентности признано ВОЗ в качестве глобальной проблемы и национального приоритета [1]. Выраженное разнообразие генов и механизмов резистентности особенно характерно для энтеробактерий, которые являются важными возбудителями как внебольничных, так и госпитальных инфекций разной локализации, в том числе инфекций мочевыводящих путей и респираторного тракта [2, 3]. При госпитальных инфекциях энтеробактерии по актуальности делят 1-2 места со стафилококками как во взрослых, так и в детских стационарах [1, 4-6]. Из них преобладают *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., при этом для энтеробактерий характерна устойчивость к антибиотикам разных групп [6, 7]. Ведущим механизмом резистентности к бета-лактамам у энтеробактерий стала выработка бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС), а также карбапенемаз, гены которых обычно локализованы на плазмидах и способны к переносу при внутривидовой, межвидовой и, даже, межродовой передаче; при этом микроорганизмы отличаются по ассоциированной резистентности к другим антибиотикам: гентамицину – до 80%, ципрофлоксацину – 40-60% [2]. Так, при исследовании 573 штаммов энтеробактерий из 25 стационаров 18 городов России в 2011-2012 гг. продукцию БЛРС обнаружили у 78,2% всех изолятов, в том числе у 90,6% *Klebsiella pneumoniae* и у 82,1% *E. coli* [8].

В силу сложных механизмов устойчивости и формирования полирезистентных штаммов выбор адекватного режима антибиотикотерапии нозокомиальных инфекций, вызванных энтеробактериями, представляет определенные сложности [9]. Учитывая высокий уровень резистентности энтеробактерий к антимикробным препаратам разного механизма действия и его выраженную вариабельность в зависимости от региона и даже стационара, очень важно изучение антибиотикорезистентности этих микроорганизмов, особенно выделенных в многопрофильных стационарах [2, 9], что и было целью нашего исследования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В 2011-12 гг. в многопрофильном стационаре г. Санкт-Петербурга из мочи пациентов с инфекциями мочевыводящих путей и респираторного тракта были выделены 315 штаммов энтеробактерий, в том числе 154 культуры *Escherichia coli*, 104 штаммов *Klebsiella pneumoniae*, 7 культур *Klebsiella oxitoca*, 35 штаммов *Enterobacter* spp., 11 культур других энтеробактерий (табл., Рис. 1).

Таблица 1.

Штаммы энтеробактерий, выделенные от больных в стационаре

Исследуемый материал	Количество выделенных культур				
	моча	мокрота	Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ)	Плевральная жидкость	Всего
<i>Escherichia coli</i>	124	25	7		156
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	65	12	26	1	104
<i>Klebsiella oxitoca</i>		7			7
<i>Enterobacter spp.</i>	11	21	3		35
<i>Serratia marcescens</i>		5			5
<i>Proteus mirabilis</i>	2	2	2		6
<i>Morganella morganii</i>	2				2
ВСЕГО	204	72	38	1	315

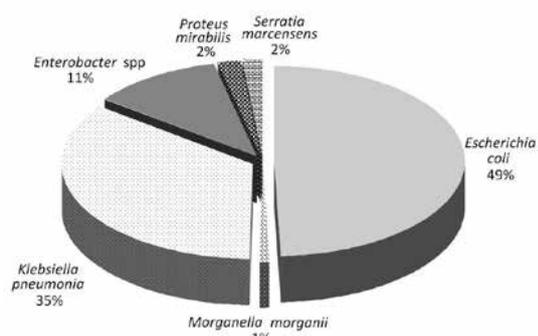


Рис. 1. Удельный вес энтеробактерий, выделенных от пациентов многопрофильного стационара.

Идентификацию этиологически значимых микроорганизмов осуществляли фенотипически и по последовательности первых 500 пар нуклеотидов гена 16SPHK [10]. Определение чувствительности выделенных чистых культур энтеробактерий к антибактериальным препаратам проводили методом серийных разведений в агаре Мюллер-Хинтон с диапазоном концентраций от 0,06 мкг/мл до 128 мкг/мл [11].

Установили чувствительность всех штаммов к 16 антибактериальным препаратам: ампициллину (Ap), цефотаксиму (Ctx), цефепиму (Cpm), цефиксиму (Cfx), цефтриаксону (Cta), комбинациям амоксициллин/клавуланат (Am/cl), пиперациллин/тазобактам (Pi/tz), цефоперазон/сульбактам (Cfp/sb), ципрофлоксацину (Cip), моксифлоксацину (Mox), имипенему (Im), меропенему (Mer), эртапенему (Ert), гентамицину (Gm), амикацину (Ak), фосфомицину (Fm). Использовали референтные штаммы *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218. Определение категорий чувствительности на основании полученных МИК выполняли в соответствии с рекомендациями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2013) [11]. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ SPSS Statistics 17.0 (США) [12]. Для фенотипического выявления карбапенемазной активности применяли модифицированный тест Ходжа. Детекцию генов карбапенемаз (KPC, NDM, OXA-48, VIM, IMP) проводили с использованием отечественных наборов методом ПЦР в реальном времени. Для точного определения выявленного гена исследовали последовательность нуклеотидов гена, отвечающего за продукцию карбапенемазы [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Большая часть изученных культур (81,9%) проявила устойчивость хотя бы к одному антибактериальному препарату, при этом удельный вес резистентных культур среди штаммов, выделенных из мочи, был ниже (75,0%), чем среди культур энтеробактерий, изолированных в этот же промежуток времени в данном стационаре из респираторного тракта (94,6%). Чувствительными ко всем препаратам были две культуры протея, высокий удельный вес чувствительных ко всем препаратам штаммов наблюдали у *E. coli* (35,3%). Все культуры клебсиелл и мorganелл были устойчивы хотя бы к одному антибиотику.

Среди энтеробактерий преобладали культуры, устойчивые к ампициллину (73,6%), ципрофлоксацину и моксифлоксацину (по 46,7%). Более трети штаммов были устойчивы к цефалоспорином III (по 42,2%) и IV (40,0%) поколения (Рис. 2).

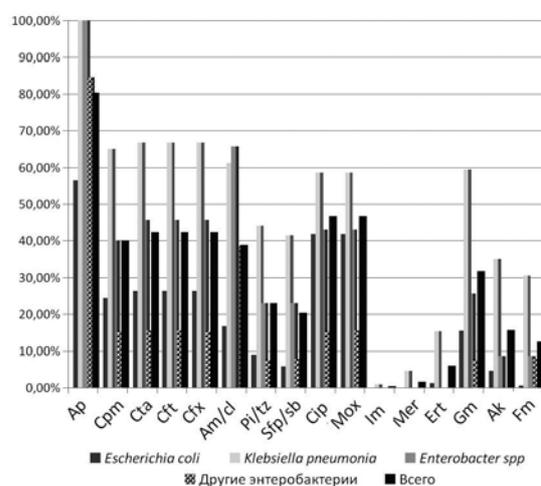


Рис. 2. Устойчивость энтеробактерий к антимикробным препаратам.

Полученные нами результаты коррелируют с данными по устойчивости энтеробактерий к цефалоспорином в других лечебных учреждениях Санкт-Петербурга. Так, среди *K. pneumoniae* и *E. coli*, выделенных в семи стационарах Санкт-Петербурга в 2012 г., удельный вес штаммов, устойчивых к цефалоспорином, колебался в различных стационарах для *E. coli* от 7,8 до 50%, для *K. pneumoniae* – от 25,4 до 88,4% [14]. В исследовании МАРАФОН в стационарах России устойчивость к цефалоспорином III-IV поколения выявлена более чем у 80% всех изолятов энтеробактерий, в том числе – более чем у 90% штаммов *K. pneumoniae* и более чем у 80% культур *E. coli* [8]. Основным механизмом устойчивости к цефалоспорином у энтеробактерий является продукция бета-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС), при этом гены, их кодирующие, часто локализованы на плазидах и распространены среди микроорганизмов. У нозокомиальных штаммов в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) стационаров России доля продуцентов БЛРС достигала 84% среди клебсиелл, 55% – среди эшерихий и 61% – среди протеев, отличаясь даже между стационарами одного города [15]. В зарубежных исследованиях показана меньшая распространенность продуцентов БЛРС среди энтеробактерий, однако количество таких культур и там постоянно возрастает [16, 17]. По данным большого между-

народного исследования (2011 г.), за период с 2008 по 2011 гг. в большинстве стран наблюдали выраженное возрастание удельного веса устойчивых к цефалоспорином III поколения культур, и ни в одной стране не отмечали снижения количества таких штаммов среди энтеробактерий [16, 17]. Таким образом, частоту БЛРС у энтеробактерий – возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ России можно считать рекордно высокой [15], что делает цефалоспорины неэффективными в лечении вызываемых этими микроорганизмами инфекций. При этом широкое использование цефалоспоринов, помимо роста резистентности к ним самим, сопровождается селекцией и распространением полирезистентных БЛРС-продуцирующих энтеробактерий (концепция «параллельного ущерб») [3, 18].

В определенной части случаев, в связи с гиперпродукцией БЛРС в отношении энтеробактерий, неэффективны и ингибитор-защищенные бета-лактамы – до 40,5% [1]. В нашем исследовании ингибитор-защищенные бета-лактамы не обладали высокой активностью в отношении энтеробактерий. Устойчивыми к амоксицилину-клавуланату оказались более трети изученных культур (38,7%), несколько большую активность проявляли комбинации пиперациллин/тазобактам (22,9% резистентных культур) и цефоперазон/сульбактам (20,3%).

Почти треть выделенных культур была устойчива к гентамицину (31,7%). Несколько большую активность проявляли амикацин (15,6% резистентных штаммов) и фосфомицин (12,4%). Наиболее активными среди изученных препаратов в отношении энтеробактерий оказались карбапенемы. Вследствие высокого удельного веса энтеробактерий, продуцирующих БЛРС и устойчивых к цефалоспорином, возросли роль и частота применения карбапенемов, которые в настоящее время широко используют в качестве препаратов стартовой эмпирической терапии, что создает условия для селекции представителей этого семейства, продуцирующих карбапенемазы [19]. До последнего времени удельный вес устойчивых к карбапенемам энтеробактерий в мире оставался невысоким. Так, в 2011 г. из 73920 штаммов энтеробактерий, выделенных в 28 странах, устойчивыми к карбапенемам были только 1,8%, причем большинство из них было выявлено в Греции [16]. Ранее считали, что в России резистентность энтеробактерий к карбапенемам практически отсутствует [9, 20], однако уже около десяти лет устойчивые к карбапенемам штаммы энтеробактерий регистрируют в разных регионах России [8, 14]. В исследовании МА-РАФОН резистентность к меропенему, имипенему и эртапенему проявляли, соответственно, 2,8%, 8,4% и 14,0% всех изолятов энтеробактерий. Наиболее высокую частоту устойчивости к карбапенемам отмечали среди изолятов *K. pneumoniae* – 4,9%, 14,6% и 22,0% соответственно [8]. В настоящее время удельный вес резистентных к карбапенемам культур достигает в отдельных стационарах 30% [4]. Среди энтеробактерий в проведенном нами исследовании устойчивость к карбапенемам была невысока. Так, только 6,0% штаммов были устойчивыми к эртапенему, 1,6% – к меропенему, и только 1 штамм клебсиеллы (0,3%) был устойчив к имипенему. Большинство устойчивых к карбапенемам культур – *K. pneumoniae* (89,5%), удельный вес резистентных к эртапенему культур среди них составил

15,3%. Устойчивость к цефалоспорином III поколения и карбапенемам является маркером полирезистентности энтеробактерий [17].

Наибольшей устойчивостью к антимикробным препаратам среди энтеробактерий в данном стационаре обладали штаммы клебсиелл. *K. pneumoniae* стала актуальным возбудителем нозокомиальных инфекций с 70 гг. прошлого столетия, чему способствовали ее выраженная способность к колонизации и приобретенная устойчивость к антибиотикам [21]. Несмотря на отсутствие первичной антибиотикорезистентности, за исключением синтеза умеренного количества пенициллиназ, *K. pneumoniae* является коллектором генов и плазмид резистентности [21, 22]. Вначале это были плазмиды резистентности к аминогликозидам, затем плазмиды, кодирующие БЛРС, часто совместно с устойчивостью к другим АМП. С этим сочеталось накопление хромосомных мутаций, кодирующих устойчивость к фторхинолонам. Уже с 2000 г. стали быстро распространяться полирезистентные штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие карбапенемазы, кодируемые конъюгативными плазмидами. Позднее такие плазмиды стали появляться и у *E. coli*. В некоторых странах более чем у половины больных с госпитальными инфекциями, вызванными *K. pneumoniae*, карбапенемы становятся неэффективными [1].

В проведенном нами исследовании удельный вес устойчивых к большинству изученных антимикробных препаратов культур клебсиелл был высок и колебался в диапазоне от 30,6% до 100% (Рис. 2). Наибольшую активность в отношении клебсиелл проявляли карбапенемы, особенно имипенем, к которому была выявлена только одна резистентная культура (0,9%). Данный полирезистентный штамм *K. pneumoniae* оказался устойчивым к 15 из 16 изученных нами антимикробных препаратов и проявлял чувствительность только к фосфомицину. При дополнительном определении чувствительности культуры еще к пяти антибиотикам установили ее чувствительность к азтреонаму, колистину, тетрациклину, доксициклину и тигециклину. Модифицированный тест Ходжа помог выявить у штамма карбапенемазную активность; далее с помощью ПЦР и последующего секвенирования по Сэнгеру был обнаружен ген NDM-1 [13].

В настоящее время широко описано большое количество карбапенемаз, относящихся, в основном, к трем молекулярным классам: А – карбапенемазы КРС типа, В – металло-бета-лактамазы VIM, IMP и NDM типов и Д – OXA-48 типа. В России устойчивость к карбапенемным антибиотикам, обусловленная продукцией карбапенемаз VIM-2, описана в 2006 г. и широко распространена среди *Pseudomonas aeruginosa* [23]. Однако среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* карбапенемазы были выявлены лишь недавно. Так, в 2012 г. опубликованы сообщения об обнаружении у *K. pneumoniae* карбапенемаз VIM-4 в Москве и OXA-48 – в Смоленске [24]; почти одновременно поступили сообщения о выявлении клебсиелл, продуцирующих карбапенемазы NDM-типа, из трех стационаров Санкт-Петербурга [14, 25], в том числе из многопрофильного стационара, в котором проводили данное исследование [13]. Данная карбапенемаза, обнаруженная в Индии в 2008 г., появилась, по данным ретроспективных исследований коллекций культур, не

позднее 2006 г. За несколько лет штаммы-продуценты карбапенемазы NDM-типа распространились по всему миру, и в 2012 г. их регистрировали в 40 странах на всех континентах, кроме Антарктиды и Южной Америки [23]. Появление в России новых карбапенемаз подтверждает крайне неблагоприятную глобальную тенденцию распространения устойчивости к карбапенемам, а выявление в многопрофильном стационаре *K. pneumoniae* – продуцента карбапенемазы является опасным прогностическим признаком, требующим строгого контроля для препятствия распространения устойчивости к карбапенемам.

В отношении энтеробактера и *E. coli* также наиболее активными были карбапенемы. Определенную активность сохранил амикацин (8,6% устойчивых штаммов энтеробактера и 4,5% *E. coli*). Для кишечной палочки характерной осталась чувствительность к фосфомицину, к которому была устойчива только одна культура (0,6%). Показано, что резистентность *E. coli* к этому препарату со временем меняется очень незначительно и во всем мире обычно не превышает 5%, что, возможно, связано с особенностями механизма его действия, препятствующего развитию к нему устойчивости [3]. К преимуществам препарата можно отнести отсутствие перекрестной устойчивости с другими антимикробными препаратами, а также доказанное предупреждение адгезии возбудителя к эпителию мочевыводящих путей, что делает фосфомицин по-прежнему актуальным для лечения инфекций мочевыводящих путей [3].

Среди энтеробактерий чаще выявляли штаммы, устойчивые к одному (20,6%) антимикробному препарату, значительно реже – культуры, устойчивые к трем (9,8%), двенадцати (7,9%), восьми (6,0%), одиннадцати (5,4%), семи (5,1%), девяти (4,8%) и десяти (4,4%) препаратам. Наибольшее разнообразие сочетаний устойчивости наблюдали у клебсиелл.

Почти половину культур (42,9%) составили полирезистентные (устойчивые к 3 и более препаратам разного механизма действия) штаммы, при этом удельный вес таких культур среди энтеробактерий, выделенных из мочи и респираторного тракта, был практически одинаков (43,1% и 42,3% соответственно), но различался у разных родов энтеробактерий (Рис. 3). Максимальное количество полирезистентных культур отмечали среди клебсиелл (67,6%). Самый низкий удельный вес полирезистентных культур был среди *E. coli* (26,9%), при этом в два раза выше среди штаммов, выделенных из мочи (29,8%), чем из респираторного тракта (15,6%).

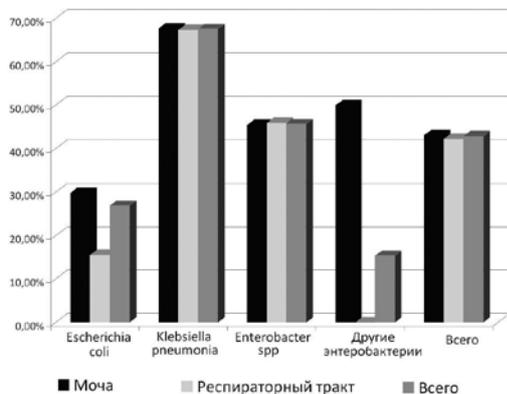


Рис. 3. Полирезистентные штаммы энтеробактерий.

При сравнении устойчивости к АМП энтеробактерий различного происхождения обнаружили некоторые различия в антибиотикорезистентности культур, выделенных из респираторного тракта и мочи пациентов стационара (Рис. 4). Доля устойчивых к большинству АМП у энтеробактерий была на треть, а к фосфомицину – в три раза больше у изолятов из респираторного тракта, чем из мочи. Исключение составил амикацин. Удельный вес устойчивых к последнему культур был в полтора раза больше у изолятов из мочи (18,2%), чем из респираторного тракта (12,6%). Число полирезистентных штаммов было одинаково в обоих биотопах (43,1% – в моче и 42,3% – в респираторном тракте).

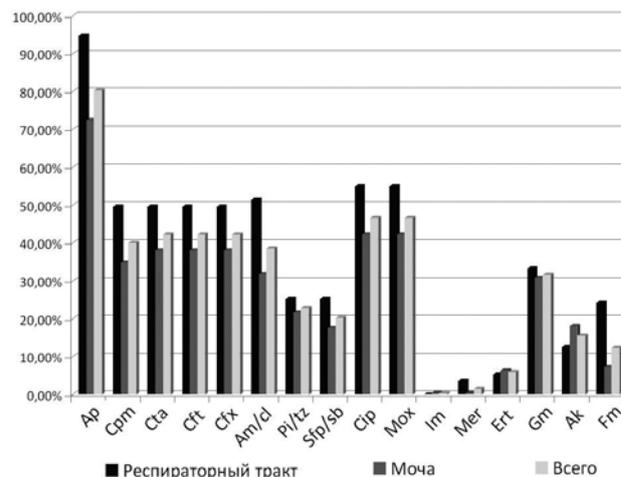


Рис. 4. Устойчивость энтеробактерий различного происхождения к антимикробным препаратам.

Наиболее выражены были различия в устойчивости в зависимости от источника выделения у эшерихий (Рис. 5). Так, удельный вес чувствительных штаммов был в два раза выше у *E. coli*, выделенных из мочи (39,5%), чем из респираторного тракта (18,7%), в то же время полирезистентные культуры наблюдали в два раза чаще в моче (29,8%), чем в респираторном тракте (15,6%).

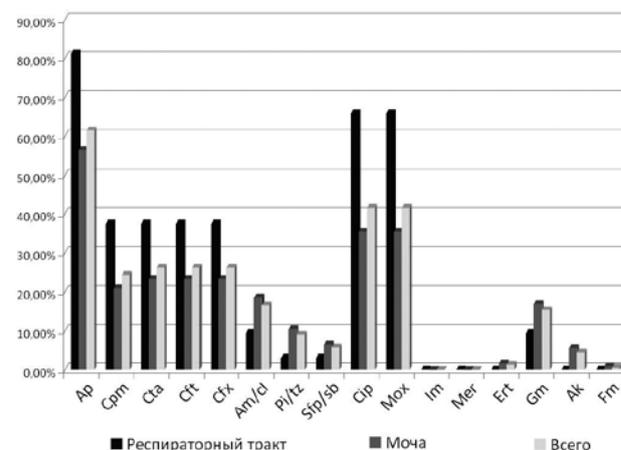


Рис. 5. Устойчивость эшерихий различного происхождения к антимикробным препаратам.

Устойчивость к ампициллину была наиболее распространенной в обоих биотопах, но в полтора раза выше у *E. coli*, выделенных из респираторного тракта (81,3%), чем из мочи (56,5%). Среди эшерихий, полученных из респираторного тракта, удельный вес

культур, устойчивых к фторхинолонам (65,8%) и цефалоспорином III (37,5) и IV поколения (37,5%), был почти в два раза больше, чем у выделенных из мочи (35,5%, 23,4% и 21,0% соответственно). В отношении других антибактериальных препаратов картина была противоположной – к гентамицину и ингибиторзащищенным бета-лактамам резистентных культур было больше в моче (к гентамицину – 16,9%, амоксициллин/клавуланату – 18,6%, пиперациллин/тазобактаму – 10,5% и цефоперазон/сульбактаму – 6,5%), чем в респираторном тракте (к гентамицину и амоксициллин/клавуланату – по 9,4%, пиперациллин/тазобактаму и цефоперазон/сульбактаму – по 3,1%). В респираторном тракте не обнаружили культур, устойчивых к амикацину, карбапенемам и фосфомицину, в то время как в моче 5,6% штаммов были резистентны к амикацину, 2 культуры оказались устойчивы к эртапенему (1,6%) и одна – к фосфомицину (0,8%).

Менее выражены были отличия в устойчивости клебсиелл (Рис. 6) и энтеробактера различного происхождения. Так, среди клебсиелл, полученных из респираторного тракта, удельных вес культур, устойчивых к фосфомицину (50,0%) и меропенему (8,7%), был значительно выше, чем у выделенных из мочи (16,9% и 1,5% соответственно). В отношении амикацина картина была противоположна – резистентных к нему культур было выявлено почти в 2 раза больше в моче (43,1%), чем в респираторном тракте (23,9%). Удельный вес штаммов с устойчивостью к остальным АМП был практически одинаков в обоих биотопах так же, как и число полирезистентных культур (67,4% – в респираторном тракте и 67,7% – в моче).

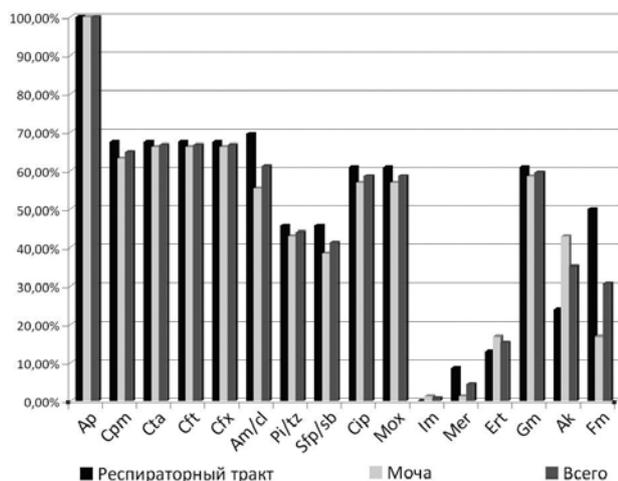


Рис. 6. Устойчивость клебсиелл различного происхождения к антимикробным препаратам.

Доля резистентных штаммов к большинству АМП у энтеробактера была больше среди штаммов, выделенных из респираторного тракта, чем из мочи. Исключение составили аминогликозиды и фосфомицин. Удельный вес устойчивых к последнему культур был более чем в два раза выше у изолятов из мочи (27,3%), чем из респираторного тракта (12,5%). Число полирезистентных штаммов было одинаково в обоих биотопах (46,0% – в респираторном тракте и 45,5% – в моче).

Всего у энтеробактерий обнаружили 58 спектров антибиотикорезистентности, наиболее распространенным среди них была моноустойчивость к ампициллину (20,6%). Значительно реже отмечали следующие

по распространенности наборы детерминант резистентности – к АрCipMox (7,6%) и к АрAm/Cl (5,4%).

В целом штаммы с одиннадцатью спектрами (Рис. 7) вместе составили более половины изученных культур (52,3%). Остальные 47 спектров были представлены единичными штаммами и составили вместе менее трети изученных культур (29,6%). Преобладающие спектры резистентности отличались в зависимости от рода энтеробактерий [26] и источника их выделения. Ряд наборов детерминант резистентности был характерен для определенного рода бактерий и выявлялся у него одного. Только два спектра устойчивости (к Ар и АрAmCl) наблюдали как у эшерихий, так и у клебсиелл и энтеробактера.

