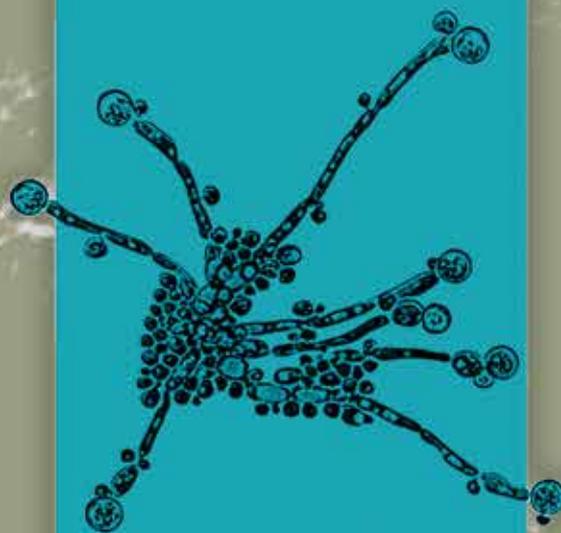


ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 18 №4



Problems in medical mycology

Vol.18 №4

2016

ДИФЛЮКАН 150 МГ

эффективное и безопасное лечение
ДЕРМАТОМИКОЗА¹



Онихомикоз – одно из наиболее часто встречающихся заболеваний стоп и ногтей у взрослых, ведь частота заболевания достигает до 27% всего населения планеты! Поражение грибами рода *Candida* и недерматомицетами *Scopulariopsis brevicaulis* – это прямые показания для назначения флуконазола.

Высокий профиль безопасности и эффективности.

Флуконазол назначают даже пациентам с высоким риском развития нежелательных явлений. Исследования показали всего 1,3% развития нежелательных явлений – при этом ни одна из побочных реакций не была связана с применением препаратов флуконазола и аморолфина.

Выигрышная комбинация.

Комбинированная терапия* ещё более эффективна, чем монотерапия. Результаты говорят сами за себя: комбинированная терапия показывает микологическое выздоровление 61,7% пациентов и клиническое выздоровление 60,4% пациентов, в то время как при монотерапии** положительный результат показывают менее 50% больных.

* флуконазол + лак с аморолфином
** флуконазол

СХЕМА ЛЕЧЕНИЯ²

ОНИХОМИКОЗ

Диагноз: Онихомикоз

Препарат: Дифлюкан

Дозировка: 150 мг

Частота приема: 1 раз в неделю

Длительность: Лечение следует продолжать до замещения инфицированного ногтя здоровым (3-6 месяцев для ногтей на руках и 6-12 месяцев для ногтей на ногах). Внимание – скорость роста варьируется в зависимости от возраста пациента.

Особенности: После успешного лечения хронических инфекций в редких случаях наблюдается изменение формы ногтей.

ДЕРМАТОМИКОЗ

Диагноз: Микозы стоп,

гладкой кожи,

паховой области

и кандидозные инфекции

Препарат: Дифлюкан

Дозировка: 150 мг / 50 мг

Частота приема: 1 раз в неделю / 1 раз в день

Длительность: В основном

от 2 до 4 недель.

В редких случаях лечение продлевается

до 6 недель.

ОТРУБЕВИДНЫЙ ЛИШАЙ

Диагноз: Отрубевидный лишай

Препарат: Дифлюкан

Дозировка: 300-400 мг / 50 мг

Частота приема: 1 раз в неделю / 1 раз в день

Длительность: При приеме препарата 1 раз

в неделю лечение продолжается

от 1 до 3 недель.

При приеме препарата 1 раз в сутки лечение

продолжается от 2 до 4 недель.

КРАТКАЯ ИНФОРМАЦИЯ ПО ПРЕПАРАТУ ДИФЛЮКАН®

Международное непатентованное название: флуконазол

Форма выпуска: капсулы по 50, 100, 150 мг.

Фармакотерапевтическая группа: противогрибковое средство.

Показания к применению: дерматомикозы, в том числе дерматофития стоп, дерматофития туловища, паховая дерматофития, разноцветный лишай и кожный кандидоз, когда показано системное лечение; дерматофития ногтей (онихомикоз), когда лечение другими препаратами не приемлемо.

Противопоказания: повышенная чувствительность к флуконазолу, другим компонентам препарата или азольным веществам; одновременный прием терфенадина в дозе 400 мг/сут и более, препаратов, увеличивающих интервал QT и метаболизирующихся с помощью изофермента CYP3A4; непереносимость галактозы, лактазная недостаточность, нарушение всасывания глюкозы/галактозы; детский возраст до 3 лет (для капсул).

С осторожностью: печеночная недостаточность; почечная недостаточность; появление сыпи на фоне применения флуконазола у больных с поверхностной грибковой инфекцией и инвазивными/системными грибковыми

инфекциями; одновременное применение терфенадина и флуконазола в дозе менее 400 мг/сут; потенциально проаритмические состояния у больных с множественными факторами риска.

При беременности прием флуконазола следует избегать, за исключением случаев тяжелых и потенциально угрожающих жизни грибковых инфекций, когда ожидаемая польза лечения превышает возможный риск для плода. В период грудного вскармливания назначение флуконазола не рекомендуется.

Способ применения и дозы: внутрь.

Лечение дерматомикозов: при инфекциях кожи, включая дерматофитию стоп, дерматофитию туловища, паховую дерматофитию и при кандидозных инфекциях, рекомендуемая доза составляет 150 мг один раз в неделю или 50 мг один раз в день. Длительность терапии обычно составляет 2-4 недели, при микозах стоп может потребоваться более длительная терапия до 6 недель. При разноцветном лишае рекомендуемая доза составляет 300-400 мг один раз в неделю в течение 1-3 недель. Альтернативной схемой лечения является применение препарата по 50 мг один раз в день в течение 2-4 недель.

При онихомикозе рекомендуемая доза составляет 150 мг один раз в неделю. Лечение следует продолжать до замещения инфицированного ногтя (вырастания неинфицированного ногтя). Для повторного роста ногтей на пальцах рук и стоп обычно требуется 3-6 мес и 6-12 мес соответственно. Однако скорость роста может варьировать в широких пределах у разных людей, а также в зависимости от возраста. После успешного лечения длительно сохранявшихся хронических инфекций иногда наблюдается изменение формы ногтей.

Побочное действие: головная боль, боль в животе, диарея, тошнота, рвота, повышение сывороточной активности аминотрансфераз (АСТ, АЛТ) и щелочной фосфатазы, сыпь. Срок годности 5 лет.

Хранить: при температуре не выше 30°C в недоступном для детей месте.