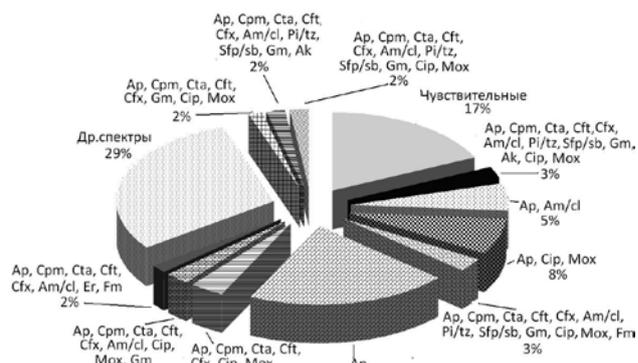


Рис. 7. Спектры антибиотикорезистентности энтеробактерий.

Разнообразие спектров антибиотикорезистентности служит показателем высокой гетерогенности циркулирующих в стационаре энтеробактерий, что позволяет предположить отсутствие широкого распространения в данном стационаре госпитальных штаммов энтеробактерий.

## ВЫВОДЫ

1. Среди энтеробактерий, выделенных из мочи и респираторного тракта пациентов многопрофильного стационара, преобладали антибиотикорезистентные культуры с высоким удельным весом полирезистентных штаммов (42,9%), которые чаще наблюдали среди клебсиелл (67,6%) и энтеробактера (45,7%).

2. Установили различия в антибиотикорезистентности энтеробактерий различного происхождения, наиболее выраженные у эшерихий, что может быть связано с особенностями терапии инфекций разной локализации. Доля устойчивых к большинству АМП культур была выше у энтеробактерий, выделенных из респираторного тракта. Удельный вес полирезистентных эшерихий был в два раза выше среди штаммов, полученных из мочи, чем из респираторного тракта.

3. Наибольшую активность в отношении энтеробактерий проявляли карбапенемы, особенно имипенем, к которому была выявлена только одна устойчивая культура *K. pneumoniae*. В отношении эшерихий сохраняли активность фосфомицин, к которому был устойчив только один штамм, амикацин и ингибиторзащищенные пенициллины.

4. Устойчивость к карбапенемам штамма *K. pneumoniae* была обусловлена продукцией карбапенемазы NDM-1 и сочеталась с полирезистентностью к фторхинолонам и аминогликозидам. Культура проявляла чувствительность к фосфомицину, доксици-

клину, тигециклину, азтреонаму, колистину и хлорамфениколу. Обнаружение в стационаре продуцентов новых карбапенемаз является опасным прогностическим признаком, подтверждающим неблагоприятную глобальную тенденцию распространения устойчивости к карбапенемам.

5. Вариабельность устойчивости энтеробактерий

к антимикробным препаратам и появление опасных для распространения генов резистентности штаммов является подтверждением необходимости проведения постоянного мониторинга антибиотикорезистентности микроорганизмов с анализом механизмов их устойчивости.

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*. – World Health Organization, Geneva, Switzerland. – 2014. – 232 p.
2. Сидоренко С.В. Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*: клиническое значение и этиотропная терапия // *Consilium Medicum*. – 2004. – Т. 6, №1. – С. 23-26.
3. Козлов Р.С., Голуб А.В. Выбор антимикробных препаратов при неосложненных инфекциях мочевых путей: как принять соломоново решение? // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2014. – Т. 16, №1. – С. 18-25.
4. Косякова К.Г., Каменева О.А., Морозова С.Е. Микробный пейзаж и уровень антибиотикорезистентности в отделении реанимации новорожденных // *Профилактическая и клиническая медицина*. – 2015. – №2. – С. 12-17.
5. Решедько Г.К., Рябкова Е.Л., Кречикова О.И. и др. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2008. – Т. 10, №2. – С. 96-112.
6. Решедько Г.К., Щебников А.Г., Морозов М.В. и др. *Escherichia coli* как возбудитель нозокомиальных инфекций в ОРИТ // *Клиническая микробиология и антимикробная терапия*. – 2012. – Т. 13, №4. – С. 314-321.
7. Руднев В.А., Бельский Д.В., Дехнич А.В. Инфекции в ОРИТ в России: результаты национального многоцентрового исследования // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2011. – Т. 13, №4. – С. 294-303.
8. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРА-ФОН в 2011-2012 гг. // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2014. – Т. 16, №4. – С. 254-265.
9. *Стратегия и тактика применения антимикробных средств в лечебных учреждениях России. Российские национальные рекомендации*. – М., 2012. – 92 с.
10. Пестова Н.Е., Баранцевич Е.П., Рыбкова Н.С. и др. Изучение эффективности применения метода секвенирования ДНК по фрагменту гена 16s рРНК для идентификации микроорганизмов // *Профилактическая и клиническая медицина*. – 2011, №4. – С. 57-59.
11. *EUCAST-(2013)* - [Электронный ресурс] - Режим доступа: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
12. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. – М.: Практика, 1999. – С. 27-121.
13. Barantsevich E.P., Churkina I.V., Barantsevich N.E., et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 carbapenemase in Saint Petersburg, Russia // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2013. – Vol. 68, №5:1204-6. doi: 10.1093/jac/dks503. Epub 2013 Jan 12.
14. Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Липская Л.В. и др. Штаммы энтеробактерий, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра и металлобета-лактамазу NDM-1, выделенные в стационарах в странах Балтийского региона // *Инфекция и иммунитет*. – 2013. – Т. 3, №1. – С. 29-36.
15. Галкин Д.В. Карбапенемы через 20 лет после открытия: современные микробиологические и клинические аспекты // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* – 2007; №2.-С. 133-152.
16. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of European Antimicrobial resistance surveillance network (EARS-net)*. – Stockholm: ECDC, 2012. – 79 p.
17. *The bacterial challenge: time to react ECDC/EMEA joint technical report*. – Stockholm: ECDC, 2009. – 42 p.
18. Козлов Р.С. Селекция резистентных микроорганизмов при использовании антимикробных препаратов: концепция «параллельного ущерба» // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* – 2010. – №12. – С. 284-94.
19. *Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) through patient transfer between healthcare facilities? With special emphasis on cross-border transfer*. – Stockholm: ECDC, 2011. – 63 p.
20. *Научный отчет о результатах многоцентрового исследования этиологии и антибиотикорезистентности энтеробактерий – возбудителей осложнённых интраабдоминальных инфекций в России*. Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии. – Смоленск, 2010.
21. Tzouveleki L.S., Markogiannakis A., Psichogiou M., et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2012. – Vol. 25, №4. – P. 682-707.
22. Pitout J.D.D., Nordmann P., Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2015. – Vol. 59, №10. – P. 5873-5884.
23. Агеев В.А., Лазарева И.В., Сидоренко С.В. Проблема устойчивости к карбапенемным антибиотикам: распространение карбапенемаз в мире и России, эпидемиология, диагностика, возможности лечения // *Фарматека*. – 2015. – №14. – С. 9-16.
24. Shevchenko O.V., Mudrak D.Y., Skleenova et al. First detection of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Russia // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – №18. – P. 214-217.
25. Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S. et al. Emergence of carbapenemase producing gram-negative bacteria in Saint-Petersburg, Russia // *J. Antimicrob. Agents*. – 2014. – №44. – P. 152-155.
26. Козлова Н.С. Баранцевич Н.Е., Иванова Л. и др. Антибиотикорезистентность энтеробактерий, выделенных из мочи пациентов многопрофильного стационара // *Проблемы медицинской микологии*. – 2015. – Т. 17, №3. – С. 22-26.

Поступила в редакцию журнала 11.08.2016

Рецензент: Л.А. Кафтырева

## НЕРИБОСОМАЛЬНЫЕ ПЕПТИДЫ ГРИБОВ: БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ИХ ПЕРСПЕКТИВЫ В МЕДИЦИНЕ

<sup>1</sup>Куварина А.Е. (м.н.с.), <sup>2</sup>Кураков А.В. (зав. кафедрой), <sup>1</sup>Садыкова В.С. (в.н.с.), <sup>3</sup>Громовых Т.И. (профессор кафедры)

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе РАН; <sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (биологический факультет, кафедра микологии и альгологии); <sup>3</sup> Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (кафедра биотехнологии), Москва, Россия

© Коллектив авторов, 2016

*Обзор посвящен изучению нерибосомальных пептидов грибов, механизму их действия и биологической активности. Приведены данные по описанию новых нерибосомальных пептидов грибов за последние 10-15 лет, а также результаты исследований, касающиеся механизма их действия.*

**Ключевые слова:** биологическая активность, грибы, нерибосомальные пептиды

## NON-RIBOSOMAL PEPTIDES OF FUNGI: BIOLOGICAL ACTIVITY AND THEIR FUTURE POTENTIAL IN MEDICINE

<sup>1</sup>Kuvarina A.E. (junior scientific collaborator), <sup>2</sup>Kurakov A.V. (head of the chair), <sup>1</sup>Sadykova V.S. (leading scientific collaborator), <sup>3</sup>Gromovykh T.I. (professor of the chair)

<sup>1</sup> G.F. Gauze Research Institute to Find New Antibiotics of RAS; <sup>2</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University (faculty of biology, chair of mycology and algology); <sup>3</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (chair of biotechnology), Moscow, Russia

© Collective of authors, 2016

*The review is concerned to investigation of non-ribosomal peptides of fungi, mechanism of their biosynthesis and biological activity. The data of the new non-ribosomal peptides of fungi for the last 10-15 years, as well as the results of studies concerning their mechanisms of action have been described.*

**Key words:** biologically activity, fungi, non-ribosomal peptides

Нерибосомальные пептиды грибов (НП) – соединения, синтез которых осуществляется энзиматически комплексами без участия рибосом, разнообразны по химической структуре и биологическим свойствам [1-2]. Эти пептиды являются вторичными метаболитами, образуются в стадии идиофазы, когда прекращается активный рост гриба, или при создании специфических условий культивирования – добавлении предшественников. Интерес к ним резко возрос в последнее время в связи с перспективами использовать их для разработки лекарственных препаратов нового поколения [1, 3]. Эти пептиды рассматривают в качестве молекул-кандидатов, с помощью которых можно преодолеть устойчивость к антибиотикам у патогенных микроорганизмов, вирусов и раковых клеток.

Классификация этих соединений основана на пространственной структуре пептидов. Биологически активные пептиды обладают составом со сложной архитектурой, включающим разветвленные циклические структуры и линейные молекулы, содержащие модифицированные кодируемые или нестандартные аминокислотные остатки [2-4]. Для их описания даны физико-химические характеристики, источник происхождения, размер молекулы, первичная структура, тип биологической активности, механизм действия и синтеза.

В настоящей статье обобщены данные об открытых в последние два десятилетия биологически активных нерибосомальных пептидах грибов, рассмотрены особенности их механизмов действия на организмы и возможное применение в фармацевтике.

Грибные НП воздействуют на прокариотические и эукариотические клетки, вирусы и многие биохимические процессы в клетке, проявляют гемолитическую активность. Поэтому среди них обнаружены различные практически значимые соединения – противоопухолевые, противовирусные, активные против определенных групп бактерий и грибов, насекомых, иммуносупрессоры и иммуномодуляторы.

Общая особенность этих пептидов, для которых используют также термин антимикробные пептиды (АМП), обусловлена их воздействием на клеточные мембраны. В присутствии липидной мембраны они преимущественно образуют амфифильную структуру, в которой заряженные (полярные) и гидрофобные группы пространственно разделены. Специфичность их действия, как правило, определяется липидным составом мембраны. Одни из них проникают в мембраны и вызывают их разрушение за счет уменьшения ее толщины, связываясь с фосфолипидами, приводят к изменению трансмембранного электрохимического потенциала и оттоку жизненно необходимых для клетки ионов [3, 5].

В состав бактериальных мембран входит большое количество отрицательно заряженных фосфолипидов (например, фосфатидилэтиленамид у грамотрицательных бактерий или фосфатидилглицерин – у грамположительных). Эукариотические мембраны содержат электронейтральные липиды, например, фосфатидилхолины и фосфатидилсерины. Таким образом, положительно заряженные, или катионные АМП селективно разрушают мембраны бактерий благодаря наличию отрицательного заряда на их поверхности. Молекулы таких пептидов легко проникают через внешнюю мем-

\* Контактное лицо: Куварина Анастасия Евгеньевна, e-mail: nastena.lysenko@mail.ru

брану граммотрицательных бактерий, дестабилизируя ее путем замещения двухвалентных катионов, связанных с молекулами липидного бислоя. В результате на внешней мембране клетки образуются поры и вздутия, что позволяет большому количеству пептидов проникать внутрь к цитоплазматической мембране. При взаимодействии АМП с мембраной грамположительных бактерий важную роль в дестабилизации липидного бислоя играют и такие факторы, как концевые аминокислотные остатки пептидов, «мембранный ответ» (структурно-динамические изменения мембран), гетерогенность поверхностных свойств водно-липидного раздела и ряд других. Они обусловлены различиями аминокислотного состава пептидов и химического строения полярных головок липидов и являются молекулярной основой селективности мембранно-активных пептидов (МАП) к различным типам мембран. Так, АМП-аламетицин проявляет активность в отношении многих прокариот, имеющих высокое содержание в мембранах фосфатидилэтиленамида, при гораздо более низких концентрациях, чем для эукариот [6].

Наибольшую активность наблюдают у структурированных  $\alpha$ -спиральных пептидов с высоким суммарным положительным зарядом молекулы и выраженной амфифильностью (или амфипатичностью – для линейных молекул), однако увеличение этих параметров ведет к росту гемолитической активности и падению специфичности. Пептаиболы, например, формируют потенциал-зависимые ионные каналы в липидной двухслойной мембране с многоуровневой проводимостью и селективностью в отношении моновалентных катионов, что, в конечном итоге, приводит к гибели клетки за счет процесса необратимой односторонней проницаемости мембраны. Они вызывают связку гидрофобных трансмембранных спиралей вокруг центральной поры и формирование каналов [1-2]. Действие их зависит от пространственной конформации пептида, рН, фазового состояния, липидного состава мембраны и ряда других факторов. При сравнительном исследовании аламетицина, трихотоцина и антиамебина по углу подъема витка спирали относительно основной цепи обнаружили, что от угла наклона витка спирали зависит их активность. Вышеупомянутые три пептаибола сильно различаются по углу наклона спирального витка к центральной оси (около  $10^\circ$  у трихотоцина,  $30^\circ$  – для аламетицина и почти  $60^\circ$  – для антиамебина). Эти особенности их строения существенно влияли на формирование ионных каналов и мембранных комплексов в липидном бислое клетки-мишени. Чем больше этот угол, тем выше была мембранная активность пептаибола [7]. При разрушении и частичном лизисе цитоплазматической мембраны пептаиболы способны вызывать ультраструктурные изменения уже внутри клетки. Так, клетки *F. oxysporum*, обработанные трихокоцином из *Trichoderma pseudokoningii* SMF2 в концентрации 25 мМоль, через 16 часов были резко вакуолизированы, у митохондрий разрушена структурная организация крист. Этот пептаибол вызывал апоптоз клеток фитопатогенных грибов в концентрации 50 мМоль. Конечный результат действия всех АМП, при наличии некоторых отличий во взаимодействии с клетками-мишенями, проявляется в нарушении целостности и барьерной функции клеточной мембраны микроорганизма-мишени (пермеабил-

лизация) [8].

#### **Циклические нерибосомальные пептиды с антимикробной активностью**

У грибов преобладают циклопептиды и циклодепептиды, которые более устойчивы к физико-химическим воздействиям и гидролизу пептидазами, чем линейные пептиды. Важное свойство циклических пептидов – их большие возможности к конформационным модификациям при взаимодействии с мишенью. Нарушение циклической структуры часто приводит к потере их биологической активности.

Среди циклических НП грибов есть широко применяемые в лечебной практике антибиотики и иммуносупрессоры. Самые известные из них – циклоспорины и эхинокандины.

**Циклоспорины** – циклические полипептиды, состоящие из 11 аминокислотных остатков и образуемые мицелиальными грибами *Tolypocladium infatum*, *Trichoderma polysporum*, *Cylindrocarpon lucidum*. Впервые эти антибиотики были описаны в конце 70-х годов прошлого столетия. Представители этих видов образуют ряд близких по структуре циклоспоринов – циклоспорины А, В, С, ... U, V, W. Интерес к этой группе антибиотиков связан не с их антимикробной активностью, которая не столь высокая, а тем, что циклоспорины обладают специфическим иммуносупрессорным действием. Они специфически и обратимо ингибируют G0 и G1 фазы клеточного цикла иммунокомпетентных лимфоцитов, особенно Т-хелперов, подавляют образование и выход из клеток интерлейкина-2 и его связывание со специфическими рецепторами, нарушают дифференцировку и пролиферацию Т-клеток, участвующих в отторжении трансплантата. Циклоспорины применяют при операциях по пересадке различных органов (для предотвращения отторжения трансплантата, лечения реакции отторжения), костного мозга (профилактика реакции отторжения, профилактика и лечение болезни «трансплантат против хозяина»), хроническом гломерулонефрите, сопровождающемся развитием нефротического синдрома, ревматоидном артрите с высокой степенью активности, псориазе, тяжелых формах атопического дерматита.

Иммунодепрессантные свойства циклоспорины впервые были обнаружены у почвенного изолята микроскопического гриба сотрудниками фирмы Сандос. Штамм был определен как *Trichoderma polysporum* Rifai, переопределен как *Tolypocladium inflatum* W. Gams и депонирован в коллекцию Департамента Сельского Хозяйства (США) под номером NRRL 8044. Несмотря на открытие и введение в практику новых иммунодепрессантов, циклоспорины уже более 20 лет являются одними из наиболее распространенных препаратов иммуносупрессивной терапии при трансплантации органов [1-2].

**Эхинокандины** – циклические липопептиды с длинными остатками жирных кислот. Эхинокандины представляют собой N-ацетилированные водорастворимые липопептиды, ковалентно связанные с алифатическими радикалами, блокирующие синтез глюканов – компонентов клеточной стенки у грибов. Известные продуценты эхинокандинов: *Glarea lozoyensis* Bills & Pelaez – продуцент кансофунгина, *Aspergillus aculeatus* Iizuka – акулеоцина А, *Zalerionar arboricola* Buczacki – пневмокандина, *Aspergillus sydosi* var.

*mulundesis* – мулундокандина. Эхинокандины являются новым классом антимикотиков, блокирующих синтез (1,3)- $\beta$ -D-глюкана – структурного и функционального компонента клеточной стенки грибов. Спектр активности эхинокандинов составляют виды родов *Aspergillus* (включая штаммы, резистентные к амфотерицину В), *Candida* (в том числе изоляты, резистентные к флуконазолу и итраконазолу), *Pneumocystis jirovecii*. Эхинокандины обладают ингибирующим действием в отношении мицелиальных грибов родов *Acremonium*, *Curvularia* и *Bipolaris*, но не активны против представителей родов *Cryptococcus*, *Scedosporium* и *Fusarium*. Природные эхинокандины обладают сильным гемолитическим действием и высокотоксичны, поэтому их не применяют в медицине. На их основе создают менее токсичные химически модифицированные антимикотики – капсофунгин и цилофунгин.

Помимо этих, применяемых в клинике НП, в настоящее время в разработке находятся несколько циклических пептидов, у которых установлена высокая фунгицидная, протозойная или цитотоксическая активность. Это, в первую очередь, такие соединения как психрофилин D, мулундокандин и дезоксимулундокандин, ауребазидин А, акремолиды, альтернарамид, склеротиды, цикадапептины и некоторые другие [8, 9].

**Психрофилин D** – циклический нитропептид, в состав цикла входят триптофан, антралиловая кислота;  $\alpha$ -аминная группа триптофана превращена в нитрогруппу. Его синтез обнаружен у *Penicillium algidum*. Вещество активно против клеток лейкемии мышей P388 [1].

**Мулундокандин и дезоксимулундокандин** – липоциклопентапептиды, для которых характерно наличие необычных аминокислот в циклопентапептидах – Thr, Ser, 4-OH-Pro, 4-CH<sub>3</sub>-3-OH-Pro, 3,4-диокси-гомотирина и 3-оксигомотирина. Показано, что 12-метилтетрадекановая кислота, входящая в состав молекулы этих антибиотиков, ацилирует свободную аминную группу и способствует вхождению молекулы внутрь микробной клетки [10, 11].

**Ауреобазидин А** – циклический депсипептид, который состоит из 8 L-аминокислот, связанных через оксикислоту в кольцевую структуру. Его продуцирует *Aureobasidium pullulans*, и это соединение активно ингибирует виды рода *Candida* и *Histoplasma capsulatum*. Особую перспективность для медицины **ауреобазидина А** связывают с его эффективным действием в отношении *Toxoplasma gondii*.

#### **Линейные нерибосомальные пептиды с антимикробной активностью**

Линейные нерибосомальные пептиды грибов подразделяют на имеющие конформацию  $\alpha$ -спирали и пептиды с повышенным содержанием в своем составе той или иной аминокислоты (обогащенные пролином, триптофаном или гистидином). Амфифильный характер линейных пептидов способствует такой взаимосвязи с мембранами, при котором полярные участки пептида взаимодействуют с полярной «головкой» фосфолипида, а гидрофобные участки пептида – с жирнокислотными остатками мембраны путём гидрофобных взаимодействий.

Представители рода *Tolyocladium* продуцируют **эфрапептины**, проявляющие широкий спектр биологической активности. Так, штамм *Tolyocladium niveum*

*var. inflatum*, изолированный из образца ила Японского моря (побережье Японии), синтезирует линейный пентадекапептид **эфрапептин J**. Этот пептид дозозависимо ингибировал 2-деоксиглюкозо-индуцируемую экспрессию люциферазы в клетках HT1080 (фибросаркома человека). Эфрапептин J блокировал экспрессию GRP78 в клетках HT1080 и MKN-74 (рака желудка человека) и индуцировал апоптоз в клетках HT1080 [180]. Ряд эфрапептинов является ингибиторами митохондриальной АТФ-азы, F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> некоторых бактериальных синтаз АТФ и фотофосфорилирования в растениях. Противопаразитарная активность в отношении *Trypanosoma* связана с нарушением митохондриального мембранного потенциала и митохондриальной F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> АТФазы паразита [9].

**Интеграмыды А и В** синтезируют многие виды гипокреинных грибов. Продуценты интеграмыды А часто обнаруживали среди представителей рода *Dendrodochium*. С помощью геномодифицированных штаммов *E. coli* был синтезирован ряд аналогов диастереомерных интеграмыдов А, содержащих пролины вместо гидроксипролина. Интеграмин А имеет аминокислотную кислоту в положении 8, а интеграмыд В – изовалин. С-концевой аминокислотный остаток представляет собой свободный карбоксил, а N-концевой ацетилирован. Интеграмыды секретируются продуцентами в культуральную жидкость [Singh A., et al. // Organic letters. – 2002. – Vol. 4, №9]. Интерес к этим соединениям связан, в первую очередь, с их противовирусной активностью. В 2010 г. они вошли в список потенциальных перспективных противовирусных соединений для лечения ВИЧ-инфекций, рекомендуемых для доклинических исследований в США. Интеграмыды ингибируют ВИЧ-интегразу – один из ключевых ферментов для интеграции ВИЧ в геном хозяина и сборки провирусной ДНК. Подавление интегразы ведет к эффективной блокировке репликации ВИЧ в клетке, а сам фермент представляет собой безопасную мишень.

Энтомопатоген *Cordyceps heteropoda* синтезирует **цикадапептиды I и II** с противовирусной (вирус табачной мозаики), антибактериальной (в отношении *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*) и фунгицидной (к *Botrytis cinerea* и *Fusarium oxysporum*) активностями.

**Пептаиболы** представляют широкую группу линейных пептидов. Впервые образование соединения из класса пептаиболов – аламецина обнаружили у штамма *Trichoderma viride* F30. На сегодняшний день известно, что аламецин является смесью из 12 близкородственных пептаиболов, которые синтезируются, в основном, почвенными аскомицетами и их анаморфами из родов *Trichoderma*, *Emericellopsis*, *Fusarium*. У сапротрофных микромицетов синтез таких пептидов связан с механизмами антагонизма, а у фитопатогенных грибов они играют роль сигнальных молекул. Сравнительно недавно появились сведения о выделении пептаиболов с антимикробной и противоопухолевой активностями из морских грибов-паразитов. К настоящему времени в базе пептаиболов имеются сведения о 1043 соединениях, из которых более 600 – обнаружены у видов триходерм [12].

Пептаиболы содержат высокое количество  $\alpha$ -аминоизомасляной кислоты и не протеиногенных аминокислотных остатков, таких как L- и

D-изовалин, цис- и транс-4-L-гидроксипролин, цис-4-L-метилпролин, β-гидрокси-L-лейцин, β-аланин, L-пипеколиновая кислота, α-этилнорвалиновая и 2-амино-4-метил-6-гидрокси-8-оксоиканоиновая кислота. Перспективность исследования пептаиолов обусловлена тем, что к ним практически не возникает резистентность у клеток-мишеней [13].