Условия отпуска: по рецепту.

Перед применением препарата следует тщательно ознакомиться с Инструкцией по медицинскому применению препарата Дифлюкан® П № 13546102-05.07.2016

www.diflucan.ru

ООО «Пфайзер»: 123112, Москва, Пресненская наб., 10, БЦ «Башня на Набережной» (блок С)

Тел. +7 (495) 287 50 00, факс +7 (495) 287 53 00

24.11.2016, WRUDIFOT16180

¹ Флуконазол в терапии больных онихомикозом стоп, протекающего с прогностически неблагоприятными клиническими проявлениями" Л.П. Котрехова, К.И. Разнатовский, Е.Н.Цурупа 2015.

² Инструкция по медицинскому применению препарата Дифлюкан® П NO 13546102-05.07.2016.

ЛОЦЕРИЛ®

КЛИНИЧЕСКИ ДОКАЗАНО,
ЧТО ЛОЦЕРИЛ СПОСОБЕН
УБИВАТЬ ГРИБОК **ДАЖЕ ПОД**
КОСМЕТИЧЕСКИМ ЛАКОМ.¹



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

Л_08_16/001



Устройство для противогрибковой обработки обуви **Тимсон**

для ежедневного использования

- Уничтожает грибки, бактерии и неприятный запах
- Взаимодействие тепла и ультрафиолета позволяет достичь высокого фунгицидного эффекта
- Профилактика появления грибковой инфекции в обуви
- Гарантия 3 года!
- РЕЗУЛЬТАТ КЛИНИЧЕСКИ ДОКАЗАН



Подробнее на сайте www.timson.ru



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, № 4, 2016

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

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 18, № 4, 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. Вивиани — 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 Microbiology — 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>Тараскина А.Е., Ли Фан, Скорбунова О.В., Пчелин И.М., Степанов А.С., Рябинин И.А., Шульгина М.В., Васильева Н.В.</i> Внутривидовое генетическое разнообразие нозокомиальных оппортунистических патогенов: клиническое значение (миниобзор)	3
<i>Рябинин И.А.</i> Система видов рода <i>Aspergillus Micheli</i> в свете исследований научной школы Centraalbureau voor Schimmelcultures (обзор)	7
<i>Купеева И.А., Разнатовский К.И., Раводин Р.А.</i> Оценка клинической эффективности диагностического модуля интеллектуальной системы Logoderm	13
<i>Кемайкин В.М., Табынбаев Н.Б., Худайбергенова М.С., Олифирова А.А., Абдрахманова Л.М., Климко Н.Н.</i> Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в республике Казахстан	19

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

<i>Шадринова О.В., Козлова О.П., Десятник Е.А., Шагдилеева Е.В., Борзова Ю.В., Богомолова Т.С., Игнатьева С.М., Трофимова О.А., Климко Н.Н.</i> Клинический случай инвазивного аспергиллеза легких на фоне применения ингибитора фактора некроза опухоли-альфа	23
<i>Козлова Я.И., Учеваткина А.В., Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Аак О.В., Понная В.В., Соболев А.В., Климко Н.Н.</i> Иммунологические признаки аллергического бронхолегочного аспергиллеза у больных бронхиальной астмой	27

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

<i>Васильева Н.В., Босак И.А., Богомолова Т.С., Выборнова И.В., Филиппова Л.В., Учеваткина А.Е., Степанова А.А., Авдеенко Ю.Л., Чилина Г.А., Еремина Н.В.</i> Разработка экспериментальной модели инвазивного аспергиллеза лёгких с использованием клинических изолятов <i>Aspergillus fumigatus</i>	32
<i>Еремина Н.В., Казей В.И., Сорочкина А.В., Алексеева С.В., Васильева Н.В., Богомолова Т.С., Выборнова И.В., Босак И.А., Елинов Н.П., Игнатьева С.М., Авдеенко Ю.Л., Степанова А.А., Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Чилина Г.А., Пурмаль А.А.</i> Оценка острой токсичности и эффективности при экспериментальном инвазивном аспергиллеза нового замещенного карбазола PLX01107	36
<i>Степанова А.А., Васильева Н.В., Босак И.А., Авдеенко Ю.Л., Выборнова И.В., Десятник Е.А.</i> Особенности строения <i>Aspergillus fumigatus</i> при экспериментальном аспергиллеза у мышей	40
<i>Степанова А.А., Васильева Н.В., Ямагучи М., Чибана Х.</i> Ультраструктура стареющих и обезвоженных клеток <i>Cryptococcus neoformans</i>	47
<i>Александрова Н.А., Заславская М.И.</i> Взаимоотношения <i>Candida</i> с энтерококками на уровне вагинального биотопа	53

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

<i>Taraskina A.E., Li Fan, Skorbnunova O.V., Pchelin I.M., Stepanov A.S., Ryabinin I.A., Shulgina M.V., Vasilyeva N.V.</i> Intraspecific genetic diversity of nosocomial opportunistic pathogens: clinical significance (minireview)	3
<i>Ryabinin I.A.</i> System of species of the genus <i>Aspergillus Micheli</i> in the light of research of scientific school Centraalbureau voor Schimmelcultures (review)	7
<i>Kupeeva I.A., Raznatovsky K.I., Ravodin R.A.</i> Clinical efficiency assessment of diagnostic module of intellectual system Logoderm	13
<i>Kemaikin V.M., Tabinbaev N.B., Khudaibergenova M.C., Olifirovich A.A., Abdrahmanova L.M., Klimko N.N.</i> Prevalence of severe and chronic mycotic diseases in the republic of Kazakhstan	19

CLINICAL MYCOLOGY

<i>Shadrivova O.V., Kozlova O.P., Desyatnik E.A., Shagdileeva E.V., Borzova Y.V., Bogomolova T.S., Ignatyeva S.M., Trofimova O.A., Klimko N.N.</i> A clinical case of invasive aspergillosis of lungs on the background of the use of tumor necrosis factor-alpha inhibitor	23
<i>Kozlova Y.I., Uchevatkina A.E., Frolova E.V., Filippova L.V., Aak O.V., Ponnaya V.V., Sobolev A.V., Klimko N.N.</i> Immunological features of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma	27