**Зервамицин ПВ** – наиболее изученный из пептаиолов, в настоящее время его внедряют в клиническую практику. Его продуцирует *Emericellopsis salmosynnemata*, и он, как и многие линейные полипептидные антибиотики, способен образовывать потенциал-зависимые ионные каналы в мембране клеток. Согласно существующим моделям, каналы формируются из агрегатов молекул зервамицина, стабилизированных водородными связями между остатками Gln и Nup.

Для видов рода *Trichoderma* характерны пептаиолы, состоящие из 7-20 остатков аминокислот (обычно 18-20) с пролином по центру, имеющие характерную ацетилированную N-концевую аминокислотную и C-концевую остаток, восстановленный до аминок спирта (например, фенилаланинол, лецинол или валинол), и высокое содержание 2-амино-изобутирата. Их синтез катализируется доменной нерибосомальной пептидной синтетазой (NRPSs). При геномном секвенировании трех штаммов рода *Trichoderma* из главных групп продуцентов пептаиолов выявили присутствие до трех типов NRPSs для синтеза пептидов с 7-14 или 18-20 аминокислот.

Пептаиолы, продуцируемые штаммами рода *Trichoderma*, объединены в 1, 4, 5 и 9 подгруппы. Подгруппа 1 (SF1) включает приблизительно половину всех известных пептаиолов с 18-20 остатками аминокислот, часть из которых у них сходная. Штаммы *T. harzianum*/ *Hypocrea lixii* продуцируют, в основном, трихозин HA, MA и PA, триховирин II, трихотоцин и трихокиндин; *Hypocrea atroviridis* – гипомуразин B; *T. asperellum* – трихотоцин и трихостроматин; все это соединения из 18 аминокислот. *T. stromaticum* и *T. strigosum* синтезируют пептаиолы из 19 аминокислот – триконингин, трихостригоцин и трихолонгин (Neuhof et al., 2007). Из *T. reesei* / *Hypocrea jecorina*, *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride*, *T. pubescens* и *T. strictipile* был выделен парацелин, из *T. longibrachiatum* и *T. ghanense* – лонгибрахин, из *T. hamatum*, *H. atroviridis* и *T. brevicompactum* – аламетицин, пептаиолы, содержащие по 20 остатков аминокислот.

Подгруппа 4 объединяет пептаиолы, содержащие 11 или 14 аминокислотных остатков. Большинство пептаиолов из этой подгруппы содержат 11 аминокислотных остатков: триховерин – из *T. viride*, трихорзин и харзианин HBI – из *T. harzianum* / *H. lixii*, харзианин HKVI – из *T. pseudokoningii*, гипомурацин A – из *H. atroviridis* и трихофумин A и B – из *Trichoderma* spp.

Подгруппа 5 содержит пептиды из 11 аминокислотных остатков, подгруппа 9 – из 7 остатков, но из-за липофильных характеристик N-концевой группы их называют липопептаиолами. *T. longibrachiatum* (трихогин), *T. koningii* (триконингины), *T. polysporum* (трихополины) и *T. viride* (триходоценины) продуцируют эти группы. C-концевая точка пептаиолов может быть аминокислотом – лейцинолом (Lol), фенилаланиолом (Phol) и валинолом (Vol). C-концевой аминокислотный

остаток у других пептаиолов может быть амином, амидом, свободной аминокислотой, 2,5-диоксопиперазином или сахарным спиртом. Наиболее известные из них: трихогин, триконингин и триходоценин – из *T. longibrachiatum*, *T. koningii* и *T. viride*, липостригоцин – из *T. strigosum* и *T. pubescens*. Подгруппа 9 содержит всего несколько пептаиолов, например, трихополин из *T. polysporum* [12-14].

Пептаиолы эффективно ингибируют грамположительные бактерии и дрожжи, могут активировать защитные механизмы у растений. Пептаиол трихоконин из *T. pseudokoningii* SMF2, активизирует антибиотическую активность в отношении грибных патогенов у растений. Трихоконин IV (TKVI) индуцирует обширный апоптоз у *F. oxysporum*. Обработка растений табака пептаиолами повышала их устойчивость к вирусу табачной мозаики [13].

Показано, что пептаиолы оказывают схожее с кальцитонином (гормоном, секретируемым щитовидной железой) действие на систему гемостаза в ответ на повышение уровня кальция в крови. Пептаиолы *T. polysporum* – трихоспорины B-VII и B-VIIb проявляют антитрипаносомазную активность, в частности, к *Trypanosoma brucei*.

В последние годы большой прогресс был сделан в понимании биологической активности и установлении структуры пептаиолов. Для определения их аминокислотной последовательности использовали современные методы – CID-MS, LC-ESI-MS и IC-MALDI-TOF-масс-спектрометрии [12]. В результате была создана детальная база данных пептаиолов – <http://www.crysl.bbk.ac.uk/peptaibol>.

Во множестве работ, посвященных пептаиолам, показано, что эти пептиды обладают ценными лечебными свойствами. Они препятствуют репликации оболочек вирусов гриппа А, везикулярного вируса стоматита, ВИЧ, формированию β-амилоидных пептидов в культуре клеток коры головного мозга свиней, способствуют заживлению ран.

Нами была изучена антибиотическая активность 48 штаммов рода *Trichoderma* и выявлен штамм *Trichoderma citrinoviride* ВКПМ F-1228, обладающий широким спектром антимикробной активности в отношении *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* и других видов аспергиллов [15]. В качестве основного действующего вещества был идентифицирован комплекс мембрано-активных пептидов – пептаиолов, синтез которых сопряжен со стадией образования спор в культуре и интенсивным конидиогенезом. Было выделено 4 индивидуальных соединения из группы пептаиолов, которые проявляли антимикотическую активность на условно-патогенных грибах, бактериях и на клинических штаммах аспергиллов. Они ингибировали рост патогенных изолятов *A. ochraceus* 497M и *A. niger* 646M – возбудителей бронхолегочного аспергиллеза, которые были резистентны к амфотерицину В. При сравнении по базе данных спектра биологической активности и молекулярных масс этих соединений с характеристиками известных пептаиолов одно вещество было отнесено к трихорзину. Четыре других соединения не удалось отнести к известным пептаиолам, но они также могут быть из данной группы перспективных для применения в медицине биологически активных веществ [16].

**Биотехнология нерибосомальных пептидов грибов и их потенциал в фарминдустрии**

Большинство производимых фармацевтической промышленностью антибиотиков, начиная с 50-х годов прошлого века и до последнего десятилетия, в основном являются полусинтетическими производными природных веществ. За этот период достигнуты крупные успехи в лечении широкого спектра инфекционных заболеваний. С 1980 г. ежегодно регистрируют только около 20 новых антибиотических препаратов, и это число остается постоянным, несмотря на большую потребность в таких лекарствах и обнаружение множества новых активных природных соединений [1, 17-19].

В последние годы фармацевтические компании ориентированы на исследование веществ с молекулярной массой не выше 1500 Да. Это обусловлено тем, что их удобно химически модифицировать и получать на их основе лекарства, применяемые перорально. В эту группу биологически активных соединений попадают и мембранно-активные нерибосомальные пептиды с невысокой молекулярной массой (табл. 1).

Таблица 1.

**Перспективные для создания новых лекарственных препаратов антимикробные пептиды грибного происхождения**

Пептид	Продуцент	Механизм действия	МПК <i>in vitro</i> (мг/мл)	Патогенные организмы - мишени
Акулеацин	<i>A. aculeatus</i>	синтез гликанов	0,2	<i>C. albicans</i>
Ауреобазидин	<i>A. pullulans</i>	блокирует белок актин	0,5	<i>C. neoformans</i> , <i>T. gondii</i>
Гелиоферин	<i>M. rosea</i>	неизвестен	5,0	<i>C. albicans</i>
Лейциноста-тин А	<i>P. lilacinum</i>	неизвестен	0,5	<i>C. neoformans</i>
Мулунокандин	<i>A. syndowy</i>	синтез гликанов	31,3	<i>A. niger</i>
Трихополиин	<i>T. polysporum</i>	неизвестен	0,8	<i>C. albicans</i>
Зервамицин IV	<i>E. salmosynnemata</i>	проницаемость мембраны	0,7 – 0,9	<i>S. aureus</i>

Интерес к ним вызван их довольно высокой специфичностью и способностью эффективного действия на резистентные к антибиотикам клетки, структурное и функциональное разнообразие. Пептидные антибиотики и иммуносупрессоры из грибных продуцентов, открытые в 70-80-е гг. прошлого столетия, успешно применяют в клинике уже более 20 лет.

Успехи в изучении механизма биосинтеза и биологической активности нерибосомальных пептидов пробудили генно-инженерный интерес перепрограммировать НРПС (нерибосомная пептидная синтетаза) на получение новых пептидов, более эффективных по фармакологическим показателям. Предполагают несколько стратегий генетических манипуляций с целью изменения субстратной специфичности домена А, замены целых модулей. Для этого используют разнообразные методы генной инженерии: модульный обмен с участием плазмид, диффузию модульных белков, хемоэнзиматический биосинтез с использованием циклаза, мутагенез, блокирующий некоторые энзиматические пути. Однако достижение высокой экспрессии специфических генов в клетке не всегда коррелирует с уровнем накопления соответствующих пептидов, уровень экспрессии которых также зависит от белков-регуляторов [18, 19]. Сейчас разрабатывают ряд интересных новых генно-инженерных технологий получения активных пептидов грибов посредством белкового

сплайсинга и перепрограммирования генетического кода [17, 18].

Особый интерес в медицине за последние два десятилетия вызывает исследование пептидов в качестве потенциальных геропротекторов, основанных на биорегуляции клеточных процессов, ассоциированных с молекулярными аспектами старения организма. Данные пептиды могут быть рассмотрены в качестве регуляторных факторов, направленных на ряд молекулярно-генетических процессов, происходящих в соматических клетках организма (например, контролирование экспрессии генов, участвующих в клеточном делении), что, в конечном итоге, приводит к потенциальной задержке процесса естественного старения. Так, на базе Санкт-Петербургского Института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН под руководством член-корр. РАН Р.Х. Хавинсона разработаны уникальные пептидные комплексы животного происхождения, направленные на лечение широкого спектра заболеваний, что для нашей страны является уникальным случаем успешного применения молекул данной группы в медицине и фармакологии. Другим примером эффективного применения препаратов на основе полипептидов является препарат с коммерческим названием «Кортексин», разработанный сотрудниками Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (г. Санкт-Петербург) также совместно с Институтом биорегуляции и геронтологии. Основа этого соединения представляет собой комплекс нейропептидов коры головного мозга свиней, обладающих ноотропным действием и обеспечивающих активацию функций коры головного мозга (в том числе мозгового кровообращения), восстановления нейронов и основных процессов центральной нервной системы. В качестве еще одного успешно используемого коммерческого препарата можно привести «Копаксон», выпускаемый израильской фармацевтической корпорацией «Teva Pharmaceutical Industries», который представляет собой ацетат глатимера – комплекса, состоящего из четырех L-изомеров глутамата, аланина, тирозина и лизина, обеспечивающих целенаправленное лечение рассеянного склероза.

Что касается фундаментальных и ориентированных исследований пептидов в Российской Федерации, то их проводят на базе института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН: поиск и исследование антимикробных пептидов и блокаторов болевых чувствительных рецепторов из ядов членистоногих и морских кишечнорастворимых (под руководством академика РАН Е.В. Гришина), разнообразных беспозвоночных (д.х.н. Т.В. Овчинникова), пресмыкающихся (член-корр. РАН В.И. Цетлин); института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН: исследование антимикробных пептидов – факторов врожденного иммунитета культурных и дикорастущих растений к болезням (д.б.н., доцент Т.И. Одинцова); научно-исследовательского института физико-химической биологии и биотехнологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова: поиск новых эффективных пептидных ингибиторов гидролитических ферментов, в том числе грибного происхождения (проф. М.А. Белозерский). На основании полученных в результате серий многолетних исследований данных создали основу для потенциального использования

многих соединений полипептидной природы в качестве перспективных антибиотиков и антимикотиков, природных болеутоляющих и иммуномодулирующих агентов. Важны исследования, направленные на поиск «эффекта синергизма» при применении одновременно нескольких пептидов. В этом случае мы имеем усиление антимикробного действия и снижение токсического эффекта от антибиотиков. Так, можно избежать гемолитического действия эхинокандинов из-за необходимости использовать их в высоких дозах для ингибирования возбудителей аспергиллезов, если, например, применять эхинокандин В совместно с цилофунгином

(продуцируется штаммом *Aspergillus* sp.) [17]. При совместном применении этих пептидных антибиотиков достигается необходимый терапевтический эффект при их низких концентрациях, которого нет при их раздельном применении.

## ВЫВОДЫ

Биологически активные пептиды грибов являются важным ресурсом в получении новых продуктов медицинского назначения. Трудности внедрения новых антибиотиков на их основе связаны с низкой стабильностью, сложной и дорогостоящей химической очисткой или проведением модификаций.

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Abid A., Bacha N., Ahmad B., et al.* Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites // *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* – 2014. – Vol. 4, №11. – P. 859-870
2. *Holt A., Killian J.A.* Orientation and dynamics of transmembrane peptides: the power of simple models// *Eur. Biophys. J.* – 2010. – Vol. 39. – P. 609-621.
3. *Brakhage A.* Regulation of fungal secondary metabolism // *Nature Rev. Microbiology.* – 2012. – P. 1-12
4. *Nagaray G., Uma M. V. Shivayoigi M., S., Balaram H.* Antimalarial activities of peptide antibiotics isolated from fungi // *Antimicrob. Agents Chemotherapy.* – 2009. – Vol. 45, №1. – P. 145-149.
5. *Bocchinfuso G., Palleschi A., Orioni B., et al.* Different mechanisms of action of antimicrobial peptides: insights from fluorescence spectroscopy experiments and molecular dynamics simulations // *J. Pept. Sci.* – 2009. – Vol. 15. – P. 550-558.
6. *Holt A., Killian J.A.* Orientation and dynamics of transmembrane peptides: the power of simple models// *Eur. Biophys. J.* – 2010. – Vol. 39. – P. 609-621.
7. *Bobone S., Gerelli Y., De Zotti M., et al.* Membrane thickness and the mechanism of action of the short peptaibol trichogin GA IV// *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2013. – Vol. 1828. – P. 1013-1024.
8. *Chugh J.K. and Wallace B.A.* Peptaibols: models for ion channels // *Biochemical Society Transactions.* – 2009. – Vol. 29, part 4.
9. *Abdalla M., Matasyoh C.* Endophytes as producers of peptides: An overview about the recently discovered peptides from endophytic microbes // *Nat. Prod. Bioprospect.* – 2014. – Vol. 4. – P. 257-270.
10. *Qinggui W. and Xu L.* Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review // *Molecules.* – 2012. – Vol. 17. – P. 2367-2377.
11. *Ribet D. & Cossart P.* Pathogen-mediated posttranslational modifications: a re-emerging field // *Cell.* – 2010. – Vol. 143. – P. 694-702.
12. *Stoppacher N., Neumann N.K.N., Burgstaller L., et al.* The comprehensive peptaibiotics database // *Chem. Biodiv.* – 2013. – Vol. 10, №5. – P. 734-743.
13. *Atanasova L., Druzhinina I.S., Jaklitsch W.M.* Two hundred *Trichoderma* species recognized based on molecular phylogeny/ In: *Trichoderma: Biology and Applications.* (Eds.) – UK: CABI of Nosworthy Way. Wallingford, Oxon. – 2013.
14. *Neuhof T., Dieckmann R., Druzhinina I., et al.* Intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptaibol formation by the genus *Trichoderma*. Hypocrea: can molecular phylogeny of species predict peptaibol structures? // *Microbiology.* – 2007. – Vol. 153. – P. 3417-3437.
15. *Садькова В.С., Кураков А.В., Куварина А.Е. Рогожин Е.А.* Антимикробная активность штаммов грибов рода *Trichoderma* из Средней Сибири // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2015. – Т. 51, №3. – С. 1-9.
16. *Садькова В.С., Кураков А.В., Коршун В.А. и др.* Образование штаммом *Trichoderma citrinoviride* TYVI 4/11 антибиотиков-пептаиболов // *Проблемы медицинской микологии.* – 2015. – №1. – С. 41-46.
17. *Vodisch M. et al.* Analysis of the *Aspergillus fumigatus* proteome reveals metabolic changes and the activation of the pseurotin A biosynthesis gene cluster in response to hypoxia // *J. Proteome Res.* – 2011. – Vol. 10. – P. 2508-2524.
18. *McDonagh A., et al.* Sub-telomere directed gene expression during initiation of invasive aspergillosis // *PLoS Pathog.* – 2008. – Vol. 4. – e1000154.
19. *Tao K.J., Du L., Sun X.Q., et al.* Biosynthesis of aspergiolide A, a novel antitumor compound by a marine-derived fungus *Aspergillus glaucus* via the polyketide pathway// *Tetrahedron Lett.* – 2009. – Vol. 50, №9. – P. 1082-1085.

Поступила в редакцию журнала 18.05.2016

Рецензент: О.Е. Марфенина



## АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,3,4-ТИАДИАЗОЛА

Кошевенко А.С. (аспирант)\*\*, Ананьева Е.П. (зав. каф.), Яковлев И.П. (зав. каф.), Юсковец В.Н. (научный сотрудник)

Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия (кафедры микробиологии и органической химии), Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2016

Изучена антифунгальная активность новых производных 1,3,4-тиадиазола методом серийных разведений. Установлена высокая фунгицидная активность в отношении дрожжей рода *Candida* и мицелиальных грибов *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*.

**Ключевые слова:** антифунгальная активность, микозы, минимальная подавляющая концентрация, производные 1,3,4-тиадиазола

## ANTIFUNGAL ACTIVITY OF NEW DERIVATIVES OF 1,3,4-THIADIAZOLE

Koshevenko A.S. (postgraduate student), Ananyeva E.P. (head of the chair), Yakovlev I.P. (head of the chair), Yuskovets V.N. (scientific collaborator)

St. Petersburg Chemical-Pharmaceutical Academy (microbiological chair and organic chemistry chair), St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2016

Antifungal activity of new derivatives of 1,3,4-thiadiazole was studied by serial dilutions method. High fungicidal activity was established against yeasts *Candida* species and mycelial fungus *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*.

**Key words:** antifungal activity, mycoses, minimal inhibitory concentration, 1,3,4-thiadiazole derivatives

## ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия отмечают значительный рост числа вызванных грибами заболеваний – микозов. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации составила более 2,7 миллиона человек [1].

Инвазивные микозы (прежде всего, кандидоз, аспергиллез, криптококкоз) характеризуют тяжестью клинических проявлений, высоким риском неблагоприятного исхода для пациента и постоянной тенденцией к росту. Основные возбудители микозов – *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, а также *A. niger*, *A. nidulans*. Отмечают рост микотических инфекций, вызванных штаммами *C. non-albicans* (*C. glabrata*, *C. tropicalis* и др.).

В последнее время отмечают тенденцию к возрастанию устойчивости возбудителей микозов к действию противогрибковых препаратов. При этом резистентность клинических штаммов *Candida* spp. к препаратам из группы азолов выше, чем к полиеновым антибиотикам [2, 3].

В связи с этим актуальным является поиск новых эффективных антимикотических средств, в том числе из группы азолов.

Цель исследования – определение антифунгального действия новых производных 1,3,4-тиадиазола в отношении дрожжей рода *Candida* и некоторых мицелиальных грибов и выявление наиболее активных соединений.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые вещества.

Нами впервые реакцией N'-арилтиобензгидразида с малонилдихлоридом (в соотношении 1:1) в среде ледяной уксусной кислоты были получены новые производные 1,3,4-тиадиазола общей формулы: - хлорид 2-[(1Z)-1-(3-(3,5-диарил)-5-(4-арил)-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3-(3,5-диарил)-5-(4-арил)-1,3,4-тиадиазол-3-ия [4] (Рис. 1; табл. 1).

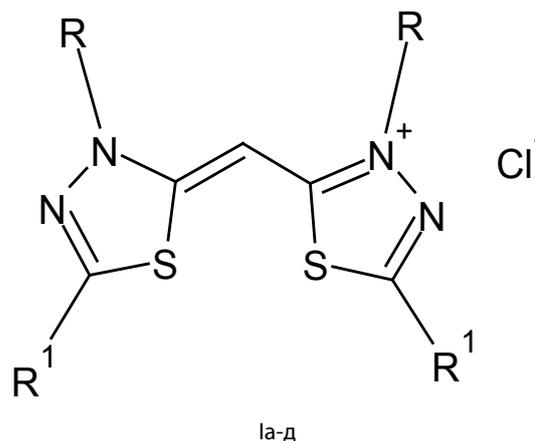
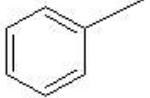
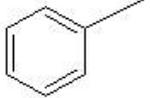
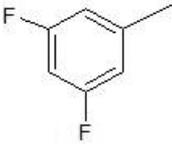
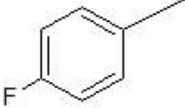
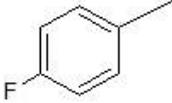
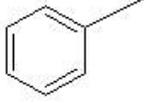
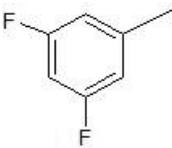
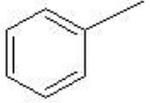
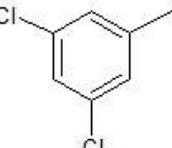
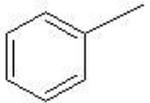


Рис. 1. Структурная формула производных 1,3,4-тиадиазола 1a-d.

\* Контактное лицо: Кошевенко Анастасия Сергеевна, e-mail: anastasia.koshevenko@pharminnotech.com

Таблица 1.

Радикалы производных 1,3,4-тиадиазола

Производные 1,3,4-тиадиазола	R	R <sup>1</sup>
Ia		
Iб		
Iв		
Iг		
Iд		

Выход соединений составил 81-85%. Контроль за ходом реакции и чистотой полученных продуктов осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках «Sorbfil». Строение было доказано методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР) <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C и ИК спектроскопии [4].

В качестве тест-культур использовали следующие штаммы грибов: *C. albicans* ATCC 885-653; *C. tropicalis* ВКМ У-0482; *A. niger* ATCC 16404 и *A. nidulans*, *A. terreus* (из коллекции культур СПХФА).

Противогрибковую активность устанавливали методом двукратных серийных разведений на жидкой питательной среде Сабуро с последующим высевом на плотную питательную среду для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) исследуемых соединений. Исходные растворы производных 1,3,4-тиадиазола готовили в 50%-ном водном диметилсульфоксиде из-за их ограниченной растворимости в воде.

Для приготовления взвеси дрожжевых культур применяли 2 суточные культуры, выращенные на плотной питательной среде Сабуро. Готовили взвесь по стандарту МакФарланда (2·10<sup>8</sup> КОЕ/мл), затем полученную суспензию разводили до концентрации 10<sup>5</sup> КОЕ/мл.

Для получения конидий мицелиальных грибов проводили смыв с пятисуточной культуры, выращенной на плотной питательной среде Сабуро, фосфатным буферным раствором с 0,05% твина-80. Определяли количество конидий в 1 мл смыва, используя камеру Горяева, и разводили до концентрации 10<sup>5</sup> КОЕ/мл. Тест-культуры вносили в ряд пробирок с разведениями образцов таким образом, чтобы микробная нагрузка

ка составляла 10<sup>4</sup> микробных клеток в 1 мл.

Посевы выращивали в течение 2 суток для дрожжевых культур и 5 суток для мицелиальных грибов.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

В качестве препаратов сравнения были выбраны средства из группы азолов – флуконазол и вориконазол.

**Флуконазол** – распространенный синтетический противогрибковый препарат группы триазолов, который, в основном, применяют для лечения различных форм кандидозов. Вориконазол – современный антимикотик с широким спектром действия для лечения инвазивного аспергиллеза, диссеминированного кандидоза и других микозов.

Известно, что *C. albicans* является основным возбудителем кандидозов, поэтому, в первую очередь, изучали активность синтезируемых соединений в отношении данной культуры.

Установлено, что исследуемые соединения обладают фунгицидным действием. Минимальная подавляющая концентрация производного тиадиазола Ia в отношении *C. albicans* составляла 1,0 мкг/мл. Соединения Iб-Iд проявляли активность в диапазоне 7,8-15,6 мкг/мл. Введение заместителей в молекулу Ia приводило к незначительному снижению антифунгальной активности, однако она была сопоставима с активностью флуконазола (табл. 2)

В отношении *C. tropicalis* соединение Ia также проявило наибольший антифунгальный эффект (МПК – 15,6 мкг/мл), сопоставимый с действием вориконазола.

Таблица 2.

**Антифунгальная активность в отношении грибов рода *Candida***

Производные 1,3,4-тиадиазола	МПК, мкг/мл	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
Ia	1,0	15,6
Iб	15,6	31,2
Iв	7,8	31,2
Iг	15,6	62,5
Iд	7,8	31,5
флуконазол	15,6	62,5
вориконазол	0,5	16,0

Было изучено антифунгальное действие производных 1,3,4-тиадиазола в отношении мицелиальных грибов. Флуконазол не оказывал на них ингибирующего действия. Показано, что вориконазол обладал фунгистатической активностью в концентрациях от 125 до 500 мкг/мл (табл. 3), фунгицидное действие не было обнаружено в концентрациях менее 1000 мкг/мл.

В отличие от вориконазола, исследуемые соединения обладали фунгицидным действием. МПК соединения Ia составляла от 15,6 до 62,5 мкг/мл в зависимости от вида гриба. Среди остальных образцов следует отметить соединение Iд, также проявляющее высокий уровень противогрибковой активности в отношении мицелиальных грибов.

Таблица 3.

**Антифунгальная активность в отношении  
грибов рода *Aspergillus***

Производные 1,3,4-тиадиазола	МПК, мкг/мл		
	<i>A. niger</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. terreus</i>
Ia	15,6	62,5	31,2
Iб	62,5	62,5	125
Iв	31,2	125	125
Iг	62,5	62,5	125
Id	15,6	31,2	62,5
флуконазол	-	-	-
вориконазол	125*	500*	250*

Примечание: \*-минимальная фунгистатическая концентрация

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами синтезированы новые про-

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Климко Н.Н., Козлова Я.И., Шадривова О.В. и др. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели Life Program // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, №1. – С. 3-7.
2. Довнар А.Г, Носонова Е.С. Характеристика множественной резистентности клинических штаммов энтеробактерий, ацинетобактер и кандид // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2011. – №4. – С. 53-54.
3. Донгак Д.А., Карноухова О.Г., Коган Г.Ю. и др. Частота выделения и лекарственная резистентность грибов рода *Candida* от больных ВИЧ-инфекцией в Иркутске // Сибирский медицинский журнал. – 2013. – №5. – С. 57-59.
4. Патент 2402550 от 26.05.2009 г. – Хлорид 2-[(1Z)-1-(3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-3-ия и способ его получения.

Поступила в редакцию журнала 08.09.2016

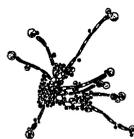
Рецензент: О.В. Топкова

изводные 1,3,4-тиадиазола – хлорид 2-[(1Z)-1-(3-(3,5-диарил)-5-(4-арил)-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3-(3,5-диарил)-5-(4-арил)-1,3,4-тиадиазол-3-ия, обладающие высокой активностью в отношении дрожжей рода *Candida*, в основном, превышающей активность флуконазола.

Выявлено наиболее активное соединение Ia, по эффективности сопоставимое с вориконазолом.

В отношении мицелиальных грибов производные тиадиазола, в отличие от препарата сравнения – вориконазола, обладали фунгицидным действием.

Полученные результаты позволяют потенцировать соединение Ia как перспективное лекарственное средство, обладающее антифунгальной активностью, на уровне существующих на рынке противогрибковых препаратов.



## ОЦЕНКА РАСПРОСТРАНЕННОСТИ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ *STAPHYLOCOCCUS* SPP. СРЕДИ ИЗОЛЯТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Степанов А.С. (аспирант, ассистент кафедры)\*,  
Васильева Н.В. (директор НИИ, зав. кафедрой)

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра медицинской микробиологии), Санкт-Петербург, Россия

© Степанов А.С., Васильева Н.В., 2016

*Стафилококки до сих пор остаются одними из основных возбудителей инфекций человека, в том числе и внутрибольничных. В последнее время отмечают рост числа инфекций, вызываемых коагулазонегативными стафилококками (КНС). В отличие от *Staphylococcus aureus*, КНС обладают особыми механизмами устойчивости и полирезистентности, которые не выявить рутинными методами. Так, в 96% случаев *S. aureus* обладают метициллинорезистентностью, обусловленной *mecA*, в то время как КНС – только в 60%. Уровень полирезистентности метициллинчувствительных КНС в 2 раза превышает частоту полирезистентности у метициллинчувствительных *S. aureus*, что во многом определяется природной нечувствительностью к препаратам отдельных групп.*

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентность, видовые особенности, механизмы устойчивости, стафилококки

## WIDESPREAD OF *STAPHYLOCOCCUS* SPP. RESISTANCE MECHANISMS IN ISOLATES FROM CLINICAL SPECIMENS

Stepanov A.S. (postgraduate student, assistant of  
the chair), Vasilyeva N.V. (director of the institute,  
head of the chair)

Kashkin Research Institute of Medical Mycology of North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov (chair of medical microbiology), St. Petersburg, Russia

© Stepanov A.S., Vasilyeva N.V., 2016

*Staphylococci are still the most of human infections causative agents, also nosocomial infections. Rise of infections to be associated with coagulase-negative Staphylococci (CoNS) has been detected in recent years. In contrast to *S. aureus* CoNS has unique resistance mechanisms and capacity to poliresistance which can't be detected by routine methods. 96% of *S. aureus* has methicillin resistance associated with *mecA*, but only 60% of CoNS has this link. Polyresistance level in methicillin susceptible *S. aureus* is less than in methicillin susceptible CoNS in 2 times. It can be explained by species associated non-susceptibility in CoNS.*

**Key words:** features of species, mechanisms of resistance, Staphylococci, resistance to antimicrobials

## ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость стафилококков к полусинтетическим бета-лактамам антибиотикам класса пенициллинов (метициллинорезистентность) сопровождается не только перекрестной резистентностью стафилококков к другим пеницилинам и цефалоспорином, но и развитием устойчивости к антибактериальным препаратам, действующим на другие мишени прокариотической клетки. Согласно данным эпидемиологических исследований внутрибольничных инфекций (ВБИ), полирезистентные штаммы *Staphylococcus aureus* как этиологические агенты повышают летальность среди пациентов, в среднем, на 14% [1].

Распространенность метициллинорезистентных *S. aureus* (MRSA) в условиях Европейских стационаров колеблется от 14 до 39% [Diekema D.J., et al. // Clin. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 2, №32]. В последнее время особое внимание уделяют коагулазонегативным стафилококкам (КНС), обнаруживаемым при бактериологическом обследовании носителей.

Следует отметить, что через несколько лет после внедрения в клиническую практику бензилпенициллина появились первые сообщения о выявлении резистентных к нему штаммов *S. aureus*. В последующие годы их количество значительно возросло, составив к 1966 г. 90% нозокомиальных и 70% внебольничных изолятов [Diekema D.J., et al. // Clin. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 2, №32].

Коагулазонегативные стафилококки также характеризуются высоким уровнем метициллинорезистентности в популяции (до 30% штаммов от носителей), однако роль их в патологическом процессе не до конца изучена. Метициллинорезистентность характерна также и для коагулазонегативных стафилококков, однако данную проблему начали разрабатывать относительно недавно ввиду недооцененного ранее значения КНС в развитии инфекций человека [2].

Установлено, что с 1980 по 1989 годы количество метициллинорезистентных КНС (MRS-CoNS) возросло с 9 до 27% [Diekema D.J., et al. // Clin. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 2, №32].

На сегодняшний день известно, что коагулазонегативные стафилококки являются причиной инфекций кровотока вследствие использования внутрисосудистых имплантов, у детей и лиц пожилого и старческого возраста, у иммунокомпрометированных пациентов [3]. Среди возбудителей катетероассоциированных инфекций кровотока КНС занимают лидирующее положение: до 55% изолятов, выделенных из крови, относятся к КНС [4]. По данным исследований, КНС с выявленной метициллинорезистентностью характеризуются более неблагоприятным спектром устойчивости к антибактериальным препаратам, чем *S. aureus*. В результате многоцентровых исследований было выявлено, что метициллинорезистентные изоляты среди КНС в условиях стационара составляют до 76,9%, а также имеют более высокий уровень корезистентности к антибактериальным препаратам других групп, чем MRSA [5, 6].

Цель проводимого исследования – сравнительная оценка спектра устойчивости стафилококков в зависимости от выявленного механизма резистентности и видовой принадлежности.

\* Контактное лицо: Степанов Александр Сергеевич,  
E-mail: Aleksandr.Stepanov@szgmu.ru

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования были проведены видовая идентификация, оценка профиля устойчивости и выявление механизма устойчивости 768 изолятов, выделенных из клинического материала. Идентификацию выполняли с помощью агглютинационного теста на плазмокоагулазу (Slidex, BioMerieux). Коагулазоотрицательные стафилококки определяли до вида в дальнейшем с помощью биохимических тест-систем для идентификации (StaphyTest16 и 24, ErbaLaChema) и MALDI-TOF масс-спектрометрии (AutoFlex, Bruker Daltonics GmbH) в качестве дополнительного метода идентификации, теста на чувствительность к новобиоцину (диски НИЦФ). Все коагулазопозитивные стафилококки относились к виду *S. aureus*. Оценку результатов биохимической идентификации осуществляли с помощью метода дискриминационного анализа данных MALDI-TOF масс-спектрометрии и книги кодов для тестов StaphyTest16 и 24, ErbaLaChema. С целью более точной идентификации редко встречающихся видов был проведен предварительный анализ обучающей группы, состоящей из 30 изолятов редко встречающихся видов. Видовую принадлежность устанавливали по наибольшей аппроксимации полученного ряда к типовому профилю вида по совокупности биохимических признаков и особенностей масс-спектра.

Оценку устойчивости проводили с помощью диско-диффузионного метода (диски НИЦФ, Oxoid, BD) на среде Мюллер-Хинтон согласно рекомендациям EUCAST 2015: инкубацию выполняли в течение ночи при 35 °С. Правила интерпретации результатов диско-диффузионного метода соответствуют EUCAST 2015. Механизм устойчивости к антибактериальным препаратам определяли с применением теста латекс-агглютинации на наличие пенициллинсвязывающего белка 2а (ПСБ 2а, продукт экспрессии гена mecA) (SlidexMRSA, BioMerieux), теста на бета-лактамазную активность с нитроцефином (диски с нитроцефином, BioMerieux) и теста «двойных дисков» (эритромицин (15 мкг)-клиндамицин (2 мкг)) для обнаружения типа устойчивости к макролидам и линкозамидам. Истинно метициллинорезистентными считали стафилококки, у которых выявляли продукцию ПСБ 2а. Метициллинорезистентные стафилококки, у которых не отмечали ПСБ 2а и бета-лактамазную активность, относили в группу метициллинорезистентных стафилококков, для которых механизм устойчивости не установить рутинными методами. Остальные стафилококки были отнесены в группу метициллинчувствительных изолятов. Учет реакций латекс-агглютинации и теста на бета-лактамазы осуществляли согласно инструкции производителей. Оценку метода «двойных дисков» проводили следующим образом: наличие устойчивости к клиндамицину и эритромицину расценивали как тотальный тип устойчивости к макролидам, линкозамидам и стрептограмину Б (MLSB), устойчивость только к эритромицину – как ограниченная резистентность к макролидам и стрептограмину Б (MSB), а уплотнение зоны задержки роста вокруг диска с клиндамицином со стороны диска с эритромицином при наличии устойчивости к последнему – как индуцируемый тип устойчивости к макролидам, линкозамидам и стрептограмину Б (MLSBi).

Результаты обрабатывали статистически с помо-

щью программы «R» с использованием теста на нормальность распределения Шапиро-Уилкса, многомерного дисперсионного анализа, критерия Фишера, хи-квадрат, точного решения Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные, полученные в ходе исследования, были проверены на нормальность распределения с помощью теста Шапиро-Уилкса (табл. 1).

Таблица 1

Результаты теста на нормальность Шапиро-Уилкса		
	Продукция ПСБ 2а	Устойчивость к макролидам и линкозамидам
Стандартная ошибка	2,2·10 <sup>-16</sup>	9,067·10 <sup>-13</sup>

Выявили, что метициллинорезистентностью обладали 47,06% *S. aureus* и 53,49% КНС ( $p=0,0002596$ ) на основании тестирования чувствительности к цефокситину (30 мкг). Согласно результатам, уровень метициллинорезистентности в группе коагулазонегативных стафилококков был выше, чем среди *S. aureus*. Однако при оценке распространённости ПСБ 2а установлено, что среди *S. aureus*, устойчивых к цефокситину, доля ПСБ 2а-положительных штаммов составила 96,1%, а среди КНС, устойчивых к цефокситину, показатель составил 60,1% ( $p=0,0001$ ). Так, среди *S. epidermidis* доля метициллинорезистентных ПСБ 2а положительных составила 11,5%, *S. haemolyticus* – 23,1%, *S. aureus* – 10,5%; у остальных стафилококков ПСБ 2а не был обнаружен, несмотря на наличие у них полирезистентности. Наряду с этим, КНС были полирезистентными (устойчивость к 3 и более антимикробным препаратам из разных групп) в 34,08±21,21% случаев, в отличие от *S. aureus*, обладавшего полирезистентностью в 27,07±21,69% случаев ( $p=0,09$ ). Уровни полирезистентности среди стафилококков разных видов с разными механизмами устойчивости достоверно различались (табл. 2).

Таблица 2

Уровень полирезистентности в зависимости от плазмокоагулазной активности			
Механизм устойчивости	Группа	Уровень полирезистентности (%)	Стандартная ошибка (F-критерий)
ПСБ 2а	<i>S. aureus</i>	44,37229	2·10 <sup>-16</sup>
	КНС	50,15873	
Метициллинчувствительные	<i>S. aureus</i>	11,49030	
	КНС	21,27315	
Метициллинрезистентные без выявленного ПСБ 2а	<i>S. aureus</i>	3,90625	
	КНС	44,17641	

На основании полученных данных можно заключить, что уровень устойчивости к отдельным антимикробным препаратам как среди *S. aureus*, так и среди КНС был ассоциирован с выявленным механизмом устойчивости (табл. 3, 4). Для *S. aureus* ведущим фактором в развитии устойчивости и полирезистентности являлось наличие ПСБ 2а, в то время как для КНС это не было единственным основополагающим фактором роста устойчивости к антимикробным препаратам различных групп.

Уровень распространенности перекрестной устойчивости к макролидам, линкозамидам и стрептограмину Б для *S. aureus* составил 23,5%, а для КНС – 31%

( $p=0,08608$ ), частота выявления индуцированной устойчивости к клиндамицину для *S. aureus* – 8,82%, для КНС – 11,63% от всех случаев устойчивости к клиндамицину ( $p=0,001375$ ).

Таблица 3

**Различия в устойчивости к антимикробным препаратам различных групп у *S. aureus* в зависимости от механизма устойчивости**

Группа препаратов	Механизм устойчивости	Доля устойчивых изолятов (%)	Стандартная ошибка (p)
Аминогликозиды	MRSA с ПСБ 2а	51,35	6,607·10 <sup>-12</sup>
	MRSA без ПСБ 2а	10	
	Метициллинчувствительные	8,8	
Макролиды	MRSA с ПСБ 2а	45,9	2,434·10 <sup>-08</sup>
	MRSA без ПСБ 2а	30	
	Метициллинчувствительные	14,11	
Линкозамиды	MRSA с ПСБ 2а	39,66	6,742·10 <sup>-15</sup>
	MRSA без ПСБ 2а	22,22	
	Метициллинчувствительные	3,35	
Фторхинолоны	MRSA с ПСБ 2а	75,5	2,2·10 <sup>-16</sup>
	MRSA без ПСБ 2а	30,0	
	Метициллинчувствительные	13,38	
Сульфаниламиды	MRSA с ПСБ 2а	28,57	7,639·10 <sup>-05</sup>
	MRSA без ПСБ 2а	0,0	
	Метициллинчувствительные	4,45	
Фузидиевая кислота	MRSA с ПСБ 2а	2,56	0,007
	MRSA без ПСБ 2а	0	
	Метициллинчувствительные	0,39	
Тетрациклины	MRSA с ПСБ 2а	17,48	0,0009
	MRSA без ПСБ 2а	4,0	
	Метициллинчувствительные	5,6	

При оценке спектра устойчивости *S. aureus* отмечали значительное влияние наличия ПСБ 2а на рост устойчивости к препаратам вышеперечисленных групп. Метициллинорезистентность, не связанная с продукцией ПСБ 2а, не вносила существенного вклада в рост устойчивости к антибактериальным препаратам других групп, кроме группы линкозамидов, в которой MRSA без ПСБ 2а по отношению к метициллинчувствительным обладали достоверно более высоким уровнем устойчивости (22,22% против 3,35%,  $p=0,0027$ ). Статистически значимые различия уровней устойчивости к антибактериальным препаратам между MRSA с ПСБ 2а и MRSA без ПСБ 2а наблюдали только в группе линкозамидов ( $p=0,002$ ) и фузидиевой кислоты ( $p=0,021$ ). Таким образом, устойчивость к антибактериальным препаратам различных групп среди *S. aureus* в значительной мере определялась наличием метициллинорезистентности, связанной с экспрессией *mecA*.

Таблица 4

**Различия в устойчивости к антимикробным препаратам различных групп у коагулазонегативных стафилококков в зависимости от механизма устойчивости**

Группа препаратов	Механизм устойчивости	Доля устойчивых изолятов (%)	Стандартная ошибка (p)
Аминогликозиды	MRS-CoNS с ПСБ 2а	23,81	0,003
	MRS-CoNS без ПСБ 2а	36,36	
	Метициллинчувствительные	13,95	
Макролиды	MRS-CoNS с ПСБ 2а	77,78	0,007
	MRS-CoNS без ПСБ 2а	47,06	
	Метициллинчувствительные	50,98	
Линкозамиды	MRS-CoNS с ПСБ 2а	0	0,12
	MRS-CoNS без ПСБ 2а	0	
	Метициллинчувствительные	25,5	

Фторхинолоны	MRS-CoNS с ПСБ 2а	92,3	3,951·10 <sup>-9</sup>
	MRS-CoNS без ПСБ 2а	68,75	
	Метициллинчувствительные	32,91	
Сульфаниламиды	MRS-CoNS с ПСБ 2а	80,0	0,8872
	MRS-CoNS без ПСБ 2а	72,73	
	Метициллинчувствительные	66,02	
Фузидиевая кислота	MRS-CoNS с ПСБ 2а	5,88	0,8478
	MRS-CoNS без ПСБ 2а	9,09	
	Метициллинчувствительные	4,09	
Тетрациклины	MRS-CoNS с ПСБ 2а	30,0	0,0004
	MRS-CoNS без ПСБ 2а	72,73	
	Метициллинчувствительные	18,07	

Оценивая спектр чувствительности КНС к антибактериальным препаратам, статистически значимых различий в уровне устойчивости к сульфаниламидам, линкозамидам и фузидиевой кислоте между метициллинорезистентными и метициллиночувствительными не обнаружили ( $p>0,05$ ). Уровень устойчивости к аминогликозидам, фторхинолонам и тетрациклинам между MRS-CoNS с ПСБ 2а и MRS-CoNS без ПСБ 2а статистически не различался ( $p>0,05$ ). Статистически значимые различия уровней устойчивости к антибактериальным препаратам между MRS-CoNS с ПСБ 2а и MRS-CoNS без ПСБ 2а были выявлены только в группе макролидов ( $p=0,031$ ).

Таблица 5

**Сравнение уровней устойчивости КНС и *S. aureus* к отдельным антимикробным препаратам**

Группа препаратов	Механизм устойчивости	Σ КНС	Уст. из них	Σ <i>S. aureus</i>	Уст. их них	Стандартная ошибка (p)
Аминогликозиды	MRS без ПСБ 2а	11	4	10	1	>0,05
	MRS с ПСБ 2а	21	5	37	19	0,09954
	Метициллинчувствительные	301	42	282	25	0,1509
Сульфаниламиды	MRS без ПСБ 2а	11	8	7	0	>0,05
	MRS с ПСБ 2а	10	8	35	10	>0,05
	Метициллинчувствительные	156	103	134	6	2,2·10 <sup>-16</sup>
Макролиды	MRS без ПСБ 2а	17	8	10	3	0,4577
	MRS с ПСБ 2а	27	21	61	28	0,01212
	Метициллинчувствительные	410	209	375	53	< 2·10 <sup>-16</sup>
Фторхинолоны	MRS без ПСБ 2а	16	11	10	3	0,09189
	MRS с ПСБ 2а	26	24	57	43	0,1244
	Метициллинчувствительные	401	132	366	49	1,165·10 <sup>-9</sup>
Фузидиевая кислота	MRS без ПСБ 2а	11	1	4	0	0,202
	MRS с ПСБ 2а	17	1	39	1	>0,05
	Метициллинчувствительные	293	12	255	1	0,01757
Тетрациклины	MRS без ПСБ 2а	11	8	5	2	>0,05
	MRS с ПСБ 2а	20	6	45	8	0,423
	Метициллинчувствительные	260	47	250	14	9,792·10 <sup>-7</sup>

При сравнительном анализе спектров устойчивости *S. aureus* и коагулазонегативных стафилококков (табл. 5) установили, что КНС, даже при отсутствии метициллинорезистентности, имели более высокие показатели устойчивости к препаратам следующих групп (КНС против *S. aureus*): сульфаниламиды (66,02% против 4,45%), макролиды (50,98% против 14,11%), фторхинолоны (32,91% против 13,38%), фузидиевая кислота (4,09% против 0,39%), тетрациклины (18,07%

против 5,6%). Отметим, что среди метициллинорезистентных стафилококков не наблюдали статистически значимых различий в спектрах устойчивости между КНС и *S. aureus*.

При изучении зависимости спектра устойчивости к антибактериальным препаратам отмечали наличие взаимозависимости между видом и полирезистентностью. Так, среди *S. epidermidis* количество групп антимикробных веществ, к которым имелась устойчивость, составило  $38,13 \pm 18,8$ , среди *S. aureus* –  $27,07 \pm 21,68$ , *S. hominis* –  $21,03 \pm 20,2$ , *S. haemolyticus* –  $51,25 \pm 13,8$ , *S. lugdunensis* –  $41,67$ , *S. warneri* –  $37,5 \pm 25$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенного эксперимента было выявлено, что спектр устойчивости стафилококков в наибольшей мере определяется метициллинорезистентностью. Установлено, что как для *S. aureus*, так и для коагулазонегативных стафилококков наличие экспрессии гена *mecA* (синтез ПСБ 2а) коррелирует с развитием устойчивости к антибактериальным препаратам других групп. *S. aureus*, чувствительный к метициллину, сохраняет это свойство к таким препаратам, как сульфаниламиды и тетрациклины. MRSA, в свою очередь,

характеризовались снижением чувствительности к вышеперечисленным группам препаратов. КНС, в отличие от *S. aureus*, отличались более высокой частотой устойчивости к следующим группам антибактериальных препаратов: сульфаниламиды, макролиды, фторхинолоны, фузидиевая кислота и тетрациклины. Выявлено, что отдельные КНС обладают природной устойчивостью к таким препаратам, как сульфаниламиды, макролиды, фторхинолоны, фузидиевая кислота и тетрациклины. Устойчивость к антибактериальным препаратам и полирезистентность КНС в большей мере обусловлены механизмами, для определения которых на сегодняшний день не разработано стабильных методов их выявления по фенотипу. Обнаружение ПСБ 2а необходимо использовать не для подтверждения метициллинорезистентности, а для быстрого выявления потенциально полирезистентных *S. aureus* и *S. epidermidis*.

Следовательно, на современном этапе борьбы с инфекциями, вызванными КНС, перспективными являются разработка и широкое внедрение методов обнаружения маркеров полирезистентности, ПСБ2а, *mecA*, *mecC*.

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Vindel Ana, Cuevas Oscar, Cercenado Emilia, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: Molecular epidemiology and utility of different typing methods // J. of Clin. Microbiol. – 2009. – P. 1620-1627.
2. Страчунский Л.С., Белькова Ю.А., Дехнич А.В. Внебольничные MRSA – новая проблема антибиотикорезистентности // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – Смоленск, 2005. – С. 32-46.
3. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Иванова Л.В., Гоик В.Г. Чувствительность к антибактериальным препаратам стафилококков, циркулирующих в многопрофильном стационаре стационара // Проблемы медицинской микологии. – 2015. – Т. 17, №4. – С. 58-62.
4. Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Антибиотикорезистентность стафилококков, выделенных из крови // Научное обозрение. – 2014. – №3. – С. 184-190.
5. Козлов Р.С., Голуб А.В. Катетер-ассоциированные инфекции кровотока: предупредить или вылечить? // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2010. – Т. 12, №1. – С. 23-30.
6. Попов Д.А., Вострикова Т.Ю. Первый опыт применения метода ПЦР в режиме реального времени для диагностики бактериемии в послеоперационном периоде у кардиохирургических больных // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – №8. – С. 49-52.