EXPERIMENTAL MYCOLOGY

<i>Vasilyeva N.V., Bosak I.A., Bogomolova T.S., Vybornova I.V., Filippova L.V., Uchevatkina A.E., Stepanova A.A., Avdeenko Yu.L., Chilina G.A., Eremina N.V.</i> Elaboration of invasive pulmonary aspergillosis experimental model using <i>Aspergillus fumigatus</i> clinical isolates	32
<i>Eremina N.V., Kazey V.I., Sorokina A.V., Alekseeva S.V., Vasilyeva N.V., Bogomolova T.S., Vybornova I.V., Bosak I.A., Yelinov N.P., Ignatyeva S.M., Avdeenko Yu.M., Stepanova A.A., Frolova E.V., Filippova L.V., Chilina G.A., Pural A.A.</i> Evaluation of acute toxicity and efficacy in experimental invasive aspergillosis of a new carbazole derivative PLX01107	36
<i>Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Bosak I.A., Avdeenko Y.L., Vybornova I.V., Desyatnik E.A.</i> The structural peculiarity of <i>Aspergillus fumigatus</i> during the experimental aspergillosis in the mice	40
<i>Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Yamaguchi M., Chibana H.</i> Ultrastructure of senescent and desiccated cells of <i>Cryptococcus neoformans</i>	47
<i>Alexandrova N.A., Zaslavskaya M.I.</i> Interrelation of <i>Candida</i> with enterococci in vaginal biotope	53

ВНУТРИВИДОВОЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ОПОРТУНИСТИЧЕСКИХ ПАТОГЕНОВ: КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ (МИНИОБЗОР)

¹Тараскина А.Е. (зав. лаб.)*, ² Ли Фан (ректор научного центра), ¹Скорбунова О.В. (лаборант-исследователь), ^{1,3}Пчелин И.М. (н.с., аспирант), ³Степанов А.С. (аспирант), ³Рябинин И.А. (аспирант), ¹Шульгина М.В. (зам. директора института), ^{1,3}Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: ¹ НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и ² кафедра медицинской микробиологии, Санкт-Петербург, Россия; ³ Научный центр здоровья им. Норманна Бетюна, Джилинский Университет, Китай

© Коллектив авторов, 2016

Нозокомиальные инфекции являются актуальной проблемой современного здравоохранения в силу широкого распространения и негативных последствий для здоровья пациентов, персонала и экономики государства. Особую роль в нозокомиальных инфекциях отводят оппортунистическим микроорганизмам. В настоящий момент установлено, что возбудители внутрибольничных инфекций, в отличие от природных популяций микроорганизмов тех же видов, обладают сравнительно невысокой степенью генетического разнообразия. Эпидемические клоны возбудителей внутрибольничных инфекций формируются как результат их внутривидового генетического разнообразия. Эпидемические клоны условно-патогенных микроорганизмов представляют собой наиболее приспособленные к ведению паразитического образа жизни варианты возбудителей, а процесс их формирования отражает эволюционные процессы, приводящие к приобретению факультативными паразитами патогенных свойств.

В обзоре приведены примеры внутривидового генетического разнообразия различных видов оппортунистических микроорганизмов, клиническое значение определенных клонов, обсуждается значимость внутривидового типирования в клинической практике. Внутривидовое типирование клинических изолятов позволит вывести эпидемиологические исследования на новый уровень: изучить эпидемиологические и эпизоотические связи источников возбудителя и очагов заболевания и выявить типы (варианты) возбудителя, ассоциированные с наличием определенных факторов вирулентности и резистентности к антимикробным препаратам.

Ключевые слова: генетическое внутривидовое разнообразие, *Escherichia coli*, *Candida* spp., нозокомиальные инфекции, оппортунистические микроорганизмы, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*

INTRASPECIFIC GENETIC DIVERSITY OF NOSOCOMIAL OPPORTUNISTIC PATHOGENS: CLINICAL SIGNIFICANCE (MINIREVIEW)

¹Taraskina A.E. (head of the laboratory), ² Li Fan (chancellor of science center), ¹Skorbunova O.V.

* Контактное лицо: Тараскина Анастасия Евгеньевна, e-mail: Anastasiya.Taraskina@szgmu.ru

(assistant researcher), ^{1,3}Pchelin I.M. (scientific collaborator, postgraduate student), ³Stepanov A.S. (postgraduate student), ³Ryabinin I.A. (postgraduate student), ¹Shulgina M.V. (deputy director of the Institute), ^{1,3}Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the chair)

¹ Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia; ² Norman Bethune Health Science Center Jilin University, China; ³ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (chair of medical microbiology), St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2016

Nosocomial infections are a current problem of the modern healthcare due to its widespread and negative consequences on health of the patients, staff and state economy. Opportunistic pathogens play a special role in nosocomial infections. Currently it has been established that causative agents of nosocomial infections have a relatively low degree of genetic diversity compared with natural populations of microorganisms of the same species. Epidemic clones of nosocomial pathogens are formed as a result of the intraspecific diversity. Epidemic clones of opportunistic pathogens are the most fitted to parasitic lifestyle types of pathogens. Their evolutionary formation reflects processes acquisition of pathogenic properties by facultative parasites. Clinical significance of pathogenic clones of opportunistic pathogens and their role in epidemics of nosocomial infections are under intensive investigations in many laboratories all over the world now.

This review presents examples of intraspecific genetic diversity of different types of opportunistic microorganisms, and the data the clinical significance of specific clones. The importance of typing in diagnostic assays is discussed. This may bring epidemiological and epizootic investigations of sources of infections and infectious foci to the new level. Secondly it will extend our knowledge of pathogenic clones acquiring factors of virulence and resistance to antimicrobial drugs.

Key words: *Candida* spp., *Escherichia coli*, genetic intraspecific diversity, nosocomial infections, opportunistic pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*

INTRODUCTION

A nosocomial infection – also called «hospital-acquired» can be defined as: «An infection occurring in a patient in a hospital or other health care facility in whom the infection was not present or incubating at the time of administration. This includes infections acquired in the hospital but appearing after discharge, and also occupational infections among staff of the facility» (Prevention of hospital-acquire infection: a practical guide-WHO/2002). Nosocomial infections occur worldwide and affect both developed and resource-poor countries. They are important contributors to morbidity and mortality. They will become even more important as a public health problem with increasing economic and human impact because of: increasing numbers and crowding of people, more frequent impaired immunity (age, illness, treatments), new microorganisms, increasing microbial resistance to antimicrobial drugs.

Many different pathogens may cause nosocomial infections. The infecting organisms vary among different patient populations, health care settings, facilities and countries. The most common nosocomial pathogens are both pathogenic and commensal microorganisms. The mechanism of a commensal microorganism to pathogenic is still unknown. However impaired host defence mechanisms are considered to be fundamental. Systemic infections caused by commensals are becoming increasingly common in modern hospitals and frequently occur in patients with inherited and acquired immunodeficiencies, particularly in risk groups of patients, such as neutropenic patients, HIV-positive patients, and patients under intensive care.

Many opportunistic fungi and some parasites (e.g. *Giardia lamblia*) may cause infections during extended antibiotic treatment and severe immunosuppression (*Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans*). These are major cause of systemic infections in immunocompromised patients. Environmental contamination by airborne organisms such as *Aspergillus* spp. which originate in dust and soil is also a concern, as it may contaminate hospital building during construction.

In fact, opportunistic pathogens rarely produce disease in nondebilitated patients. Therefore, environmental and clinical isolates of opportunistic pathogens such as *P. aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* are genetically indistinguishable. Analysis of two collections of *P. aeruginosa* isolates from environmental and clinical settings has demonstrated that they were functionally equivalent in traits relevant for both their pathogenic (host-oriented) and biodegradative (environment-oriented) abilities [1].

Intraspecific genetic diversity of microorganisms is a material for evolution and determines the success of a particular type in inhabiting of new ecological niches with unusual conditions of existence. Microorganisms that inhabit the macroorganism need to resist unfavorable influence of chemical and physical factors of the environment and also stress factors of immune response of the macroorganism or antimicrobial agents. Under the influence of these factors some groups of genetically similar microorganisms may gain selective advantageous and are able to survive in these conditions. Therefore these groups of microorganisms are able to develop mechanisms protecting them from antimicrobial substances and factors of immune system of the host [Martínez J.L., Baquero F. //Clin. Microb. Rev. –2002. – Vol. 15, №4].

Groups of genetically similar microorganisms originating from a common predecessor are called clones. Further analysis has demonstrated that the degree of clonality varies depending on the species analyzed. In that way, pathogenic species such as *E. coli* and *Salmonella* spp. are highly clonal [Martínez J.L., Baquero F. //Clin. Microb. Rev. –2002. – Vol. 15, №4].

Intraspecific differences in pathogenicity of microorganisms and their resistance to antimicrobial drugs are long known. Individual clones are often characterized by unique sets of virulence genes and/or resistance to antimicrobial agents or alleles of such genes.

This highlights the need for efficient methods for intraspecific typing and delineation of strains. The earliest methods used in the typing of microorganisms were based on phenotypic characteristics including serotyping, biotyping, morphotyping, resistance to various chemicals and toxins and antimicrobial susceptibility profiles. However, phenotypic techniques have a very low degree of discrimination and reproducibility, which obviously constitutes a limitation for reliable epidemiological analysis. The advent of the molecular DNA-based techniques revolutionized the knowledge in the biology and epidemiology of many opportunistic pathogens. Development of sequencing technology facilitated the introduction of gene chip technology widely, followed with changes in research pattern in microbiology. For instance, the genome bar code on the microbial genome structure achieved visual annotation, which provided a powerful opportunity to the classification and identification of pathogenic bacteria as well as the prediction of horizontal transfer fragments (such as pathogenic-

ity islands), and it provided a powerful tool for the study of gene function and pathogenic mechanism of pathogenic bacteria [2]. Since then, various molecular approaches have been described that targeted various levels of polymorphism within a species.

Intraspecific typing can resolve two clinically important problems:

1. Uncovering epidemiological linkages of infection sources and disease areas. Linkages of this kind can be traced, for example, between units of a hospital, relying on exact knowledge of hospital personnel and patient translocation routes.

2. Revealing strain types, harbouring certain virulence and antimicrobial drug resistance factors. Direct detection of these factors is important for a patient management.

Examples of intraspecific diversity of different opportunistic pathogens species

The strains of the *Enterobacteriaceae* family are distinguished by antigenic characteristics and classified as serotypes. Specific serotypes are associated with severity of infection process. For many *Enterobacteriaceae* species particular serotypes are associated with certain sets of pathogenicity factors. Recently, the molecular genetic basis of serotypes differences was revealed [3, 4].

β -hemolytic streptococci (*Streptococcus pyogenes*) is responsible for a variety of infectious diseases and immunological complications, which differ in localization and severity. Traditionally this group of bacteria was thought to be the commensals, causing non-threatening disease of life, such as pharyngitis and impetigo. However, group A *Streptococcus* (GAS) is one of the most clinically relevant species of *Streptococcus*. It has been associated with human life-threatening infections, such as necrotising fasciitis and toxic shock syndrome. Moreover, immunological complications such as acute rheumatic fever, rheumatic heart disease and post-streptococcal acute glomerulonephritis are significant streptococcal disease burdens, especially in the developing world.

Most frequently invasive diseases were confirmed by several streptococcal isolates with M1serotype. This serotype is associated with isoform of protein M - a cell surface protein that inhibits phagocytosis. M protein is considered to be the most important epidemiological marker of GAS infections. Serological methods were not able to type a significant number of the GAS isolates. *emm* gene (encoding M protein) sequencing based on 5' region is becoming a universal method for characterization of GAS infection[5]. Today more than 200 types of this gene are revealed. Beta-lactams are used for treatment of GAS infections, because these bacteria retain susceptible to penicillin G. Macrolides, lincosamides and fluoroquinolones are recommended for individuals with allergic reaction on penicillins. However, GAS resistance to these later antimicrobials has been described worldwide. While fluoroquinolone resistance in GAS emerges due to point mutations in *gyr A*, *gyr B* and *parC* genes, macrolide resistance is a result of active efflux of the drug or modification of the target site. Mutations conferring resistance to macrolides are located in *mefA/E*, *ermA* and *ermB* genes [6].

Knowledge of antimicrobial resistance rates and *emm* types prevalence in a given population are essential for development of effective strategies for prevention and treatment of GAS infections.

Gram-positive *Staphylococcus aureus* is a typical representative of normal biota in approximately 30% of the human population, but is capable to cause severe infections in immunocompromised patients in hospitals and in healthy humans in the community. *S. aureus* species includes diverse types of strains that differ in their sensitivity to various phages (phage groups) and in their pathogenicity. Molecular mechanisms, ensuring the success of various phage groups the disease development were described. *S. aureus* strains of phage group I produced toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) encoded by *tstH* gene which is localized in mobile genetic elements. TSST-1 is exotoxin associated with the majority of cases of toxic shock syndrome (TSS) [Deresiewicz et al., 1996]. In 1996 90% TSS cases were caused by of *S. aureus* strains producing TSST-1. TSST-1 is regarded as a major virulence factor in these outbreaks. All strains isolated from the vagina in women with TSS associated with menstruation, belonged to a single clone characterized by increased ability to adhere to the vaginal mucosa and the cervical canal, and designated as the ET-41.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones are causing a global public health concern. MRSA clones diversify occur through point mutations, recombination, or the acquisition/deletion of mobile genetic elements, giving rise to extensive genomic and phenotypic diversity. First MRSA clones had genetic and phenotypic properties similar to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) clones that were epidemic in Europe in the early 1960s. First MRSA bacteria emerged as result of acquisition of *mecA* gene by successful MSSA clones from an unknown heterologous source. *mecA* gene encodes a penicillin-binding protein conferring resistance to methicillin. Mobile genetic element carrying *mecA*, is called the staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*), and has five forms (I, II, III, IV, V). The forms appeared as a result of independent events of the horizontal transfer of *mecA*. Five major lineages of MRSA (CC5, CC8, CC22, CC45 and CC30) with corresponding *SCCmec* forms circulate worldwide and cause most of nosocomial infections (up to 68%) in the world [7, 8].