Поступила в редакцию журнала 29.08.2016

Рецензент: Н.П. Елинов



# ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИГЕКСАНИДА И ГЛАЗНЫХ КАПЕЛЬ АНТИБИОТИКОВ ФТОРХИНОЛОНОВОГО РЯДА В ОТНОШЕНИИ РЕЗИСТЕНТНЫХ STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS \*

<sup>1,2</sup>Афиногенова А.Г. (руководитель испытательного лабораторного центра, профессор кафедры)\*, <sup>3</sup>Околов И.Н. (зав. лаб.), <sup>2</sup>Афиногенов Г.Е. (профессор кафедры), <sup>4</sup>Хинтуба Т.С. (врач-офтальмолог, аспирант кафедры), <sup>5</sup>Тахтаев Ю.В. (профессор кафедры), <sup>2</sup>Мадай Д.Ю. (зав. кафедрой)

<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера; <sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет (кафедра челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии); <sup>3</sup> СПб филиал МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова МЗ РФ; <sup>4</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова МЗ РФ (кафедра офтальмологии); <sup>5</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ (кафедра офтальмологии), Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2016

Частота высеваемости коагулазонегативных стафилококков (КНС) у пациентов с инфекционно-воспалительными осложнениями в офтальмологии составляет 65%, из них 73% – *Staphylococcus epidermidis*. При этом 60% и 30% из всех изолятов КНС обладают устойчивостью, соответственно, более чем к 3 и 5 антибиотикам, т.е. являются полирезистентными, в том числе к фторхинолонам третьего и четвертого поколений. В связи с этим особое значение приобретает использование антисептиков, обладающих антимикробным действием как в отношении чувствительных, так и панрезистентных к антибиотикам стафилококкам. Антисептик Пронтозан® при коротких экспозициях обладает высокой бактерицидной активностью в отношении клинического изолята *S. epidermidis* 66, устойчивого к фторхинолонам. При исследованиях на модели культуры клеток фибробластов легкого эмбриона человека показано, что полигексанид не обладает цитотоксическим действием в концентрации 0,01% (100 мкг/мл), а также демонстрирует высокий антиадгезивный эффект в отношении тестируемого штамма стафилококка в дозе ½ МПК (0,06 мкг/мл). В этой же концентрации антисептик способствует усилению действия глазных капель антибиотиков фторхинолонового ряда, снижая уровень резистентности клинического изолята *S. epidermidis* 66 от 2,7 до 20 раз по сравнению с исходным. На основании полученных данных считаем перспективным применение антисептиков из группы полигексанидов для профилактики инфекционно-воспалительных осложнений в офтальмологии, особенно в случае устойчивости клинических изолятов КНС к фторхинолонам.

**Ключевые слова:** адгезия, антибиотикорезистентность, коагулазонегативные стафилококки, культура клеток, полигексанид, фторхинолоны

# PERSPECTIVES OF POLIHEXANIDE AND FLUOROQUINOLONE ANTIBIOTICS EYE DROPS AGAINST RESISTANT STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

<sup>1,2</sup>Afinogenova A.G. (head of testing laboratorial centre, professor of the chair), <sup>3</sup>Okolov I.N. (head of the laboratory), <sup>2</sup>Afinogenov G.E. (professor of the chair), <sup>4</sup>Hintuba T.S. (ophthalmologist, postgraduate student), <sup>5</sup>Takhtaev Yu.V. (professor of the chair), <sup>2</sup>Maday D.Yu. (head of the chair)

<sup>1</sup> St. Petersburg Pasteur Institute; <sup>2</sup> St. Petersburg State University (chair of surgical dentistry); <sup>3</sup> St. Petersburg branch of IR & TC «Eye Microsurgery» named after academician S.N. Fyodorov; <sup>4</sup> North-Western State Medical University named after Mechnikov (chair of ophthalmology); <sup>5</sup> Pavlov First State Medical University of St. Petersburg (chair of ophthalmology), St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2016

Frequency of coagulase-negative staphylococci (CNS) inoculation in patients with infectious and inflammatory complications in ophthalmology is 65%, including 73% – *Staphylococcus epidermidis*. However, 60% and 30% of all isolated CNS resistant respectively more than to 3 or 5 antibiotics, i.e. they are multidrug-resistant (MDR), including quinolones of the 3<sup>rd</sup> and the 4<sup>th</sup> generation. In this regard it is important to use the antiseptics, which have antimicrobial activity against both sensitive and MDR staphylococci. Antiseptic Prontosan® during short exposures has high bactericidal activity against clinical isolate of *S. epidermidis* 66 resistant to fluoroquinolones. Studies on culture model of human embryo lung fibroblast cells showed that Polihexanide has no cytotoxic effect in a concentration of 0.01% (100 µg/ml) and shows a high anti-adhesion effect against *S. epidermidis* 66 in ½ MIC (0.06 µg/ml). The same concentration of antiseptic enhances the action of fluoroquinolone antibiotics eye drops, lowering the level of resistance of clinical isolates of *S. epidermidis* 66 up to 20 times compared to the original. Based on these data is considered the perspective use of Polihexanide group antiseptics for the prevention of infectious and inflammatory complications in ophthalmology, especially in the case of CNS resistant to fluoroquinolones.

**Key words:** adhesion, antibiotic resistance, cell culture, coagulase-negative staphylococci, fluoroquinolones, Polihexanide

## ВВЕДЕНИЕ

По данным отечественных и зарубежных авторов, в составе бактериальной микрофлоры конъюнктивы взрослых пациентов основная доля (до 90%) приходится на грамположительные бактерии, при этом те же микроорганизмы являются и основным этиологическим фактором послеоперационных осложнений в офтальмологии (конъюнктивитов, кератоконъюнктивитов, увеитов, эндофтальмитов). Коагулазонегативные стафилококки (КНС) составляют 18,6-70%, *Staphylococcus aureus* – 10-21%, *Streptococcus* spp. – 9-19%, грамотрицательные бактерии – 5-22%, грибы (*Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp.) – до 8% [1-5].

В современной научной литературе отмечено, что более половины клинических изолятов *S. epidermidis* проявляют резистентность к офлоксацину и левофлоксацину, 33% и 37% – к гатифлоксацину и моксифлоксацину соответственно. При этом 60% и 30% из всех изолятов КНС обладают устойчивостью, соответственно, более чем к 3 и 5 антибиотикам, т.е. являются полирезистентными, том числе к фторхинолонам II-IV поколения [2, 6, 7]. Резистентность микроорганизма,

\* Контактное лицо: Афиногенова Анна Геннадьевна, e-mail: spbstestcenter@mail.ru

являющегося этиологическим фактором, предполагает исключение препарата(ов) из арсенала возможных лекарственных средств.

Наряду с резистентностью к антибиотикам, большое значение имеют факторы патогенности *S. epidermidis*. КНС экспрессируют поверхностные адгезины. Вирулентный потенциал *S. epidermidis* реализуется за счет наличия нескольких поверхностных и поверхностно-ассоциированных протеинов, а также способности микроорганизма образовывать биопленки. К их числу относят фибриноген-связывающие и коллаген-связывающие протеины, а также гомолог протеина, ассоциированного с биопленками. Предполагают, что 50-70% КНС способны продуцировать гемолизины, гомологичные дельта-гемолизину *S. aureus* [8].

Наличие в хирургических отделениях резистентных штаммов бактерий вызывает трудности в лечении послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений пациентов после офтальмологических операций. Особое значение приобретает использование современных антисептиков, которые обладают антимикробным действием как в отношении чувствительных, так и панрезистентных к антибиотикам стафилококкам. Так, по данным литературы, чтобы уменьшить риск возникновения эндофтальмита, обычно перед операцией используют раствор ПВП-йода [9, 10]. В руководстве 2013 г. Европейского общества катарактальных и рефракционных хирургов (ESCRS) с целью профилактики эндофтальмита перед оперативным вмешательством рекомендуют использование ПВП-йода или хлоргексидина биглюконата для снижения числа колоний микроорганизмов на глазной поверхности [11]. В настоящее время в МНТК «Микрохирургия глаза» предоперационная подготовка пациента включает обработку операционного поля: кожи – 10% раствором ПВП-йода, слизистой оболочки глаза – 5% раствором ПВП-йода, экспозиция 2-3 минуты.

Опубликован ряд работ, в которых установлено, что препараты йода противопоказаны пациентам с аллергическим анамнезом или тяжелым расстройством щитовидной железы, поэтому проводили поиск альтернативных антисептических средств [9]. В рандомизированном, контролируемом, проспективном двойном слепом исследовании изучали влияние антисептика из группы полигексанидов (или полигексаметиленбигуанидинов, ПГМГ) – препарата Лавасепт®. До операции 67 пациентам закапывали по 3 капли 0,2% Лавасепта®, 1,25% ПВП-йода или раствора Рингера, при этом на слизистой конъюнктивы у них обнаруживали по 5 колониеобразующих единиц (КОЕ). Наблюдала достоверно ( $P=0,05$ ) большее снижение числа КОЕ при использовании Лавасепта® по сравнению с ПВП-йод. При этом отмечали хорошую переносимость обоих препаратов пациентами, а также эффект последствия полигексанида, что делает эту группу антисептиков перспективными в качестве альтернативы йодсодержащим препаратам. Отметим, что в Германии с 2004 г. 0,04% полигексанид рекомендован для предхирургической антисептики глазной поверхности [12]. Есть ряд публикаций, в которых описано эффективное применение 0,02% полигексанида для лечения акантамёбных кератитов [13-16]. В наших исследованиях было показано, что полигексаниды обладают не только выраженным бактерицидным действием, но и

эффектом последствия, проявляя антиадгезивный эффект в небактерицидных концентрациях в отношении *S. aureus* и *S. agalactiae*, продуцирующего адгезивный белок SspB1 (*sspB1+*) [17, 18].

Селективное биоцидное действие полигексанидов на микроорганизмы обусловлено тем, что фосфолипидные клеточные бислоиные мембраны микроорганизмов, состоящие только из фосфатидилглицерина или из фосфатидилглицерина и фосфатидилхолина и обладающие отрицательным суммарным электрическим зарядом, эффективно сорбируют биоцидный поликатион, который увеличивает проницаемость клеточных стенок, разрушает клеточную мембрану, коагулирует клеточное содержимое, ингибирует обменную функцию ферментов, нарушает воспроизводящую способность нуклеиновых кислот и белков, а также угнетает дыхательную систему. Такое воздействие, наряду с разрушением стенок клетки, приводит к гибели микроорганизма. При этом нейтральные бислои фосфатидилхолина клеток человека не вовлекаются во взаимодействие с полигексанидом. Изучено, что полигексанид в 2 раза менее токсичен, по сравнению с ПВП-йод, в исследованиях на культуре клеток, а также не оказывает цитотоксического действия в сочетаниях с полиэтиленгликолем и бетаином [19].

Эти работы послужили основанием для проведения данного исследования по оценке перспективности использования антисептика из группы полигексанидов в офтальмологической практике в отношении клинических изолятов *S. epidermidis*, устойчивых к фторхинолонам, а именно препарата Пронтосан® (Швейцария), поскольку он разрешен для обработки ран и слизистых оболочек.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пронтосан® – лекарственный препарат, раствор на основе 0,1% полиаминопропила бигуанида и ундециленового амидопропил-бетаина, производства фирмы «V. Braun Medical AG», Швейцария.

Глазные капли антибиотиков фторхинолонового ряда: ципрофлоксацина (Ципромед®), офлоксацина (Флоксал®), левофлоксацина (Сигницеф®).

Бактерицидную активность Пронтосана® исследовали чашечно-суспензионным методом [20] при коротких экспозициях, оценивая значение коэффициента редукции (Кред) в десятичных логарифмах (lg). Микробная нагрузка выделенного от пациента с гнойным кератоконъюнктивитом и эндофтальмитом клинического изолята *S. epidermidis* 66, устойчивого к фторхинолонам, составила  $1,5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл, экспозиции – 5-60 мин.

Для получения инокулюма готовили исходную суспензию суточной культуры стафилококка по стандарту 0,5 McFarland. Далее суспензию разводили в 31 раз в бульоне Мюллера-Хинтона, при этом полученная взвесь содержала  $5 \cdot 10^6$  КОЕ/мл. Конечная нагрузка тест-штамма составила  $5 \cdot 10^4$  КОЕ в 200 мкл, экспозиция – 24 часа.

Стандартный метод шахматной доски [Eliopoulos G.M., Moellering R.C. Antimicrobial combinations] in «Antibiotics in Laboratory Medicine. – 1996.] мы модифицировали для изучения бактерицидной активности полигексанида в микроразведениях [21] и для оценки усиления действия антибиотиков фторхинолонового ряда в присутствии небактерицидных концентраций

антисептика по показателям МПК антибиотиков и индекса фракционной ингибирующей концентрации (ΣФИК) [22]. Трактовка ΣФИК: синергизм – индекс до 0,5; индифферентность – индекс от 0,51 до 4; антагонизм – индекс более 4. Значение индекса ФИК от 0,51 до 0,6 может быть показателем наличия «потенциального синергизма».

Изучение токсичности полигексанида проводили на модели культуры клеток фибробластов легкого эмбриона человека (Биолот, Россия), оценивая их морфологическое состояние по 5-бальной шкале FDA (США) для определения цитотоксического действия (ЦТД) химических агентов: 0 баллов – отсутствие цитотоксического действия, 1 балл – слабое токсическое действие (20-25% лизированных клеток), 2 балла – мягкое токсическое действие (50% гибели клеток), 3 балла – умеренное токсическое действие (70-75% клеточного монослоя содержат округлые и/или лизированные клетки), 4 балла – тяжелое токсическое действие (100% деструкция клеточного монослоя). Согласно данной шкале тестируемые препараты отвечают требованиям безопасности, если ни одна из опытных клеточных культур не имеет степень ЦТД более 1 [23]. Кроме того, на культуре клеток оценивали антиадгезивную активность небактерицидных концентраций антисептика в отношении клинического изолята *S. epidermidis* 66, определяя степень инфицированности монослоя по морфологическому состоянию клеток фибробластов и интенсивность процесса адгезии тест-штамма по следующим показателям: 1) среднее число бактериальных клеток на одной эукариотической клетке (M±m); 2) процент пораженных клеток монослоя (ПК%); 3) обсемененность 100 клеток монослоя – индекс адгезии (ИА) – вычисляли по формуле  $IA = M \times ПК\%$ . Уровень адгезии микроба в опыте устанавливали по показателю индекса адгезии относительно контроля, принимаемого за 100% [Грабовская К.Б и др. Способ определения антиинфекционной активности биологически активного соединения / Авт. св-во №1359300 от 15.08.1987 г.].

Формирование конфлюэнтного монослоя фибробластов осуществляли на накладках Tissue Culture Coverslips 13 mm (Германия) в ростовой питательной среде Игла в течение 24 часов при 37 °С по стандартной методике [Грабовская К.Б., Толоян А.А. // Микробиология. – 1977. – №2]. Микробная нагрузка *S. epidermidis* 66 составила 10<sup>7</sup> КОЕ/мл. Время инкубации – 2 часа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки чашечно-суспензионным методом бактерицидного действия Пронтосана® интерпретировали по значению коэффициента редукции (K<sub>ред</sub>) – коэффициенту снижения КОЕ на чашке, а также по значению снижения уровня микробной популяции в процентах относительно контроля (табл. 1).

Таблица 1.

Оценка бактерицидного действия раствора «ПРОНТОСАН®»

Препарат	Экспозиция, мин	Коэффициент снижения КОЕ клинического изолята <i>S. epidermidis</i> 66 на чашке (K <sub>ред</sub> ) и снижение уровня микробной контаминации в % (n=3; контроль – 9,3 lg КОЕ на чашке)	
		K <sub>ред</sub>	%
Раствор «Пронтосан®»	5	4,53	99,99
	15	4,65	99,99
	30	4,74	99,999
	60	4,86	99,999

Антисептик Пронтосан® обладает выраженной бактерицидной активностью и в короткие экспозиции снижает уровень микробной популяции *S. epidermidis* 66 более чем на 99% при высокой начальной микробной нагрузке (10<sup>7</sup> КОЕ/мл), при этом данный эффект не снижается в течение времени эксперимента.

Для оценки усиления действия фторхинолонов в отношении резистентного клинического изолята *S. epidermidis* 66 в присутствии Пронтосана® модифицировали метод «шахматной доски», или перекрестного титрования. МПК антисептика в отношении тест-штамма составила 0,125±0 мкг/мл, МПК левофлоксацина – 16,25±2 мкг/мл, МПК офлоксацина – 31,2±4,7 мкг/мл, МПК цiproфлоксацина – 31,2±4,7 мкг/мл. Отметим, что для использования в клинике для обработки ран и слизистых оболочек Пронтосан® разрешен с концентрацией полигексанида 0,1% (1000 мкг/мл).

Данные рисунка 1 являются показателем достоверного снижения уровня резистентности клинического изолята *S. epidermidis* 66 в присутствии суббактерицидной дозы Пронтосана® 0,06 мкг/мл.

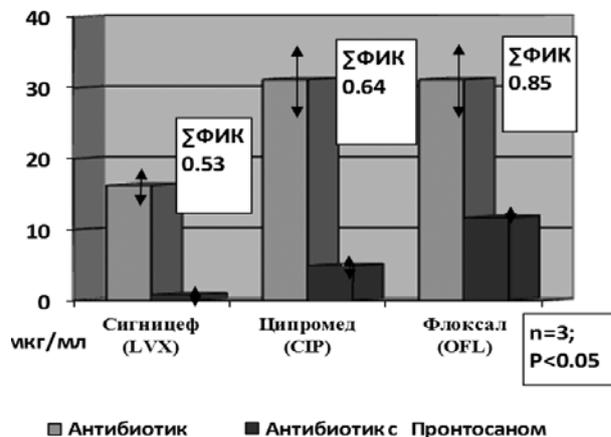


Рис. 1. Изменение уровня МПК глазных капель антибиотиков фторхинолонового ряда в присутствии 1/2 МПК Пронтосана®

По средним значениям результатов 3-х опытов в каждом случае наблюдали усиление действия левофлоксацина в 20 раз, цiproфлоксацина – в 6,4 раза, офлоксацина – в 2,7 раза. В случае сочетанного применения Пронтосана® с цiproфлоксацином и офлоксацином отмечали индифферентное действие двух антимикробных агентов, когда ΣФИК составил 0,64 и 0,85 соответственно. В опыте, где изучали сочетанное действие антисептика и левофлоксацина, ΣФИК был равен 0,53, что может быть показателем наличия «потенциального синергизма».

Наличие бактерицидного эффекта полигексанида при коротких экспозициях очень важно при использовании его в офтальмологической практике. Способность препарата в небактерицидной концентрации усиливать действие глазных капель антибиотиков фторхинолонового ряда свидетельствует о наличии эффекта последовательного антисептика. При этом есть данные, что и фторхинолоны не только убивают бактерии, но и ингибируют их рост в течение 2-6 часов после воздействия. Этот весьма полезный эффект называют постантибиотическим [10]. Сочетанное применение этих препаратов перспективно, учитывая схему применения антисептика и антибиотика в предо-

перационном и раннем послеоперационном периоде в офтальмологии.

Поскольку задачей исследования была оценка перспективности использования Пронтосана® в офтальмологии, поэтому опыты по оценке токсичности и антиадгезивного эффекта антисептика проводили на культуре клеток фибробластов легкого эмбриона человека в присутствии 10% телячьей сыворотки, что помогло приблизить условия опыта к условиям макроорганизма.

На рисунке 2 представлена фотография нормального монослоя фибробластов легкого эмбриона человека. Морфология клеток не нарушена.

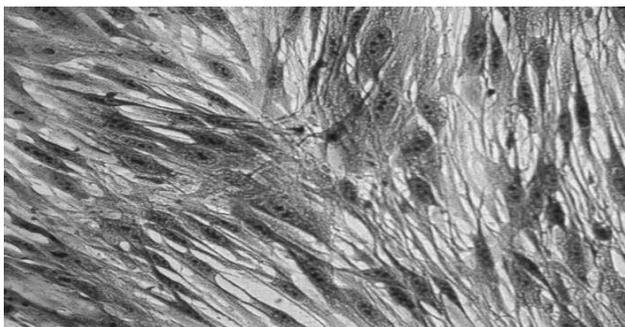


Рис. 2. Монослой фибробластов легкого эмбриона человека. Окраска по Романовскому-Гимзе, х400, 24 часа.

В дальнейшем в модельную среду вносили различные разведения антисептика Пронтосан® в присутствии 10% телячьей сыворотки и оценивали состояние монослоя фибробластов по 5-бальной шкале FDA (Рис. 3, 4).

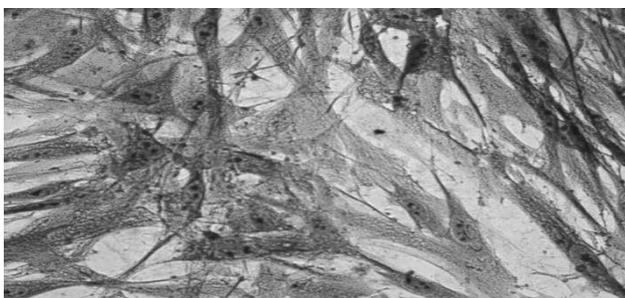


Рис. 3. Состояние монослоя фибробластов легкого эмбриона человека после воздействия Пронтосана® в дозе 100 мкг/мл (0,01% полигексанида) в присутствии 10% телячьей сыворотки. Окраска по Романовскому-Гимзе, х400, 2 часа.

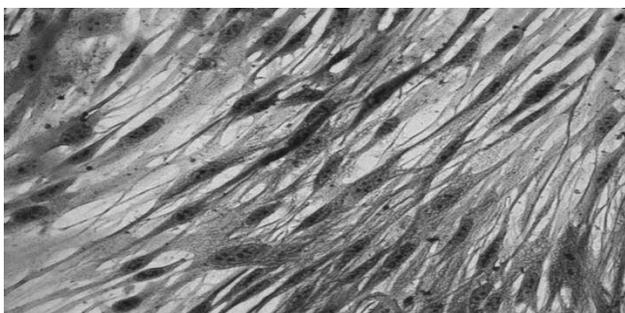


Рис. 4. Состояние монослоя фибробластов легкого эмбриона человека после воздействия 1/2 МПК Пронтосана® в дозе 0,06 мкг/мл в присутствии 10% телячьей сыворотки. Окраска по Романовскому-Гимзе, х400, 2 часа.

На рисунках 3 и 4 показано, что при воздействии

разведения Пронтосана® в концентрации 100 мкг/мл (0,01% полигексанида) и 1/2 МПК 0,06 мкг/мл не наблюдали какого-либо воздействия на морфологию фибробластов: монослой не нарушен, клетки сохранили свою целостность. Степень цитотоксического действия – 0 баллов.

В таблице 2 представлены результаты оценки показателей адгезии клинического изолята *S. epidermidis* 66 к клеткам монослоя фибробластов в присутствии 10% телячьей сыворотки и 1/2 МПК Пронтосана®.

Таблица 2.

Адгезивная активность *S. epidermidis* 66 в присутствии 1/2 МПК Пронтосана® 0,06 мкг/мл и 10% телячьей сыворотки

Тест-объект	Показатели интенсивности процессе адгезии <i>S. epidermidis</i> 66 (экспозиция 2 часа, n=5)				
	ИА	% ПК	МН	% адгезии от контроля	% подавления адгезии тест-штамма
Контроль: фибробласты + <i>S. epidermidis</i> 66	22,6±0,96	84,8±0,96	1916,48	100	-
Опыт: фибробласты + <i>S. epidermidis</i> 66 + 10% сыворотка	21,0±0,77	80,0±0,77	1680,0	87,7	12,3
фибробласты + <i>S. epidermidis</i> 66 + 1/2 МПК Пронтосана®	13,0±0,77	55,6±0,58	722,8	37,7	62,3
фибробласты + <i>S. epidermidis</i> 66 + 1/2 МПК Пронтосана® + 10% сыворотка	3,0±0,4	31,2±0,58	93,6	4,9	95,1

Как видно из таблицы, 10% телячьей сыворотки обладает собственной антиадгезивной активностью и снижает адгезию тест-штамма на 12%. Наличие в среде 1/2 МПК Пронтосана® (0,06 мкг/мл полигексанида) приводило к снижению уровня адгезии стафилококка на 62,3%, тогда как сочетанное использование антисептика и 10% телячьей сыворотки способствовало предотвращению адгезии *S. epidermidis* 66 на 95,1%. Полученные данные являются показателем наличия выраженного эффекта последствие действия антисептика, который в небактерицидных концентрациях почти полностью предотвращает адгезию тест-штамма стафилококка к фибробластам.

На рисунках 5-8 показана адгезия клинического изолята *S. epidermidis* 66 к клеткам монослоя фибробластов и в присутствии тестируемых агентов – 10% телячьей сыворотки и 1/2 МПК антисептика Пронтосана®. На рисунке 5 показана адгезия стафилококка: значительное число микроорганизмов в межклеточном пространстве, на поверхности и внутри фибробластов, монослой частично разрушен, степень ЦТД – 2 балла.