Clonal origins of their genetic resistance determinants can eventually be traced even for highly recombinogenic bacterial species. For example, analysis of *pbp* genes coding penicillin-binding protein synthesis demonstrated their high uniformity in different penicillin-susceptible isolates of *N. meningitis*, *N. gonorrhoeae*, and *S. pneumoniae*, whereas those from penicillin-resistant strains had mosaic structure resulting from the horizontal transfer DNA blocks from other commensal species with natural penicillin-resistance. Analysis of beta-lactam-resistant populations demonstrated that these novel *pbp* genes have occasionally been selected, as single gene «clones», and disseminates and evolves further among the bacterial population [Martínez J.L., Baquero F. //Clin. Microb. Rev. –2002. – Vol. 15, №4].

Presently, *Candida* spp. are the main causative agents of opportunistic mycoses in different regions of the World. Several species of the genus *Candida* are representatives of human normobiota. In persons with impaired immune system, however, these fungi may induce a pathogenic process.

The incidence of systemic candidiasis has been steadily increasing and it also has been associated with high rates of mortality (over 30%) even among appropriately treated

patients. *Candida* is now the fourth pathogen among microorganisms responsible for nosocomial bloodstream infections [9].

Epidemiological investigations of infectious outbreaks in hospitals are targeted to reveal the source and the route of an infection dissemination to effectively eradicate it. Although most *Candida* infections appear to originate from an endogenous source, nosocomial transmission is not uncommon and may occur either by cross-infection or by exposure to a common infecting source. Indeed, the same healthy individual can harbor the same strain in different body locations, or carry unrelated strains at the same or different body sites. Strains can replace each other in recurrent infections, or undergo microevolution (minor changes in genotype over a relatively small number of cell generations) and substrain shuffling (changes in subpopulations within individuals over time), be transferred from one individual to another. Specific strains may predominate in particular geographical areas and some strains may be endemic in some hospitals and can undergo microevolution in the hospital setting [10].

The most frequent isolates are *Candida albicans*. Standard genome of *C. albicans* is diploid and contains eight pairs of chromosome homologs. *C. albicans* has a predominantly clonal mode of reproduction. It was the first medically significant pathogenic fungus which completes genome sequence was published. It was genome of SC5314 clinical isolate. It has high degree of heterozygosity and more than 55700 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in 32-Mb diploid genome. Despite its diploid genome and clonal reproduction, *C. albicans* has high rate of genetic diversity, provided by recombination, chromosomal polymorphisms, gene replacement and cryptic mating. They ensure the plasticity of the genome [11].

There are five principal phylogenetic clades in *C. albicans*, revealed by Southern hybridization and multilocus sequence typing (MLST) techniques. These clades are designated as I, II, III, C.A. and E. They differ by geographic distribution and phenotypic characteristics. Clades C.A. and E are prevalent in South Africa and Europe, respectively, while clade I strains occur worldwide. *In vitro* studies of clade I strains revealed that they are naturally resistant to flucytosine and terbinafine. Furthermore, each clade has a specific VNTR pattern. Clades are not associated with virulence factors and/or infection type [12].

Incidence of non-*albicans* *Candida* species has been increasing during last decades. These species have also been associated with higher mortality. *C. glabrata* and *C. krusei* have lower sensitivity to fluconazole differently from *C. albicans*. Acquired resistance to amphotericin B in *C. lusitanae* has also been reported [9]. *C. parapsilosis* is a predominant species isolated from patients with systemic infections. It causes up to 45% of all candidemia cases. This yeast causes several infections in human, including life-threatening bloodstream infections. They are associated with catheters, premature birth, and contaminated prosthetic devices. Unlike other *Candida* species, *C. parapsilosis* was found on the hands of health care workers, who install and maintain medical devices, suggesting its potential route of transmission. Physiologically uniform *C. parapsilosis* isolates were reported genetically heterogeneous. Several reports suggested that *C. parapsilosis* includes three distinct groups (I, II and III). Group I isolates retain the name of the specie, *C. parapsilosis* (sensu stricto). For fungi belonging to groups

II and III new names are proposed: *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*, respectively. *C. parapsilosis* persists in hospital environment, thereby enhancing the chance of nosocomial infections. Therefore, among the three species fungi show important substrain differences in the degree of virulence (adhesive properties and ability to form biofilms) and anti-fungal susceptibility [13-15].

CONCLUSION

Examples of intraspecific diversity in different bacteria and fungi demonstrate clinical importance of intraspecific characteristics of pathogenic isolates. Fine characteristics of pathogen may have an input to the disease course prognosis and to prescribing of the rational patients' management regime. It may also provide more details for epidemiologic surveys and investigations of nosocomial infections outbreaks. This supports the importance of detailed identification of pathogenic isolates, expanding researches to intraspecific level, performing molecular genetic analysis of isolates and characterizing its genotype. Selection of a typing method depends on the nature and specific targets of each molecular study. Efficiency of each typing method should be evaluated in terms of its discriminating ability, reproducibility and ease of use

and interpretation. Discriminating power of the method depends on the ability of the method to detect genomes of one and the same strain or highly related strains in different isolates. A high resolution methods are preferable to monitor the microevolution of epidemic clones due the ability to segregate unrelated isolates.

Internal analysis of the reproducibility (Interassay reproducibility) is estimated by repeated testing of the same strain. Analysis should give identical results. In newly presented or developed genomes characteristics databases utilized by international researchers community standardization and reproducibility of methods used by different laboratories are vitally important. Ease of use and efficiency depend on the cost of specialized equipment and reagents, facilities for technical implementation in routine use, complexity of technical procedures and the ease results interpreting. In addition, the data must be suitable for computer analysis and storage, which is required for databases.

The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant № 16-54-53109 a «Intraspecies typing of pathogenic microorganisms (genotyping and proteomic features)»).