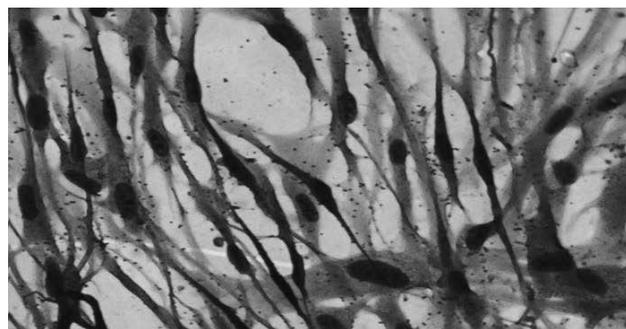


Рис. 5. Адгезия *S. epidermidis* 66 к фибробластам. Окраска по Романовскому-Гимзе, х400, 2 часа.

На рисунке 6 отмечена собственная антиадгезивная активность 10% телячьей сыворотки: количество адгезированных микробов снижено, монослой нарушен не значительно, степень ЦТД – 1 балл.

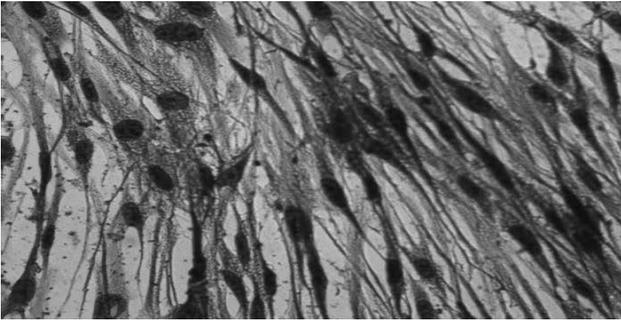


Рис. 6. Адгезия *S. epidermidis* 66 к фибробластам в присутствии 10% телячьей сыворотки. Окраска по Романовскому-Гимзе, x400, 2 часа.

На рисунке 7 показано достоверное снижение степени адгезии стафилококка к фибробластам в присутствии суббактерицидной концентрации Пронтосана®, микробы расположены на поверхности эукариотических клеток и в межклеточном пространстве. При этом наблюдали сохранение морфологии клеток монослоя, его целостность, степень ЦТД – 0 баллов.

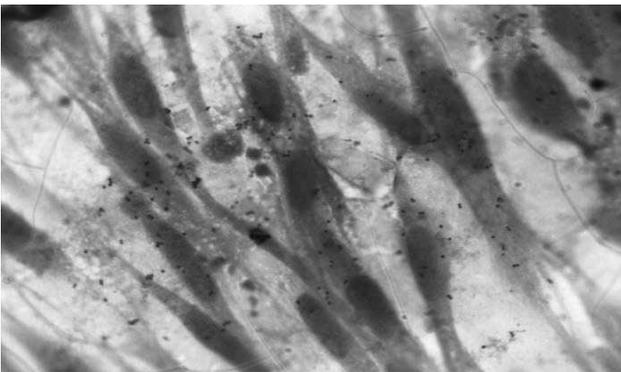


Рис. 7. Адгезия *S. epidermidis* 66 к фибробластам в присутствии 0,06 мг/мл Пронтосана®. Окраска по Романовскому-Гимзе, x1000, иммерсия, 2 часа. Снижение адгезии на 62%.

Рисунок 8 также является показателем достоверного на 95% подавления адгезии *S. epidermidis* 66 к фибробластам в присутствии суббактерицидной концентрации Пронтосана® и 10% телячьей сыворотки; оставшиеся микробные клетки расположены в межклеточном пространстве, монослой сохранен, степень

ЦТД – 0 баллов.

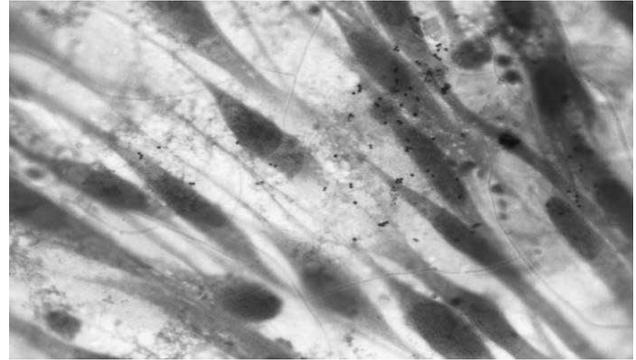


Рис. 8. Адгезия *S. epidermidis* 66 к фибробластам в присутствии 0,06 мг/мл Пронтосана® и 10% телячьей сыворотки. Окраска по Романовскому-Гимзе, x1000, иммерсия, 2 часа. Снижение адгезии на 95%.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препарат Пронтосан® при коротких экспозициях обладает высокой бактерицидной активностью в отношении клинического изолята *S. epidermidis* 66, устойчивого к фторхинолонам. МПК антисептика составила 0,125 мг/мл, что значительно меньше его клинически разрешенной дозы (1000 мг/мл). При исследованиях на модели культуры клеток фибробластов легкого эмбриона человека выявили, что полигексанид не обладает цитотоксическим действием в концентрации 0,01% (100 мг/мл), а также демонстрирует высокий антиадгезивный эффект в отношении тестируемого штамма стафилококка в дозе ½ МПК (0,06 мг/мл). В этой же концентрации антисептик способствует усилению действия глазных капель антибиотиков фторхинолонового ряда, снижая уровень резистентности клинического изолята *S. epidermidis* 66 от 2,7 до 20 раз по сравнению с исходным. Отметим, что, несмотря на индифферентное действие сочетания антибиотиков и антисептика по показателям индекса ФИК, наблюдали уменьшение значений МПК антибиотиков в присутствии суббактерицидной дозы полигексанида, что может быть показателем аддитивного действия двух антимикробных агентов.

На основании полученных данных можно считать перспективным применение антисептиков из группы полигексанидов для профилактики инфекционно-воспалительных осложнений в офтальмологии, особенно в случае устойчивости клинических изолятов КНС к фторхинолонам.

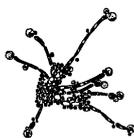
## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Mollan S.P., Gao A., Lockwood A., et al. Postcataract endophthalmitis: Incidence and microbial isolates in a United Kingdom region from 1996 through 2004 // J. Cataract Refract. Surg. – 2007. – Vol. 33, №2. – P. 265-268.
2. Kim S., Toma H., Midha N., et al. Antibiotic resistance of conjunctiva and nasopharynx evaluation study: a prospective study of patients undergoing intravitreal injections // Ophthalmology. – 2010. – Vol. 17, №12. – P. 2372-2378.
3. Брусина Е.Б. Эпидемиология ВБИ в офтальмологических отделениях. Руководство по медицинской микробиологии. Книга III. Том 2. Оппортунистические инфекции: клинико-эпидемиологические аспекты / Колл. авторов под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Волиной, Е.П. Ковалевой. – М.: БИНОМ, 2014. – С. 682.
4. Поляк М.С., Околов И.Н., Пирогов Ю.И. Антибиотики в офтальмологии. – СПб.: Нестор-История, 2015. – 352 с.
5. Майчук Д.Ю., Дехнич А.В., Сухорукова М.В. Оценка перспективности применения нетилмицина для топической терапии бактериальных инфекций в офтальмологии с учётом чувствительности основных возбудителей в РФ // Клини. микробиол. Антимикроб. химиотер. – 2015. – Т. 17, №3. – С. 241-249.
6. Bispo P., Alfonso E., Flynn H., Miller D. Emerging 8-Methoxy-fluoroquinolone resistance among methicillin-susceptible *Staphylococcus epidermidis* isolates recovered from patients with endophthalmitis // J. Clin. Microbiol. – 2013. – Vol. 51, №9. – P. 2959-2963.

7. *Holland E., McDonald M., Parekh J., Sheppard J.* Antibiotic resistance in acute postoperative endophthalmitis // *Ophthalmology*. – 2014. – Vol. 121, Suppl. 11. – P. S1-S9.
8. *Дмитренко О.А.* Род *Staphylococcus*. Руководство по медицинской микробиологии. Книга III. Том 1. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика. Колл. авторов / Составитель А.С. Лабинская, редактор Н.Н. Костюкова. – М.: БИНОМ, 2014. – С. 67.
9. *Hansmann F., Kramer A., Ohgke H., et al.* Lavasept as an alternative to PVP-iodine as a preoperative antiseptic in ophthalmic surgery. Randomized, controlled, prospective double-blind trial // *Ophthalmology*. – 2005. – Vol. 102, №11. – P. 1043-1046, 1048-1050.
10. *Астахов С.Ю., Вохмяков А.В.* Офтальмологические фторхинолоны в лечении и профилактике глазных инфекций // *РМЖ. Клиническая офтальмология*. – 2008. – Т. 9, №1. – С. 28-29.
11. Руководство ESCRS по профилактике и лечению эндофтальмита после операции по удалению катаракты: данные, дилеммы и выводы: <http://escrs.org/endophthalmitis/guidelines/RUSSIAN.pdf>.
12. *Hansmann F., Kramer A., Ohgke H., et al.* Polyhexamethylbiguanid (PHMB) as preoperative antiseptic for cataract surgery // *Ophthalmology*. – 2004. – Vol. 101. – P. 377-383.
13. *Lee J.E., Oum B.S., Choi H.Y., et al.* Cysticidal effect on acanthamoeba and toxicity on human keratocytes by polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine // *Cornea*. – 2007. – Vol. 26. – P. 736-741.
14. *Lim N., Goh D., Bunce C., et al.* Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of Acanthamoeba keratitis // *Amer. J. of Ophthalmology*. – 2008. – Vol. 145. – P. 130-135.
15. *Dart J.K.G., Saw V.P.J., Kinvilgton S.* Acanthamoeba keratitis: diagnosis and treatment. Update 2009 // *Amer. J. of Ophthalmology*. – 2009. – Vol. 148. – P. 487-499.
16. *Бикбов М.М., Суркова В.К., Усубов Э.Л., Никитин Н.А.* Акантамебный кератит и результаты его лечения (клинические случаи) // *Офтальмология*. – 2015. – Т. 12, №4. – С. 80-83.
17. *Афиногенова А.Г., Грабовская К.Б., Кулешевич Е.В. и др.* Влияние бигуанидов на формирование стрептококковой биопленки на модели культуры клеток фибробластов кожи эмбриона человека // *Инфекции в хирургии*. – 2011. – Т. 9, №1. – С. 5-13.
18. *Афиногенова А.Г.* Микробиологические аспекты разработки и применения антисептиков и антисептических средств для профилактики и лечения раневых инфекций: Автореф. дисс...док. биол. наук. – М., 2011. – 50 с.
19. *Hübner N.O., Kramer A.* Review on the efficacy, safety and clinical applications of polyhexanide, a modern wound antiseptic // *Skin Pharmacol Physiol*. – 2010. – Suppl. 23. – P. 17-27.
20. *Афиногенов Г.Е., Краснова М.В.* Чашечный метод оценки эффективности дезинфектантов и антисептиков. Методические рекомендации МЗ РФ № 2003/17. – 2004. – 13 с.
21. *Афиногенова А.Г., Ворошилова Т.М., Афиногенов Г.Е., Родионов Г.Г.* «Метод шахматной доски» как тест для оценки снижения уровня резистентности грамотрицательных микроорганизмов к карбапенемам в присутствии бисфосфоната // *Клин. микробиол. Антимикроб. химиотер.* – 2015. – Т. 17, №1. – С. 24-32.
22. *Поляк М.С.* Лабораторное обеспечение антибиотикотерапии. – СПб.: ООО «Анатолия», 2012. – 256 с., илл.
23. *Оценка токсичности материалов, изделий и объектов окружающей среды на альтернативных биологических моделях (экспресс-методы).* – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 220 с.

Поступила в редакцию журнала 01.07.2016

Рецензент: В.Н. Чеботкевич



## ВЛИЯНИЕ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА ЭНТЕРОКОККОВ НА АДГЕЗИЮ *CANDIDA* *ALBICANS* (BERKHOUT) К БУККАЛЬНЫМ ЭПИТЕЛИОЦИТАМ IN VITRO

<sup>1</sup>Заславская М.И. (профессор кафедры)\*,  
<sup>1</sup>Александрова Н.А. (аспирант), <sup>1</sup>Лукова О.А.  
(ассистент кафедры), <sup>2</sup>Карасева А.Б. (аспирант),  
<sup>2,3</sup>Суворов А.Н. (зав. отделом, зав. кафедрой)

<sup>1</sup> Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород; <sup>2</sup> Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; <sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

© Коллектив авторов, 2016

Выявлено, что метаболиты энтерококков снижают адгезию *Candida* разных видов на буккальных клетках, но не приводят к десорбции уже адгезированных на эпителиоцитах клеток *Candida* spp. Наибольшей активностью обладают продукты метаболизма энтерококков с молекулярной массой 3-10 кДа, которые вызывают конформационные изменения адгезивных молекул *Candida*. Предварительная инкубация *Candida albicans* с метаболитами *Enterococcus faecium* L3 подавляет способность микромицетов прикрепляться к IL-6/IL-8-стимулированным эпителиоцитам.

**Ключевые слова:** адгезия, *Candida*, метаболиты энтерококков, цитокины, эпителиоциты

## INFLUENCE OF ENTEROCOCCI METABOLITES ON *CANDIDA* *ALBICANS* (BERKHOUT) ADHESION TO BUCCAL EPITHELIAL CELLS IN VITRO

<sup>1</sup>Zaslavskaya M.I. (professor of the chair),  
<sup>1</sup>Aleksandrova N.A. (postgraduate student),  
<sup>1</sup>Lukova O.A. (assistant of the chair), <sup>2</sup>Karaseva A.B.  
(postgraduate student), <sup>2,3</sup>Suvorov A.N. (head of the  
department, head of the chair)

<sup>1</sup> Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod;  
<sup>2</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; <sup>3</sup> St.  
Petersburg State University, Russia

© Collective of authors, 2016

It is revealed that the enterococcal metabolites reduce the adhesion of different *Candida* species on the buccal cells, but do not cause desorption of already adhered *Candida* spp. on epithelial cells. The most active metabolites of enterococci have a molecular weight 3-10 kDa and induce conformational changes of *Candida* adhesion molecules. Pre-incubation of *Candida albicans* with *Enterococcus faecium* L3 metabolites suppress fungal adhesion on IL-6/IL-8-stimulated epithelial cells.

**Key words:** adhesion, *Candida*, cytokines, enterococcal metabolites, epithelial cells

## ВВЕДЕНИЕ

Адгезия является обязательным этапом колонизации слизистых оболочек *Candida* spp. [1-3]. При этом адгезию рассматривают не только как механическое прикрепление микроорганизма к субстрату, но и как процесс, в котором оба компонента системы «эпителиальная клетка – микроорганизм» активно взаимодействуют между собой [4, 5]. Известно, что представители нормальной микрофлоры могут оказывать различное влияние на взаимодействие *Candida* с эпителиоцитами слизистых оболочек человека [6].

Цель работы – исследование способности метаболитов энтерококков изменять адгезивные свойства микромицетов в экспериментальной тест-системе «*Candida albicans* – буккальные эпителиоциты» *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Чистые культуры штаммов *C. albicans* 601, *C. glabrata* 44-1, *C. krusei* 583, *C. tropicalis* 127 и *C. kefir* 17 выращивали (дрожжевая фаза) на декстрозном агаре Сабуро (HiMedia, India) (24 ч, 37 °С). Посевы смывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР, pH 7,2-7,4), трижды отмывали десятикратным объемом ЗФР (1000g, 15 мин), клеточные агрегаты удаляли центрифугированием (40g, 2 мин), затем ресуспендировали в концентрации 10<sup>7</sup> кл/мл в ЗФР.

Буккальные эпителиоциты получали от здоровых доноров 18-35 лет, утром, натощак, путем соскоба с внутренней поверхности щеки. Эпителиальные клетки трижды отмывали от слюны ЗФР (40g, 5 мин), готовили взвесь с концентрацией 10<sup>6</sup> кл/мл. Концентрацию эпителиоцитов определяли путем измерения оптической плотности суспензии на денситометре DEN-1 (ООО «Biosan», Латвия). В каждой серии экспериментов использовали эпителиоциты, полученные не менее чем от 3-х доноров.

*Enterococcus faecium* (штаммы L3, 651, 682, 2482) и *Enterococcus faecalis* (штаммы 173-5, 174-3, 179-2, 4276, 4304, 4306, 4314) культивировали в бульоне TSB (Soybean-Casein Digest broth, Becton, Dickenson and Company, USA, France). Супернатанты отделяли от микробных клеток центрифугированием (2000g, 15 мин), затем фильтровали через бактериальные фильтры с диаметром пор 20 мкм (Sterile syringe filter, Corning, Germany).

Для оценки уровня искусственной колонизации *Candida*, полученные в дрожжевой фазе (10<sup>7</sup> кл/мл)\*\*, инкубировали в равных объемах (по 0,5 мл) с взвесью эпителиоцитов (10<sup>6</sup> кл/мл) в ЗФР (30 мин, 37 °С), встряхивая каждые 5 мин. Эпителиоциты трехкратно отмывали ЗФР (40g, 5 мин) от неприкрепившихся микромицетов, из осадка клеток (0,2 мл) готовили мазки [7]. Полученные препараты фиксировали 96% этанолом (10 мин), окрашивали 0,25% водным раствором азур А (Sigma, USA). Индекс искусственной колонизации определяли как среднее количество адгезированных *Candida* в перерасчете на один эпителиоцит (канд/эп) после световой микроскопии 100 эпителиальных клеток.

Для фракционирования растворимых продуктов

\*\* Выбранная концентрация *Candida* дает максимальные показатели искусственной колонизации и минимальное количество свободных микромицетов в поле зрения при подготовке микроскопических препаратов

\* Контактное лицо: Заславская Майя Исааковна,  
e-mail: maya\_zaslav@rambler.ru

метаболизма энтерококков полученный фильтрат центрифугировали в пробирках со встроенным микрофильтром (Amicon® Ultra-15) с диаметром пор для молекул 3кДа, 10кДа или 30 кДа (6000g, 40 мин). Полученные после центрифугирования фракции бактериальных метаболитов с атомной массой менее 3кДа, 10кДа или 30 кДа соответственно использовали в дальнейших экспериментах.

Молекулярно-генетические исследования штаммов энтерококков для выявления генов *entA*, *entB*, *entXa*, *entXb*, *lac*, *entP*, *cylA*, *cylB*, *cylM*, кодирующих цитолитины и бактериоцины [8], проводили методом ПЦР с ДНК праймерами, сконструированными для данной работы, по методике, описанной ранее [9]. При конструировании праймеров применяли программу Primer 3.0 National Institutes of Health. Хромосомную ДНК энтерококков выделяли с помощью наборов «ДНК-ЭКСПРЕСС» Литех, Россия.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы исследовали влияние продуктов метаболизма различных штаммов *E. faecalis* и *E. faecium* на способность *C. albicans* штамм 601<sup>\*\*\*</sup> прикрепляться к эпителиальным клеткам *in vitro*. Грибы обрабатывали продуктами метаболизма энтерококков в течение 30 мин при 37 °С, инкубировали с буккальными эпителиоцитами (30 мин, 37 °С), затем отмывали эпителий от неприкрепившихся микроорганизмов. Подсчитывали уровень искусственной колонизации *C. albicans* на эпителиоцитах. В контроле вместо метаболитов энтерококков использовали стерильный бульон TSB.

В большинстве случаев было выявлено снижение адгезивной способности *C. albicans* после обработки метаболитами энтерококков (табл.1).

Таблица 1

### Антикандидозная активность и способность продуцировать бактериоцины и цитолитины у различных штаммов *E. faecium* и *E. faecalis*

Штаммы энтерококков	Кратность снижения адгезии <i>C. albicans</i> на эпителиоцитах под действием метаболитов энтерококков (количество раз), $M \pm m$	Наличие генов, кодирующих цитолитины и бактериоцины
<i>E. faecium</i> L3	1,77±0,29*	lcbE, entA, entB, entXa, entXb
<i>E. faecium</i> 2482	1,20±0,17	cylA, cylB, cylM
<i>E. faecium</i> 682	1,19±0,15	cylA, cylB, cylM, lcbE
<i>E. faecium</i> 651	1,17±0,17	cylA, cylB, cylM
<i>E. faecalis</i> 4306	1,60±0,36*	cylA, cylB, cylM, entXa, entXb
<i>E. faecalis</i> 179-2	1,47±0,11*	отсутствуют
<i>E. faecalis</i> 4314	1,26±0,14*	cylA, cylB, cylM, entXa, entXb
<i>E. faecalis</i> 174-3	1,20±0,13	отсутствуют
<i>E. faecalis</i> 173-5	1,16±0,16	отсутствуют
<i>E. faecalis</i> 4304	0,95±0,11	lcbE
<i>E. faecalis</i> 4276	0,90±0,14	отсутствуют

\* – достоверность отличий относительно контроля ( $p < 0,05$ )

Антиадгезивный эффект энтерококков в отношении *C. albicans* носил выраженный штаммоспецифический характер. При этом достоверное снижение адгезии *C. albicans* на эпителиоцитах наблюдали после обработки фунгальных клеток метаболитами *E. faecium* L3, *E. faecalis* 4306, *E. faecalis* 179-2, *E. faecalis* 4314 ( $p < 0,05$ ); тенденцию к снижению адгезивных свойств

\*\*\* Данный штамм отличался средними, но наиболее постоянными показателями адгезии.

у грибов прослеживали также при обработке микромицетов метаболитами других штаммов энтерококков (табл. 1).

Исследовали антиадгезивный эффект продуктов метаболизма энтерококков на *Candida* разных видов с использованием штамма *E. faecium* L3, метаболиты которого обладали наибольшим воздействием на грибы (табл.1). Установлено, что антиадгезивный эффект продуктов метаболизма энтерококков проявлял себя не только в системах с *C. albicans*, но также и с другими видами *Candida* (табл. 2). При этом, выраженный эффект отмечали в экспериментах с *C. glabrata* 44-1, *C. krusei* 583 и *C. tropicalis* 127, адгезивность которых снижалась под действием метаболитов энтерококков в 1,77±0,29, 1,63±0,22 и 1,25±0,09 раз соответственно ( $p < 0,05$ ). В экспериментах с *C. kefyr* 17 достоверных отличий от контроля не обнаружили, что было связано, по-видимому, с низкой адгезивной способностью штамма.

Таблица 2

### Влияние продуктов метаболизма *E. faecium* L3 на адгезию *Candida* spp. к буккальным эпителиоцитам, $M \pm m$

Виды <i>Candida</i>	Показатель адгезии ( <i>Candida</i> /эпит.)		Кратность снижения адгезии <i>Candida</i> на эпителиоцитах (количество раз)
	Контроль: интактные <i>Candida</i>	<i>Candida</i> после обработки метаболитами	
<i>C. albicans</i> 601	5,79±0,87	3,37±0,39*	1,72±0,16*
<i>C. glabrata</i> 44-1	5,79±0,86	3,45±0,39*	1,77±0,29*
<i>C. krusei</i> 583	2,33±0,43	1,67±0,37*	1,63±0,22*
<i>C. tropicalis</i> 127	3,07±0,42	2,57±0,27*	1,25±0,09*
<i>C. kefyr</i> 17	0,76±0,05	0,82±0,13	0,94±0,06

\* – достоверность отличий относительно контроля ( $p < 0,05$ )

Исследовали влияние продуктов метаболизма энтерококков на адгезивность буккальных эпителиоцитов. Для этого клетки буккального эпителия инкубировали с метаболитами *E. faecium* L3, затем проводили эксперимент по оценке уровня искусственной колонизации *Candida* на эпителиоцитах. В контроле использовали эпителиальные клетки, не обработанные метаболитами энтерококков. Установлено, что продукты метаболизма энтерококков слабо влияли на буккальные эпителиоциты, повышая адгезивный потенциал клеток в 1,07 раз ( $p < 0,05$ ). Такая незначительная реакция могла быть связана с отсутствием специфических мишеней на эпителиоцитах для литических ферментов *E. faecium* или со способностью буккальных клеток к быстрой регенерации своего адгезивного аппарата.

Энтерококки относятся к молочнокислым бактериям [8, 10], поэтому мы предположили, что негативное влияние метаболитов энтерококков на адгезивные свойства микромицетов могло быть обусловлено воздействием молочной кислоты. Для проверки этого предположения был определен pH супернатанта бульонной культуры *E. faecium* L3, выращенной на триптическом соевом бульоне (ТСБ), который составлял 6,6 (Hanna HI 2210). В контроле в стерильный бульон ТСБ добавляли молочную кислоту, доводя pH до того же значения, что и в опытном образце с метаболитами энтерококков. Негативным контролем служил стерильный бульон ТСБ с pH=7,0.