REFERENCES

1. Falcone-Dias M.F., Centron D., Pavan F., et al. Opportunistic pathogens and elements of the resistome that are common in bottled mineral water support the need for continuous surveillance // PLOS One. – 2015. – March 24 – P. 1-12.
2. Wang G., Zhou F., Olman V., et al. Prediction of pathogenicity islands in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 using genomic barcodes // FEBS Lett. – 2010. – Vol. 584. – P. 194-198.
3. Qu M., Zhang X., Liu G., et al. An eight-year study of *Shigella* species in Beijing, China: serodiversity, virulence genes, and antimicrobial resistance // J. Infect. Dev. Ctries. – 2014. – Vol. 8, №7. – P. 904-8.
4. Rump L.V., Gonzalez-Escalona N., Ju W., et al. Genomic diversity and virulence profiles of historical *Escherichia coli* O157 strains isolated from clinical and environmental sources // Appl. Environ. Microbiol. – 2015. – Vol. 81, №2. – P. 569-77.
5. Sumby P., Porcella S.F., Madrigal A.G., et al. Evolutionary origin and emergence of a highly successful clone of serotype M1 group A *Streptococcus* involved multiple horizontal gene transfer events // The J. of Infectious Diseases – 2005. – Vol. 192. – P. 771-82.
6. Arêas G.P., Schuab R.B.B., Neves F.P.G., Barros R.R. Antimicrobial susceptibility patterns, *emm* type distribution and genetic diversity of *Streptococcus pyogenes* recovered in Brazil // Mem. Inst. Oswaldo. Cruz, Rio de Janeiro. – 2014. – Vol. 109, №7. – P. 935-939.
7. Rodriguez-Noriega E., Seas C., Guzmán-Blanco M., et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America // International J. of Infectious Diseases. – 2010. – Vol. 14. – P. e560-e566.
8. McAdama P.R., Templeton K.E., Edwards G. F., et al. Molecular tracing of the emergence, adaptation, and transmission of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // PNAS. – 2012. – Vol. 109, №23. – P. 9107-9112.
9. Trtkova J., Raclavsky V. Molecular-genetic approaches to identification and typing of pathogenic *Candida* yeasts // Biomed Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech Repub. – 2006. – Vol. 150, №1. – P. 51-61.
10. Viviani M.A., Cogliati M., Esposto M.C., et al. Four-year persistence of single *Candida albicans* genotype causing bloodstream infections in a surgical ward proven by multilocus sequence typing // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, №1. – P. 218-21.
11. Saghrouni F., Abdeljelil B., Boukadida J., Said M.B. Molecular methods for strain typing of *Candida* spp.: a review // J. of Appl. Microbiol. – 2013. – Vol. 114. – P. 1559-1574.
12. Odds F.C., Jacobsen M.D. Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida* species // Eukaryotic Cell. – 2008. – Vol. 7, №7. – P. 1075-1084.
13. Vaz C., Sampaio P., Clemons K.V., et al. Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strain involved in a neonatal intensive care unit outbreak // Diag. Microbiol. & Inf. Dis. – 2011. – Vol. 71. – P. 159-162.
14. Sabino R., Sampaio P., Rosado L., et al. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates // J. of Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 48, №5. – P. 1677-1682.
15. Merseguel K.B., Nishikaku A.S., Rodrigues A.M., et al. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection // BMC Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 15, №57. – P. 1-15.

Поступила в редакцию журнала 30.11.2016

Рецензент: А.Е. Гончаров



СИСТЕМА ВИДОВ РОДА *ASPERGILLUS MICHELI* В СВЕТЕ ИССЛЕДОВАНИЙ НАУЧНОЙ ШКОЛЫ CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES (ОБЗОР)

Рябинин И.А. (ассистент кафедры)*

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра медицинской микробиологии), Санкт-Петербург, Россия

© Рябинин И.А., 2016

В сообщении представлены данные о разнообразии представителей рода *Aspergillus*, приведена внутриродовая классификация аспергиллов, основанная на морфологическом и генетическом критериях. Классификацию создали, главным образом, на базе традиционной системы деления рода. Она состоит из 7 подродов (*Circumdati*, *Fumigati*, *Terrei*, *Nidulantes*, *Aspergillus*, *Candidi*, *Ornati*) и 20 секций, которые охватывают 328 видов. Из системы исключены представители родственных родов семейства *Trichocomaceae*, отличающиеся иной организацией конидиального аппарата (*Phialosimplex*, *Polyaecilum*, *Penicillioopsis*, *Penicillium*, *Warcupiella*, *Dichotomomyces*). Некоторые особенности молекулярно-генетического подхода к изучению филогении аспергиллов показаны на примере кластеризации частичных последовательностей β -тубулина, резервированных в базе BLAST, которые получили для 75 представителей рода. Критически оценена новейшая зарубежная классификация *Aspergillus spp.*

Ключевые слова: *Aspergillus*, β -тубулин, классификация, филогения

SYSTEM OF SPECIES OF THE GENUS *ASPERGILLUS* *MICHELI* IN THE LIGHT OF RESEARCH OF SCIENTIFIC SCHOOL CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES (REVIEW)

Ryabinin I.A. (assistant of the chair)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Chair of Medical Microbiology), St. Petersburg, Russia

© Ryabinin I.A., 2016

The report presents data on the diversity of the genus of *Aspergillus*, intrageneric classification of *Aspergillus spp.* based on morphological and genetic criteria is given. Classification is founded mainly on the kind of division of the conventional system, includes 7 subgenera (*Circumdati*, *Fumigati*, *Terrei*, *Nidulantes*, *Aspergillus*, *Candidi*, *Ornati*) and 20 sections covering 328 species. The representatives of genera of *Trichocomaceae* family, characterized by different organization of conidial apparatus than aspergillii (*Phialosimplex*, *Polyaecilum*, *Penicillioopsis*, *Penicillium*, *Warcupiella*, *Dichotomomyces*) were excluded from the system. Some features of molecular genetic approach to study the phylogeny of *Aspergillus* shown by the example of clustering of partial sequences of β -tubulin, redundant in the BLAST-base, which received for 75 members of the genus. The latest foreign classification *Aspergillus spp.* was critically evaluated.

Key words: *Aspergillus*, β -tubulin, classification, phylogeny

* Контактное лицо: Рябинин Игорь Андреевич,
e-mail: Igor.Ryabinin@szgmu.ru

ВВЕДЕНИЕ

Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, голландское – Центральное бюро культур грибов) при Королевской Академии Искусств и Наук (Утрехт, Нидерланды) является признанным во всем мире ведущим центром по изучению биологического разнообразия, таксономии и систематики микроскопических грибов. Особого внимания заслуживает вклад сотрудников этой организации, а также кафедр и лабораторий, сотрудничающих с CBS, в разработку внутривидовой системы аспергиллов, основанной на данных молекулярной филогении. В этой сфере наиболее существенные работы вышли в свет под авторством Gams W., Samson R.A., Varga J., Peterson S.W., Frisvad J., Pitt J.I., Hubka V.

Молекулярно-генетические маркеры как значительно более объективные признаки для создания классификации, чем параметры фенотипа, должны были послужить основой для конструирования однозначной системы рода. Однако фактически этого не произошло: подразделение *Aspergillus spp.* на секции и объединяющие их подроды неоднократно корректировали. Параллельно шел процесс пересмотра видового состава, открытия и описания новых видов. В 2014 г. Samson R.A. и соавторы выпустили труд «Филогения, идентификация и номенклатура рода *Aspergillus*», в котором как бы «подвели черту» над указанными процессами [1]. В нем приведено подробное описание методологии изучения изолятов аспергиллов, применяемой в CBS, а также помещен перечень видов рода *Aspergillus*, среди которых отдельными списками перечислены признанные виды, виды с неясным и сомнительным обоснованием, а также виды новые или перемещенные в этот род. Последний список включает обозначения анаморфных стадий уже известных представителей, ранее описанных по телеоморфным родовым именам *Emericella* и *Neosartorya*, а также совершенно новые названия.

Тем не менее, перечень видов до недавнего времени не был отсортирован на подроды и секции. Последний доступный пересмотр системы рода сотрудниками CBS приведен в работе Samson R.A. и Varga J. 2010 г. [2].

Подроды, сформированные, главным образом, на основе филогенетических связей, нередко объединяют секции, представители которых не обладают отчетливым морфологическим сходством. В противоположность им, более значимыми для практического миколога являются секции, которые обычно объединяют виды с общими чертами организации аппарата спорообразования и нередко похожими культуральными свойствами. Среди когда-либо предложенных секций можно условно выделить «большие» и «малые». «Большие» секции охватывают многие виды (вместе $\approx 95\%$ рода) и отличаются наибольшей стабильностью при пересмотре классификации, среди них – *Nigri*, *Flavi*, *Circumdati*, *Terrei*, *Flavipedes*, *Fumigati*, *Nidulantes*, *Versicolores*, *Usti*, *Sparsi*, *Candidi*, *Aspergillus*, *Restricti* и *Cremeri*. Сравнительно недавно выделили относительно крупную секцию *Aenei*. «Малые» секции охватывают немногочисленные группы видов, а иногда – даже единичные виды. Эти секции непостоянны, их то выделяют, то вновь включают в более крупные. Среди «малых» секций в разное время выделяли следующие: *Cervini*, *Ornati*, *Wentii* (теперь в секции *Cremeri*), *Ochraeorosei*, *Silvati*, *Bispori*, *Zonati*, *Raperi*, *Petersonii*, *Warcupi*,

Assiuti, Robusti, Tanneri, «Penicillium».

Цель работы – составить распределение видов *Aspergillus* spp. по внутривидовым группам на основе ранее опубликованных пересмотров отдельных секций рода, а также с учетом молекулярной филогении на основании анализа частичных последовательностей локуса β -тубулина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ состава и наполнения подродов и секций проведен по следующим литературным источникам согласно таблице 1 [3-32].

Таблица 1

Краткие сводные данные о литературных источниках, использованных при определении перечней видов отдельных секций рода *Aspergillus*

Секция рода	Авторы оригинальных сообщений, год
<i>Circumdati</i>	Visagie С.М. и соавторы, 2014
<i>Fumigati</i>	Samson R.A. и соавторы, 2007
	Barrs V.R. и соавторы, 2013
	Suqi J.A. и соавторы, 2014
	Matsuzawa T. и соавторы, 2014
<i>Flavi</i>	Matsuzawa T. и соавторы, 2013
	Novakova A., Hubka V., Dudova Z., Kolarik M., 2014
	Varga J., Frisvad J.C., Samson R.A., 2011
	Soares C. и соавторы, 2012
<i>Nigri</i>	Taniwaki M.H. и соавторы, 2012
	Varga J. и соавторы, 2011
	Samson R.A. и соавторы, 2007
	Noonim P. и соавторы, 2008
<i>Usti</i>	Jurjevic Z. и соавторы, 2012
	Houbraken J. по соавторы, 2007
	Novakova A., Hubka V., Saiz-Jimenez C., Kolarik M., 2012
	Samson R.A., Varga J., Meijer M., Frisvad J.C., 2011
<i>Sparsi</i>	Varga J., Frisvad J.C., Samson R.A., 2010
<i>Terrei</i>	Samson R.A. и соавторы, 2011
<i>Flavipedes</i> и <i>Jani</i>	Hubka V. и соавторы, 2015
<i>Aenei</i> и <i>Nidulantes</i>	Varga J., Frisvad J.C., Samson R.A., 2010
<i>Versicolores</i>	Jurjevic Z., Peterson S.W., Horn B.W., 2012
<i>Clavati</i>	Varga J., Due M., Frisvad J.C., Samson R.A., 2007
<i>Candidi</i>	Varga J., Frisvad J.C., Samson R.A., 2007
	Hubka V. и соавторы, 2014
<i>Petersonii</i>	Jurjevic Z., Kubatova A., Kolarik M., Hubka V., 2015
<i>Cervini</i> и <i>Ornati</i>	Klich M.A., 2002
<i>Aspergillus</i>	Hubka V. и соавторы, 2013
	Marin-Felix Y., Cano-Lira J.F., Guarro J., Stchigel A.M., 2014
<i>Restricti</i> , <i>Ochraceorosei</i> , <i>Zonati</i> , <i>Warcupi</i> , <i>Silvati</i> , <i>Bispori</i> и <i>Raperi</i>	Samson R.A., Varga J., 2007

Также применяли данные сообщения Visagie С.М. и соавторов [33], в котором авторы описали новые виды сразу из нескольких секций, а также электронный ресурс Mycobank Database (<http://www.mycobank.org/>). В качестве основы классификации использовали пересмотр системы рода, опубликованный Samson R.A. и Varga J., 2010, с изменениями [2].