Выявили, что закисление среды молочной кислотой до pH 6,6 приводило к достоверному повышению адгезии *Candida* на буккальных эпителиоцитах в 1,15

раз ( $p < 0,05$ ). В то же время, супернатант бульонной культуры, содержащий метаболиты энтерококков, с аналогичным рН (6,6) снижал адгезивность грибов к эпителиоцитам в 1,26 раза ( $p < 0,05$ ). Таким образом, культуральные среды, имеющие одинаковый рН, но содержащие разные органические компоненты, разнонаправлено влияли на адгезивность *Candida*; это означало, что рН среды не определяет направление в изменении их адгезивности. Снижение адгезии *C. albicans* на эпителиоцитах также нельзя было объяснить гибелью микромицетов под действием продуктов метаболизма энтерококков, поскольку ранее в нашей лаборатории было установлено отсутствие достоверных различий в адгезивной активности живых и инактивированных клеток этих микромицетов [6].

Мы предположили, что снижение адгезивности *C. albicans*, обработанных метаболитами энтерококков, могло быть следствием экранирования молекул адгезии либо структурных изменений рецепторного аппарата грибов. В последующих экспериментах мы проверили данные гипотезы. С целью удаления нековалентно связанных частиц клетки *Candida* обрабатывали метаболитами *E. faecium* L3, затем трижды отмывали десятикратным объемом ЗФР, смешивали в равных объемах (0,5 мл) с 0,1% водным раствором додецилсульфата натрия (ДДС) при постоянном перемешивании (20 °С, 10 мин,  $6 \cdot 100 \text{ мин}^{-1}$ ) на термомиксере («Eppendorf», США), отмывали и ресуспендировали в ЗФР. Контролем служили интактные клетки, обработанные ДДС. Обнаружили, что удаление нековалентно связанных молекул с поверхности грибов не приводило к восстановлению исходной адгезивной активности *C. albicans*. Таким образом, снижение адгезивных способностей клеток грибов после их экспозиции с продуктами метаболизма энтерококков было результатом конформационных изменений адгезивных молекул *Candida*. Это было показателем того, что адгезины грибов не экранировались, а необратимо модифицировались под действием метаболитов энтерококков, обладающих, возможно, ферментативной активностью.

Для выявления наиболее активной фракции, обладающей выраженным воздействием в отношении адгезивного аппарата *Candida*, продукты метаболизма энтерококков разделяли с помощью центрифужных пробирок со встроенными микрофильтрами (Amicon® Ultra-15). Клетки *C. albicans* обрабатывали отдельными фракциями, содержащими продукты метаболизма с молекулярной массой менее 30, 10 и 3 кДа, затем исследовали уровень искусственной колонизации грибов на эпителиоцитах.

Установили, что метаболиты *E. faecium* L3 из разных фракций по-разному влияли на адгезивность *C. albicans* (Рис.1).

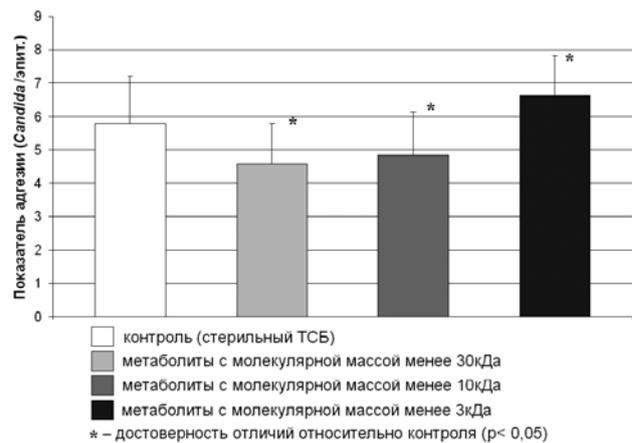


Рис. 1. Влияние различных фракций продуктов метаболизма энтерококков на адгезивность *C. albicans* штамм 601 в тест-системе с эпителиоцитами.

Так, метаболиты энтерококка, содержащие белки и пептиды с молекулярной массой менее 30 кДа и 10 кДа, снижали способность *Candida* адгезироваться на буккальных эпителиоцитах в 1,41 и в 1,36 раза соответственно ( $p < 0,05$ ), при этом значимых различий в антиадгезивном эффекте между этими фракциями не наблюдали ( $p > 0,05$ ). Метаболиты с молекулярной массой менее 3 кДа, наоборот, повышали адгезивность грибов в 1,25 раза. Исходя из полученных данных, установлено, что большинство метаболитов энтерококков, обладающих повреждающим (либо модифицирующим) эффектом в отношении адгезинов *Candida*, имели молекулярную массу от 3 до 10 кДа. Известно, что именно в этом диапазоне молекулярных весов определяются антимикробные пептиды – энтероцины. Например, штамм *E. faecium* L3, обладающий наиболее выраженным эффектом по подавлению адгезивной способности *Candida* (табл.1), характеризуется наличием пяти генов бактериоцинов в геноме, причем экспрессия двух из пяти обнаруженных генов доказана [11, 12].

При исследовании штаммов с использованием специфических ДНК праймеров к генам некоторых из бактериоцинов (табл.1.) выявили, что, наряду с *E. faecium* L3, еще два штамма энтерококков, чьи продукты метаболизма существенно снижали адгезивность *Candida* (*E. faecalis* 4306 и *E. faecalis* 4314), имели гены антимикробных пептидов и цитолизина. При этом обратили внимание на тот факт, что у всех вышеуказанных штаммов энтерококков обнаружили гены бактериоцинов EntXa и EntXb. Можно предположить, что продукты экспрессии данных генов могли обусловить феномен подавления адгезии *Candida* в системах с эпителиоцитами. В то же время, мы отметили, что у штамма *E. faecalis* 179-2, также обладающего выраженной антикандидозной активностью в экспериментах, не выявили генов бактериоцинов и цитолизина (табл. 1.). Это дает возможность предположить, что энтерококки могут продуцировать достаточно широкий спектр молекул из различных функциональных групп, способных вызывать структурные изменения в адгезивном аппарате *Candida*.

На следующем этапе изучали влияние продуктов метаболизма энтерококков на способность ранее адгезированных *Candida* открепляться от эпителиоцитов (десорбцию). Для этого, мукозальные клетки инкубировали с грибами (30 мин, 37 °С), после чего обраба-

тывали метаболитами энтерококков, затем определяли индекс искусственной колонизации эпителиоцитов. Установлено, что обработка метаболитами энтерококка не оказывает влияния на десорбцию *Candida* с буккального эпителия ( $p > 0,05$ ). Следовательно, продукты метаболизма энтерококков оказывают влияние на рецепторы адгезии грибов до момента их контакта с клетками эпителия.

Известно, что кандидоз является оппортунистической инфекцией, и ее развитию могут способствовать воспалительные реакции [13]. При патологическом процессе повышается уровень различных цитокинов, например, таких как IL-6, IL-8 и пр., которые относятся к медиаторам, запускающим и поддерживающим воспалительную реакцию [14, 15]. Выявлено, что обработка эпителиоцитов IL-6, IL-8 повышала адгезивность буккальных клеток в отношении *C. albicans* [7], что косвенно указывает на то, что воспалительные процессы могут способствовать контаминации эпителия грибами. С другой стороны, как нами было показано ранее, метаболиты энтерококков – представителей нормальной микрофлоры – снижали адгезию *Candida* на эпителиоцитах. Для оценки совместного действия этих факторов на систему «*Candida* - эпителиоциты» был проведен ряд экспериментов с цитокинами и метаболитами энтерококка. Эпителиоциты обрабатывали IL-6, («Sigma», USA;  $10^{-12}$  г/мл), IL-8 («Sigma», USA;  $10^{-12}$  г/мл), трижды отмывали и инкубировали с *Candida*, обработанными метаболитами энтерококка (30 мин, 37°C). В контроле использовали буккальные эпителиоциты, обработанные IL-6 или IL-8 с интактными *Candida*. Негативным контролем служили интактные эпителиоциты, взаимодействующие с необработанными грибами. Выявлено, что уровень адгезированных *Candida* на эпителиоцитах, прединкубированных с IL-6 или IL-8, существенно повышался – в  $1,51 \pm 0,26$  и  $1,42 \pm 0,25$  раза соответственно ( $p < 0,05$ ). В то же время, адгезия грибов, предварительно обработанных метаболитами энтерококков, на буккальных эпителиоцитах, контактировавших ранее с цитокинами (IL-6 или IL-8), была значительно ниже по сравнению с адгезией в системе «интактные *C. albicans* - эпителиоциты, об-

работанные интерлейкинами» (Рис. 2) и снижалась до уровня показателей негативного контроля. Таким образом «негативный эффект» цитокинов на эпителий, связанный с усиленной контаминацией буккальных клеток микромицетами, может быть нивелирован предварительной обработкой *Candida* продуктами метаболизма энтерококков.

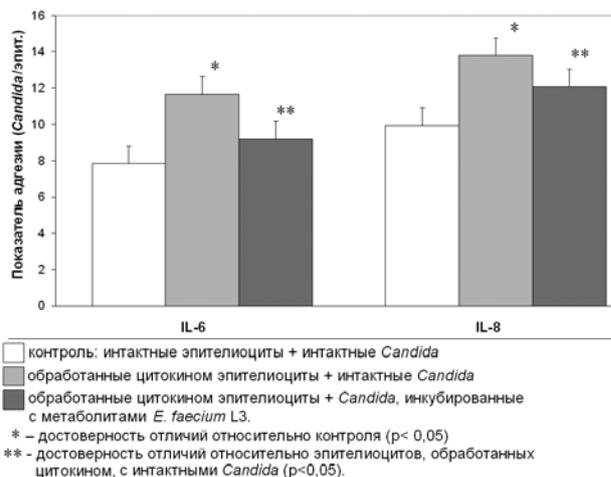


Рис. 2. Влияние цитокинов IL-6, IL-8 и метаболитов *E. faecium* L3 на экспериментальную тест-систему «*C. albicans* - эпителиоциты».

## ВЫВОДЫ

1. Метаболиты энтерококков снижают адгезивность *Candida* spp. в экспериментальной тест-системе с буккальными эпителиоцитами *in vitro*.

2. Метаболиты энтерококков, преимущественно с молекулярной массой 3-10 кДа, вызывают изменения в рецепторном аппарате *Candida* и не повреждают адгезивные структуры эпителиоцитов человека.

3. Воздействие цитокинов IL-6 и IL-8 на буккальные клетки повышает уровень искусственной колонизации в системе «эпителиоциты – *C. albicans*». В то же время, прединкубация *C. albicans* с метаболитами *E. faecium* L3 подавляет способность микромицетов прикрепляться к IL-6/IL-8-стимулированным эпителиоцитам.

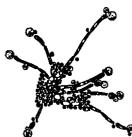
## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Занько С.Н. Вагинальный кандидоз // Охрана материнства и детства. – 2006. – №1 (7). – С. 64-71.
2. Капустина О.А., Карташова О.Л. Факторы патогенности грибов рода *Candida* и возможность их регуляции эфирными маслами // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал) – 2013. – №1. URL: <http://www.elmag.uran.ru>.
3. Williams D.W., Jordan R. P. C., Wei X., et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces // J. Oral. Microbiol. – 2013. – Vol. 5, №10. – P. 340-358.
4. Naglik J.R., Moyes D.L., Wachtler B., Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity // Microbes Infect. – 2011. – №13. – P. 963-976.
5. Кремлева Е.А., Черкасов С.В., Бухарин О.В. Эпителиально-бактериальные взаимодействия как основа формирования микробиоценоза // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. – № 6. – С. 89-95.
6. Заславская М.И. Взаимодействие *Candida albicans* с нейтрофилами и эпителиоцитами в экспериментальных системах: Автореф. дисс... д.б.н. – М., 2009. – 49 с.
7. Заславская М.И., Маянский А.Н. Роль нуклеарного фактора-кВ в обеспечении взаимодействий нейтрофилов и клеток эпителия слизистой полости рта человека с *Candida albicans* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. – №5. – С. 61-65.
8. Ермоленко Е.И. Бактерицины энтерококков: проблемы и перспективы. Обзор литературы // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2009. – Сер. 11, Медицина. №3. – С. 184-201.
9. Criado R., Diep D.B., Aakra Å., et al. Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q Production and Immunity// Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72, №10. – P. 6653-6666.
10. Бондаренко В.М., Суворов А.Н. Симбиотические энтерококки и проблема энтерококковой оппортунистической ин-

- фекции. – М., 2007. – С. 30.
11. Karaseva A., Tsapieva A., Pachebat J., Suvorov A. Draft genome sequence of probiotic *Enterococcus faecium* strain L-3// Genome Announc. – 2016. – Vol. 4, №1: e01622-15.
  12. Yermolenko E., Kolobov A., Chernysh A., Suvorov A. Influence of synthetic peptide inducers on antibacterial activity of enterococci// Beneficial Microbes. – 2011. – Vol. 1, №1. – P. 253-257.
  13. Кунцевич Л.Д., Шибеева Е.В., Мишианов В.Р. и др. Возбудители генитального кандидоза у женщин и их чувствительность к антимикотикам // Вестник дерматологии и венерологии – 2009. – №4. – С. 45-48.
  14. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР. Медиа. – 2009. – 352 с.
  15. Москалёв А.В., Сбойчаков В.В., Рудой А.С. Общая иммунология с основами клинической иммунологии: учебное пособие. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 352 с.

Поступила в редакцию журнала 08.04.2016

Рецензент: Н.А. Новикова



# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИММУНОТЕРАПИИ НА МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНО- ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ СМЕШАННОЙ CANDIDA-БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ

**Шаталова Е.В. (профессор кафедры), Парахина  
О.В. (ассистент кафедры)\*, Чугуев А.С. (студент  
лечебного факультета)**

Курский государственный медицинский университет  
(кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии),  
Курск, Россия

©Коллектив авторов, 2016

*На популяционном уровне изучены механизмы формирования госпитальных штаммов возбудителей нозокомиальных инфекций (НИ) через иммунокомпрометированный организм по клинически значимым признакам. Установлено, что применение иммуномодуляторов способствует снижению числа антибиотикорезистентных и вирулентных особей в популяциях возбудителей НИ.*

**Ключевые слова:** госпитальные штаммы, иммунотерапия, смешанные инфекции, структура популяции

## EXPERIMENTAL STUDY OF IMMUNOTHERAPY INFLUENCE OF THE MECHANISM OF FORMATION OF HOSPITAL STRAINS – CAUSATIVE AGENTS OF PURULENT-INFLAMMATORY PROCESSES OF MIXED CANDIDA-BACTERIAL NATURE

**Shatalova E.V. (professor of the chair), Parachina  
O.V. (assistant of the chair), Chuguev A.S. (student of  
medical faculty)**

Kursk State Medical University (Chair of microbiology, virology,  
immunology), Kursk, Russia

©Collective of authors, 2016

*At the population level, the mechanisms of formation of hospital strains of nosocomial infections through immunocompromising the body by clinically significant signs have been studied. It was found that the use of immunomodulators reduces the number of antibiotic-resistant and virulent individuals in the populations of nosocomial infections pathogens.*

**Key words:** immunotherapy, mixed infection, hospital strains, population structure

\* Контактное лицо: Парахина О.В.,  
e-mail: parahina-1970@mail.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Одна из основных причин возрастания частоты нозокомиальных инфекций (НИ) – широкое распространение госпитальных штаммов условно-патогенных микроорганизмов, которые формируются в условиях стационара. Распространение госпитальных штаммов, прежде всего, стафилококков, псевдомонад, энтеробактерий и в последнее время – грибов рода *Candida*, обусловлено рядом особенностей последних, отражающихся на эпидемиологии внутрибольничных инфекций. Это обсеменение госпитальной среды носителями, контаминация медицинских приборов с образованием биопленки, длительная персистенция в окружающей среде, разнообразные механизмы устойчивости к антимикробным препаратам и, что особенно важно, скопление в стационарах иммунокомпрометированных больных за счет основного заболевания [1]. Все это помогает этим микроорганизмам быстро адаптироваться, выживать и получать селективные преимущества в больничной среде с накоплением в популяции вирулентных особей.

Особое беспокойство у врачей разных специальностей вызывает возрастание частоты гнойно-воспалительных процессов смешанной *Candida*-бактериальной природы. Это обусловлено выраженной тяжестью клинических проявлений, трудностями диагностики и химиотерапии таких больных [2].

Цель настоящего исследования – изучение динамики изменений структуры популяции возбудителей гнойно-воспалительных процессов смешанной этиологии по признакам вирулентности и лекарственной устойчивости в условиях иммуносупрессии организма и под влиянием иммуномодуляторов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполняли на мышах линии СВА, прошедших карантинный режим вивария Курского ГМУ и не имевших внешних признаков каких-либо заболеваний. Контрольные и опытные группы состояли из животных одной массы и одного пола, полученные из вивария одновременно. Требования Международного Комитета, изложенные в конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей (г. Страсбург, Франция, 18 марта 1986 г.), в работе были полностью соблюдены.

Для создания иммуносупрессии в организме животных нами была выбрана модель термического ожога III-V степени площадью 30% поверхности тела, который вызывали с помощью прибора для нанесения дозированного ожога [Минухин В.В., Шамрай В.Г. Устройство для нанесения дозированного ожога мелким животным // Деп. во ВНИИМИ. – 1985. – № Д-9976]. Через сутки после ожога рану инфицировали смесью суточных бульонных культур (по 0,1 мл 2 млрд. взвеси), выделенных от больных с гнойно-воспалительными процессами (*Candida albicans* + *Pseudomonas aeruginosa*). Популяции микробов из инфицированной ожоговой раны получали путем отпечатков с ее поверхности стерильными бархатными штампами на поверхность плотных питательных сред (ЦПХ-агар – для синегнойных бактерий и среда Сабуро – для грибов). Структуру популяции по признакам лекарственной устойчивости исследовали путем пересева 100 изолированных колоний со сред первичного посева на

чашки с МПА, содержащем 25 мкг/мл антибиотиков: карбенициллин, стрептомицин, полимиксин и канамицин (для синегнойных бактерий); амфотерицин В, леворин и нистатин (для *S. albicans*); по признакам патогенности – на 5% кровяной агар (гемолитическая активность) и на чашки Петри со свернутой лошадиной сывороткой (протеолитическая активность для псевдомонад).

Структуру популяций изучали у животных, не получавших иммуномодуляторы (на 14 сутки после инфицирования раны), а также по истечении 7 и 14 суток с момента инфицирования и применения иммуномодуляторов.

Показателями для оценки состояния уровня иммунной защиты были: фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови (% активных фагоцитов), фагоцитарное число (среднее количество фагоцитируемых микроорганизмов в расчете на один фагоцит), которые определяли по общепринятым методикам. По наличию лизосомальных катионных белков (КБ) в цитоплазме лейкоцитов периферической крови в мазках, окрашенных бромфеноловым синим, выявляли активность бактерицидных систем лейкоцитов [Шубич М.Г. // Цитология. – 1974. – Т. 16, №10].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ «Microsoft Office XP» с применением критерия Стьюдента и Вилкоксона-Манна-Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После изучения клональной структуры (100 колоний каждого штамма) популяций возбудителей гнойно-воспалительных процессов смешанной этиологии (*S. albicans* и *P. aeruginosa*) установлено, что в составе популяций всех изученных штаммов (12 штаммов грибов и 12 – псевдомонад), которые при определении антибиотикочувствительности методом стандартных дисков были отнесены к устойчивым, резистентные особи (клоны) составляли от 72,0% до 85,0% у *P. aeruginosa* и от 58,0% до 72,0% – у *S. albicans* (исходные культуры, табл. 1).

Таблица 1

### Структура популяции возбудителей и влияние иммунотерапии на механизм ее формирования

Изучаемые признаки	% особей в популяции (из 100 колоний)				p
	Исходная монокультура	От нелеченных животных (ожог + инфицирование)	От леченых животных (галавит + лидокаин)		
			14 сутки после инфицирования	7 сутки после лечения	
Показатели в разные сроки исследования					
Устойчивость к:	Популяция <i>P. aeruginosa</i>				
карбенициллину	72,0	100,0	58,0	47,0	<0,01
стрептомицину	75,0	100,0	50,0	30,0	<0,01
полимиксину	15,0	95,0	42,0	34,0	<0,01
канамицину	85,0	100,0	55,0	40,0	<0,01
Гемолиз	85,0	100,0	50,0	38,0	<0,01
Протеолиз	72,0	100,0	45,0	25,0	<0,01
Устойчивость к:	Популяция <i>S. albicans</i>				
Амфотерицину В	58,0	95,0	45,0	30,0	<0,01
Леворину	65,0	100,0	50,0	34,0	<0,01
Нистатину	72,0	100,0	55,0	42,0	<0,01
Гемолиз	55,0	85,0	30,0	25,0	<0,01

Примечание: достоверность различий с данными контрольной группы (нелеченные животные с ожогом и инфекцией).

При анализе данных, полученных нами, в динамике инфекционного процесса от иммуносупрессированных животных выявили достоверное изменение структуры популяции микроорганизмов в сторону возрастания числа клонов, резистентных к антибиотикам (табл. 1). Причем, отметим, что нарастание числа антибиотикорезистентных клонов в популяциях культур происходило при отсутствии селективного влияния антибиотиков, так как лечения животных антибиотиками не проводили.

Кроме того, в динамике инфекционного процесса наблюдали также достоверное увеличение в популяциях возбудителей числа клонов, обладающих признаками вирулентности: гемолиз – от 85,0% в популяциях грибов до 100,0% – в популяциях псевдомонад; протеолитически активных клонов в популяциях псевдомонад достоверно возросло с 72,0% у исходных культур до 100,0% на 14 сутки исследования после инфицирования (табл. 1). Таким образом, можно констатировать, что к концу эксперимента изначально гетерогенные популяции микроорганизмов становятся однородными по содержанию высоковирулентных и устойчивых к антибиотикам клонов ( $P < 0,01$ ).

Учитывая то, что иммуносупрессирующий организм животных способствует селекции наиболее вирулентных, с множественной лекарственной устойчивостью особей из состава популяции штаммов возбудителей, т.е. имеет место формирование штаммов с признаками «госпитальных» через иммунокомпрометированный организм, возникает необходимость разработки способов повышения антиинфекционной резистентности организма, в конечном итоге – предотвращения формирования госпитальных штаммов.

Принимая во внимание патогенез ожоговой болезни, для восстановления иммунологической реактивности организма животным вводили галавит (внутримышечно в дозе 200 мкг/мышь сразу после воспроизведения ожоговой травмы 1 раз в сутки в течение 3 дней) с лидокаином (внутрибрюшинно в те же сроки в дозе 8 мкг/кг массы тела). При этом предполагали возможность их синергидного действия и, соответственно, повышения терапевтического эффекта за счет неодинакового механизма их действия. Нами установлено, что сочетанное применение данных препаратов обладало выраженным иммуномодулирующим эффектом на все изучаемые показатели, достоверно ( $P < 0,01$ ) усиливая и превышая их уровни даже интактных животных. Так, активность фагоцитоза и фагоцитарное число у леченых животных на 14 сутки исследования составили 62,1+1,2 и 2,9+0,02 соответственно (табл. 2).

Отметим, что показатель КБ у леченых животных уже на 7 сутки исследования составил 0,1+0,03, а на 14 сутки – достоверно превысил средний гистохимический показатель КБ интактных животных – 0,26+0,03 (табл. 2). Это важно, поскольку известно, что наличие катионной белков в цитоплазме лейкоцитов периферической крови является весомым показателем при гнойно-воспалительных процессах любой этиологии.

Таблица 2

## Влияние иммунотерапии на показатели антиинфекционной защиты организма

Изучаемые показатели	Группы животных				
	Интактные	Ожог + инфицирование		Лечение галавит с лидокаином	
	Показатели в разные сроки исследования (сутки) М+m (n=25)				
	7-14	7	14	7	14
Активность фагоцитоза (%)	60,5±0,12	30,2±2,8	27,6±1,7 <sup>x</sup>	50,2±1,8	62,1±1,2 <sup>xx</sup>
Фагоцитарное число	2,1±0,05	0,7±0,02	0,6±0,03 <sup>x</sup>	1,2±0,05	2,9±0,02 <sup>xx</sup>
КБ-тест (средний гистохимический показатель)	0,1±0,02	КБ не обнаружены		0,1±0,03	0,26±0,03 <sup>x</sup>

Примечание: x = P<0,01 – достоверность различий с данными интактных животных; xx = P<0,01 – достоверность различий с данными контрольной группы (ожог + инфицирование).

Особого внимания заслуживают впервые полученные нами данные о существенных изменениях в составе популяций возбудителей гнойно-септических процессов на фоне иммунокоррекции. Применение галавита с лидокаином на 14 сутки исследования способствует достоверной (P<0,01) элиминации из состава популяций клонов с выраженным вирулентным потенциалом (от 25,0% до 38,0% – у псевдомонад и 25,0% – у грибов) и антибиотикорезистентностью (от 30,0% до 47,0% – в популяциях псевдомонад и от 30,0% до 42,0% – в популяциях грибов) (табл. 1).

Следовательно, есть основания предположить, что

результатом этих изменений будет снижение клинических проявлений инфекционного процесса и повышение эффективности антибактериальной терапии.

## ВЫВОДЫ

1. Популяции возбудителей нозокомиальных инфекций гетерогенны по признакам вирулентности и устойчивости к антибиотикам.

2. На фоне выраженной иммуносупрессии в динамике инфекционного процесса в организме создаются условия, когда из исходных гетерогенных популяций возбудителей гнойно-воспалительных процессов формируются штаммы с признаками «госпитальных».

3. Применение галавита с лидокаином обеспечивает выраженный протективный эффект за счет высокоэффективной коррекции антиинфекционной резистентности организма животных, что способствует достоверной элиминации из состава популяций микроорганизмов клонов, обладающих клинически значимыми признаками (выраженный вирулентный потенциал и антибиотикорезистентность), и, в конечном итоге, предупреждению формирования штаммов с признаками «госпитальных» нозокомиальных инфекций.

## Благодарность.

Авторы выражают благодарность ОБУЗ «Курская городская больница скорой медицинской помощи» в лице заведующей бактериологической лабораторией С.В. Пигаревой за организационную поддержку исследования.

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцев С.Н. Эпидемиологический надзор за внутрибольничными инфекциями – важнейший компонент системы управления качеством стационарной медицинской помощи // Вопр. экспертизы и качества мед. помощи. – 2010. – №4. – С. 24-28.
2. Шеховцова О.В., Шаталова Е.В., Жалнина Т.С. Влияние гнойно-воспалительного процесса *Candida*-бактериальной этиологии на проявление гиперчувствительности замедленного типа // Проблемы медицинской микологии. – 2010. – Т. 12, №2. – С. 143-144.

Поступила в редакцию журнала 20.07.2016

Рецензент: П.В. Калуцкий



# «АСПЕРГИЛЛЫ В СЕКЦИИ *CIRCUMDATI*» – НОВЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ОРИГИНАЛЬНОГО ОХРАТОКСИНА А

(Авторы публикации: Jens C. Frisvad<sup>1</sup>, J. Mick Frank<sup>2</sup>, Jos A.M.P. Houbraken<sup>3</sup>, Angelina F.A. Kuijpers and Robert A. Samson<sup>3\*)</sup>\*)

Обработка и представление публикуемых материалов: Елинов Н.П. (д.б.н., проф. кафедры), Рябинин И.А. (аспирант)

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

© Елинов Н.П., Рябинин И.А., 2016

**1. В секцию *Circumdati* включены** аспергиллы, пигментированные в жёлтый цвет – до цвета охры (красно-коричневой окраски конидий), но не чёрного цвета склероции, которые, по крайней мере, образуют один из следующих экстролитов: охратоксины, пеницилловые кислоты, ксантомегнины или меллеины. Исключением из этого выступает *A. robustus*, образующий чёрные склероции, фототрофные конидиофоры и ни одного экстролита, перечисленных выше. Основанное на полифазном подходе использование морфологических характеристик экстролитов и частичных β-тубулиновых последовательностей 20 видов могут быть различимы и, за исключением *A. robustus*, являются филогенетически и фенотипически сильно родственными. Семь новых видов описаны здесь (см. ниже раздел 2). 12 видов секции *Circumdati* продуцируют меллеин, 17 – образуют пеницилловую кислоту и 17 – продуцируют ксантомегнины, 8 видов с выраженным постоянством образуют большие количества охратоксина А: *Aspergillus cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. westerdijkiae*, *A. sulphurous* и *Neoperitromyces muricatus*. Два вида продуцируют большее или меньшее количество охратоксина А, но менее густой: *A. ochraceus* и *A. sclerotiorum*. Образование охратоксина у этих видов было подтверждено при использовании HPLC с диодным устройством детекции (определения) и сравнения аутентичности (соответствие подлиннику) стандартам. Согласно данным в научной литературе, четыре следующих вида продуцируют охратоксин А не постоянно и в следовых количествах: *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. petrakii* и *A. persii*.

Самыми важными видами рассматривают потенциальные продуценты охратоксина А в кофе, рисе, напитках и других пищевых продуктах, и таковыми называют *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* и *A. steinii*.

**2. К таксономическим новостям** ещё в 2004 г. отнесенным новым видам аспергиллов, впервые описанным Фрисвадом и Сэмсоном: *Aspergillus cretensis* Frisvad & Samson sp. nov., *A. flocculosus* F.&S. sp. nov.,

\* <sup>1</sup>Center for Microbial Biotechnology BioCentrum-DTU, Building 221, Technical University of Denmark, DK-2800 Kgs Lyngby, Denmark; <sup>2</sup> 33 Tor Road, Farnham, Surrey GW7 7BY, United Kingdom; <sup>3</sup> Centra-albureau voor Schimmelcultures. P.O. Box 85167.3508AD Utrecht. The Netherlands

\*\* Квинт-эссенция («наиболее существенное») в корреспонденции Р.А. Сэмсона

*A. neobridgeri* F.&S. sp. nov., *A. roseoglobulosus* F. & S. sp. nov., *A. steinii* F. & S. sp. nov., *A. westerdijkiae* F. & S. sp. nov., в качестве ключевых слов избраны: *Aspergillums ochraceus*, BenA., *Circumdati*, extrolites, ochratoxin, penicillic acid, xanthomegnin, mullein.

### 3. Проблема классификации микромицетов.

С учётом применения итогов таксономических исследований, имеющих место в накоплении соответствующих предложений, касающихся, прежде всего, соответствующих классификационных (таксономических) схем, перед которыми оказываются или оказались специалисты в разных областях биологически наук, включая супрамикробиологию и, соответственно, ряд субмикробиологических дисциплин, включая и молекулярную биотехнологию (по-лат. *Supra* – приставка = над, выше; *Sub* – приставка = под в предложениях с винительным и творительным падежами). В настоящее время к микроорганизмам относят именно способных расти и размножаться на полноценных питательных средах по компонентному составу питательных сред (по источникам углерода, азота, микроэлементов, витаминов, кислот) при условии, что это не анаэробы и, в особых случаях, микроаэрофилы.

Нельзя называть вирусы, вириды и прионы микроорганизмами, так как все они – микробы, а не микроорганизмы, и, следовательно, нельзя использовать слово «микробиота», как поступают многие лица, не задумываясь над смысловым значением подобных словосочетаний. Ещё раз следует напомнить тот факт, что микробиота – это мир возможных микроскопических растений, который, как правило, отсутствует в/на организмах представителей царства *Animalia* (одушевлённых, от лат. *Anima* = душа, жизнь). И если кто-то считает, например, зелёные водоросли микроорганизмами, то это ошибочное заключение. Они должны быть включены в самостоятельное Царство Растений, а термин «микробиота» должен быть отнесен к запрещённому к упоминанию в составе «микроорганизмов» или «микробов». Когда сегодня названный термин «микробиота» слышен весьма часто из уст информаторов по радио, телевидению, даже преподавателей ВУЗов – это есть свидетельство неграмотности толкователей в таксономической области знаний (даже по биологическим наукам или соответствующим отраслям знаний).

Применительно к некоторым микромицетам сравнительно активно проводят научно-практические разработки в течение последних 20 лет. Мы имеем в виду ДНК-сиквенирование локусов, названных известными в мире исследователями. В качестве примера назовем Frisvas J.C. и Larsen Th.O. из Дании, опубликовавших весьма содержательную работу на тему: «Хемотрофизм в роде *Aspergillus*». Дж. Варга и В.А. Сэмсон в 2007 г. опубликовали иерархическое древо максимальной парсимонии\*\*\* (анализ ядерного материала *Aspergillus* spp.) по определённым локусам (местам)-РНК. При этом были сформированы разные секции и подроды в роде *Aspergillums*, показанные на рисунках 1 и 2.

\*\*\* Парсимония = в буквальном смысле слова – это «экономия» или «прижимистость», или направление в филогенетической систематике = этот термин обозначает «правило». Другими словами: парсимония включает методы филогенетического анализа: процедуру выравнивания, филогенетические деревья и методы их построения.

Эти схемы представлены в монографических трудах выше названных авторов. При этом трёхугольные изображения больших и меньших объёмов соответствуют количеству изученного материала. Локусами каждой секции в одном случае служили: LSU,  $\beta$ -тубулин, eLF-2HSP 70, TCP-1, митохондриальный

белок теплового шока 70 кДа; белок, несущий ДНК-зависимый АТФ-азный домен семейства SNF; cDC 42, АТФ-аза типа Р; в другом случае – кальмодулин, РНК-полимераза, часть 28S рДНК. На втором рисунке показана изменённость изученного древа.

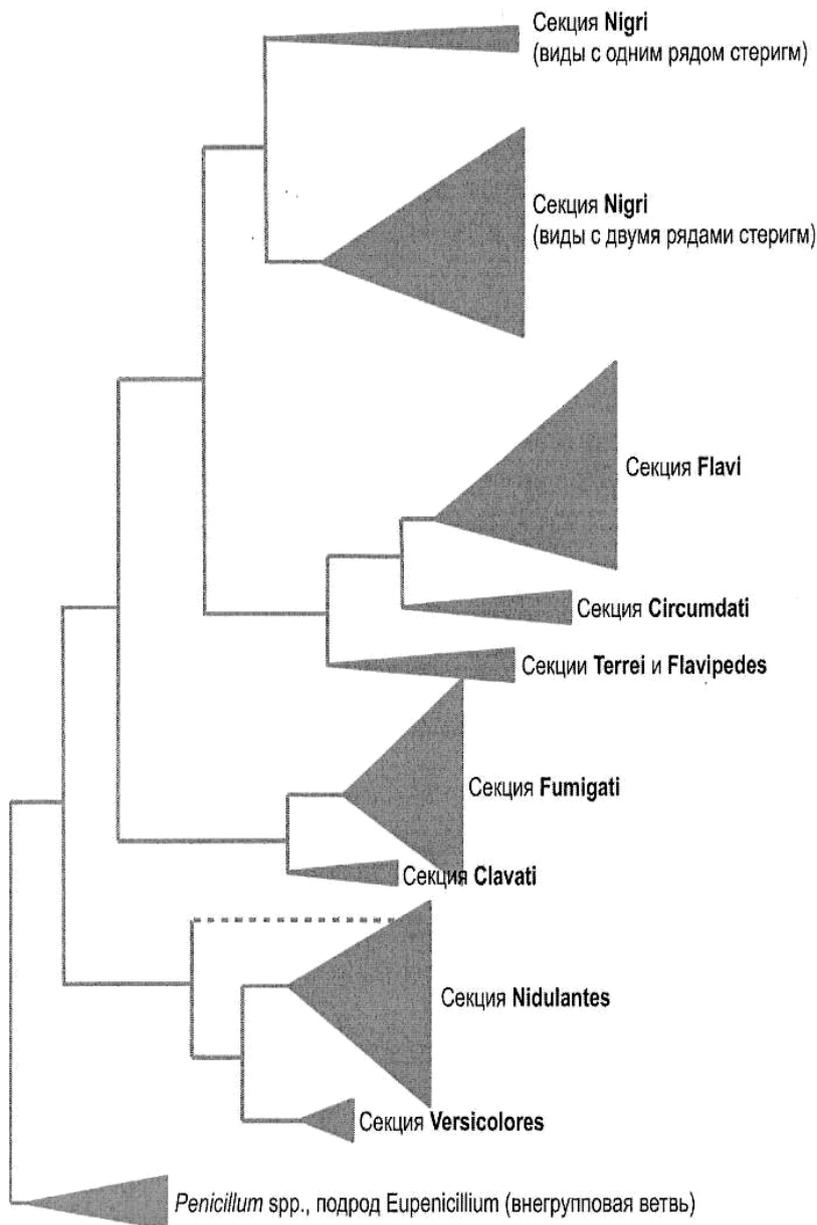


Рис. 1. Иерархическое древо максимальной парсимонии, построенное на основе ДНК-сиквенирования 10 локусов представителей различных секций рода *Aspergillus* spp. (LSU,  $\beta$ -тубулин, eLF-2, HSP70C, TCP-1, митохондриальный белок теплового шока 70kDa; белок, несущий ДНК-зависимый АТФазный домен семейства SNF; CDC42, АТФаза типа Р). Показана упрощенная схема оригинального древа, помещенного в монографии Varga J. и Samson R.A., 2007.

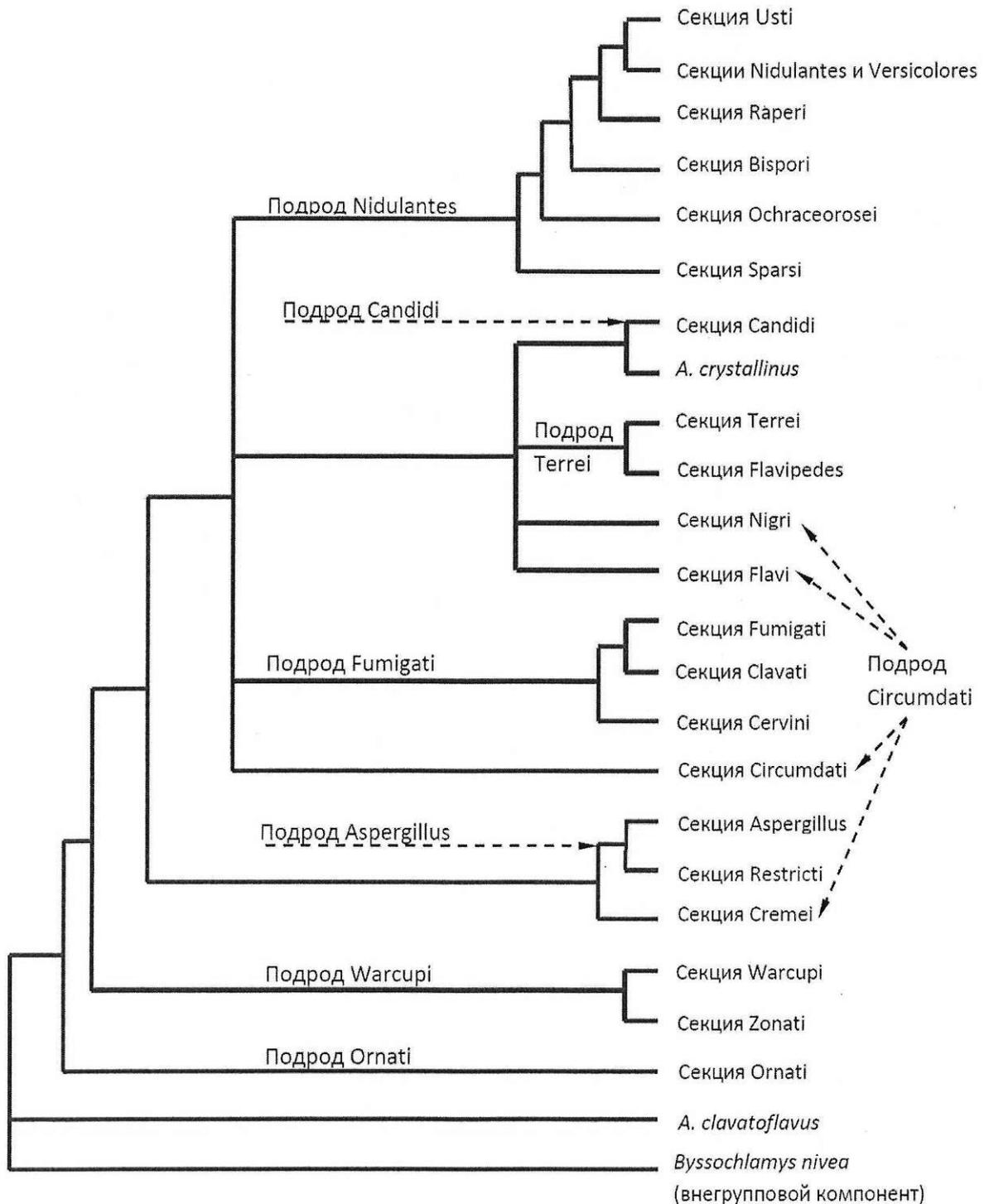


Рис. 2. Иерархическое древо максимальной парсимонии, построенное на основе ДНК-сиквенирования 3 локусов представителей различных секций рода *Aspergillus* spp. (кальмодулин, РНК-Р-полимераза, часть 28S рДНК). Показана измененная схема оригинального древа, помещенного в монографии Varga J. и Samson R.A., 2007.

Учитывая название нашей статьи с акцентом на одну секцию *Circumdati*, названной теперь подродом того же наименования, пришлось дополнить этот подрод и другими секциями: *Niger*, *Flavi*, *Cremei* и *Circumdati*. Названный подрод содержит большинство биотехнологически важных аспергиллов таких, как *A. niger*, *A. oryzae*, *A. tamarisii* и *A. terreus*. Разные виды *Aspergillus* species в различных секциях и подродах про-

дуцируют множество вторичных метаболитов (экстролитов) и, очевидно, перечень их будет возрастать при продолжении изучения метаболитов различных видов аспергиллов, включенных в разные секции и подроды. Мы решили привести химические структуры вторичных метаболитов в подроде *Circumdati* с экстрактами продуцентов, включенных в секции *Nigri*, *Flavi*, *Circumdati*, *Terrei* и *Flavipedes* (Рис. 3).

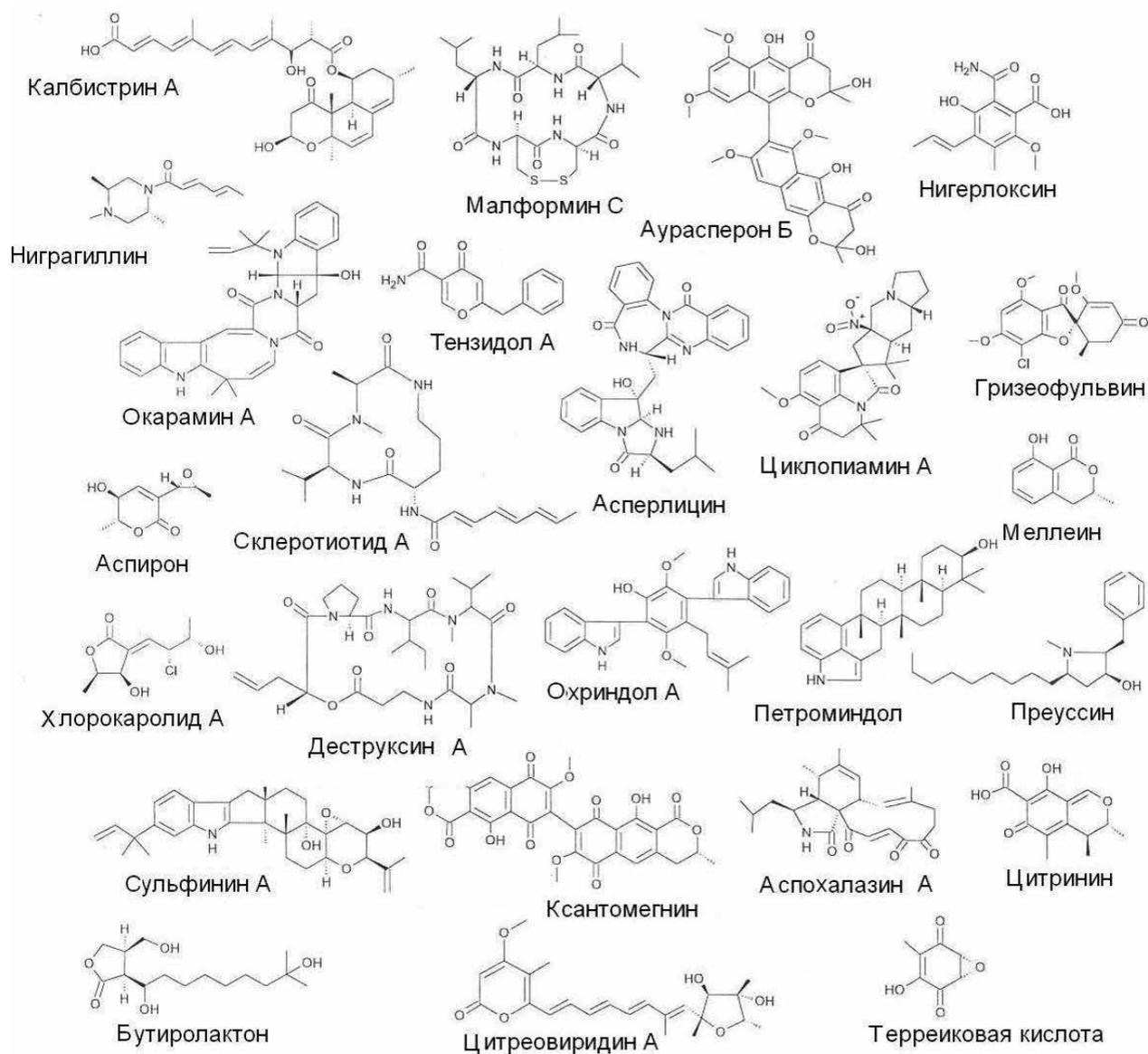


Рис. 3. Селекция уникальных экстролитов (вторичных метаболитов), образованных видами в подроде *Circumdati*, в секциях *Nigri*, *Flavi*, и *Circumdati*, *Flavipedes* и *Terrei* (по данным Frisvas J.C. и Larsen Th.O. «Хеморазнообразие в роде *Aspergillus*».

### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Samson R.A., Varga J. *Aspergillus* systematics in the genomic era. – Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007. – 206 pp.
2. Рогозин И.Б., Вульф Ю.И., Бабенко В.Н., Кунин Е.В. Эволюция генов эукариот и принцип максимальной парсимонии// ВООиС. – 2005. – Т. 9, №2. – С. 141-152.





## **АФИНОГЕНОВ Г.Е. К 75-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ: «МИКРОБИОЛОГ И ВРАЧ – 50 ЛЕТ ДЛЯ НАУКИ И ПРАКТИКИ»**

*«Ни один врач не имеет права  
считать себя на высоте своего призвания,  
если он не знает микробиологии...»*  
профессор Д.О. Отт

Геннадий Евгеньевич Афиногенов родился 15 июня 1941 года в Ленинграде. После окончания педиатрического факультета Кишиневского государственного медицинского института с 1964 по 1966 гг. работал врачом сельской больницы в Молдавии. С 1966 по 1969 гг. обучался в аспирантуре Ленинградского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена по специальности «микробиология», а после ее окончания был принят на должность младшего научного сотрудника. В 1970 г. Г.Е. Афиногенов защитил кандидатскую диссертацию на тему: «Влияние различных поверхностно-активных веществ на микрофлору ран», а в 1980 г. – докторскую диссертацию «Теоретические и клинические аспекты изучения антимикробного действия поверхностно-активных антисептиков в травматологии». В 1989 г. ему было

присвоено ученое звание профессора. С 1985 по 2012 гг. Геннадий Евгеньевич был руководителем отделения профилактики и лечения раневой инфекции РНИИТО им. Р.Р. Вредена, где произошло его становление как высокообразованного профессионала – микробиолога высокого профиля. В настоящее время он активно работает на кафедре челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии Санкт-Петербургского государственного университета.

Г.Е. Афиногенов – специалист высокой квалификации, обладающий глубокими познаниями в области микробиологии, эпидемиологии и химиотерапии, владеющий современными методами исследований как в эксперименте, так и в клинике, ученый с широким кругом научных интересов. Прежде всего, следует подчеркнуть важность его разработок по научно-практическому применению ПАВ как антисептиков расширенного диапазона противомикробной активности.

Г.Е. Афиногенов – активный изобретатель, им получено свыше 75 изобретений и патентов, а также автор более 515 печатных научных работ.

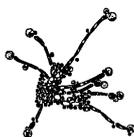
За большой вклад в медицину и клиническую микробиологию Международный биографический центр (Кембридж, Англия) включил в 1998 г. Геннадия Евгеньевича Афиногенова в список выдающихся людей XX века.

Г.Е. Афиногенов готовит кадры научных сотрудников: под его руководством защищены 19 кандидатских и 2 докторские диссертации.

Российской академией естествознания ему присвоено звание «Основатель научной школы» (2008). В 1984 и в 2001 гг. Г.Е. Афиногенов награжден знаком «Отличник здравоохранения», а в 1996 году – Почетной грамотой Министра здравоохранения РФ. В 2007 г. ему присвоено звание «Заслуженный врач РФ».

Г.Е. Афиногенов – академик Санкт-Петербургской инженерной академии (секция «Биотехника и биотехнология»), член Общества больничной гигиены Германии, член Общества гигиены и микробиологии Германии, член Европейской Ассоциации по Лечению Ран, председатель секции «Антисептики» Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии, член Правлений Ассоциации врачей-лаборантов, Общества «Внутрибольничные инфекции», Санкт-Петербургского отделения Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов.

Коллективы редакции нашего журнала и сотрудников учреждений, в которых активно протекала его плодотворная деятельность на благо здоровья населения нашей страны, сердечно поздравляют Геннадия Евгеньевича с Юбилеем, желают ему быть и впредь отменно здоровым, по-прежнему деятельным и результативным в борьбе с инфекциями на микробиологическом поприще!





**Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)  
Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н.Кашкина (НИИ ММ) СЗГМУ 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@szgmu.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@szgmu.ru. Manager of Editorial Office: E.S.Gukova

**«ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»**

Пер. № 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 04.10.2016. Формат 60×90 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 8.5. Тираж 999 экз.