Биоинформационный анализ филогении рода *Aspergillus*. В качестве последовательности для конструирования филогенетического дерева избрали локус β -тубулина (*benA*). Поиск частичных последовательностей для анализа выполнили с помощью ресурса BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), по алгоритму megablast. Для начала поиска применяли полную последовательность локуса β -тубулина штамма *A. oryzae* RIB40, депонированную в базе KEGG (Киотская Энциклопедия Генов и Геномов). По этой последовательности из базы выкопировали частичные си퀀сы локусов β -тубулина штамма *A. ustus* UOA/HCPF 9236 (№ GQ376125.1) и *A. niger* IHEM4023 (№ HQ632722.1),

по которым выполнили поиск и выкопировку последовательностей других видов. Перечень видов для исследования выбирали произвольно при соблюдении следующих условий: 1) не менее 3-х видов для каждой секции (или все виды, если секция насчитывает меньшее количество), но для секции *Nigri* – 6 (по 3 – для видов с одним и двумя рядами стеригм в головке); 2) включили новые виды аспергиллов, указанные в перечне Samson R.A. и соавторов, 2014: *A. delacroixii*, *Emericella appendiculata* (*A. chinensis*), *E. pluriseminalis*, *E. similis* (секция *Nidulantes*), *Neosartorya shendawei*, *N. tsunodae* (секция *Fumigati*), *A. inflatus*. В анализ не включили последовательности представителей секции *Petersonii*, поскольку на момент его проведения сведения о секции еще не рассматривали. Таким образом получили выборку частичных последовательностей гена β -тубулина для 75 видов аспергиллов. В качестве «внегруппового» участника дерева использовали частичную последовательность локуса *benA* штамма *Penicillium citrinum* CICC 2478.

Построение филогенетического дерева для выкопированных последовательностей выполнили в общедоступном редакторе Phylogeny (www.phylogeny.fr/) [34] с применением следующих настроечных параметров: выравнивание последовательностей по алгоритму MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation), выделение консервативных блоков с помощью программы Gblocks, конструирование филогенетических связей по алгоритму PhyML 3.0, визуализацию дерева – в редакторе TreeDун.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Собранная нами синтетическая система рода *Aspergillus* приведена в таблице 2, а филогенетическая дендрограмма избранных представителей рода на основании анализа последовательностей локуса *benA* – на рисунке 1. В таблице 2 виды, концепция которых подлежит пересмотру, выделены квадратными скобками.

Таблица 2

Система рода *Aspergillus*

Подрод *Circumdati*

Секция *Nigri*

A. acidus, *A. aculeatus*, *A. aculeatinus*, *A. awamori*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. coreanus*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. eucalypticola*, *A. fijjensis*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. ibericus*, *A. indologenus*, *A. japonicas*, *A. lacticoffeatus*, *A. neoniger*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. sclerotiocarbonarius*, *A. saccharolyticus*, *A. sclerotioiger*, *A. tubingensis*, *A. uvarum*, *A. vadensis*, *A. violaceofuscus*, *A. floridensis*, *A. pulverulentus*, [*A. helicothrix*].

Секция *Circumdati*

A. affinis, *A. auricomus*, *A. bridgeri*, *A. cretensis*, *A. elegans*, *A. fresenii*, *A. flocculosus*, *A. insulicola*, *A. melleus*, *A. muricatus*, *A. neobridgeri*, *A. occultus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. pallidofulvus*, *A. persii*, *A. pseudoelegans*, *A. pulvericola*, *A. robustus*, *A. roseoglobulosus*, *A. salwaensis*, *A. sclerotiorum*, *A. sesamicola*, *A. steynii*, *A. subramanianii*, *A. westerdijkiae*, *A. westlandensis*, [*A. ochraceopetaliformis*].

Секция *Flavi*

Группа *Flavi*

A. albertensis, *A. alliaceus*, *A. arachidicola*, *A. avenaceus*, *A. bombycus*, *A. caelatus*, *A. fasciculatus*, *A. flavofurcatus*, *A. flavus*, *A. kambarensis*, *A. lanosus*, *A. leporis*, *A. minisclerotigenes*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonomius*, *A. pseudotamarii*, *A. sojae*, *A. subolivaceus*, *A. tamarii*, *A. terricola*, *A. thomii*, *A. toxicarius*, *A. zhaoqingensis*, *A. mottae*, *A. transmontanensis*, *A. sergii*, *A. betholletius*.

Группа *Stilbothamnium*

A. coremiiformis, *A. togoensis*.

Секция *Cremeri*

A. brunneouniseriatus, *A. dimorphicus*, *A. flaschentraegeri*, *A. gorakhpurensis*, *A. itaconicus*, *A. pulvinus*, *A. stromatoides*, *A. wentii*, *Chaetosartorya cremea*, *Ch. chrysellae*.

Подрод *Fumigati*

Секция *Fumigati*

A. brevipes, *A. brevistipitatus*, *A. conversis*, *A. duricaulis*, *A. fumigatiiformis*, *A. fumigatus*, *A. fumisynnematus*, *A. lentulus*, *A. novofumigatus*, *A. unilateralis*, *A. viridinutans*, *A. turcosus*, *A. felis*, *A. pseudofelis*, *A. parafelis*, *A. pseudoviridinutans*, *A. caatingaensis*, *A. pernambucoensis*, *A. huiyanae*, *A. delicatus*, *A. oerlinghausenensis*, *Neosartorya assulata*, *N. aurata*, *N. aureola*, *N. australensis*, *N. coreana*, *N. denticulata*, *N. fennelliae*, *N. ferenczii*, *N. fischeri*, *N. galapagensis*, *N. glabra*, *N. hiratsukae*, *N. lacinosa*, *N. multiplicata*, *N. nishimurae*, *N. papuensis*, *N. pseudofischeri*, *N. quadricincta*, *N. spathulata*, *N. spinosa*, *N. strameniae*, *N. tatenoi*, *N. udagawae*, *N. warcupii*, [*N. takakii*].

Секция Clavati

A. clavatus, *A. giganteus*, *A. rhizopodus*, *A. pallidus*, *A. clavatonanicus*, *A. longivesica*, *A. apicalis*, *Neocarpenteles acanthosporus*.

Секция Cervini

A. cervinus, *A. kanaqawaensis*, *A. nutans*, *A. parvulus*, *A. vinosobubalinus*.

Подрод Terrei

Секция Terrei

A. neoafricanus, *A. alabamensis*, *A. allahabadi*, *A. ambiguus*, *A. aureoterreus*, *A. carneus*, *A. floccosus*, *A. hortai*, *A. microcysticus*, *A. neoindicus*, *A. neoniveus*, *A. niveus*, *A. pseudoterreus*, *A. terreus*.

Секция Flavipedes

A. ardalensis, *A. capensis*, *A. flavipes*, *A. frequens*, *A. iizukae*, *A. luppii*, *A. mangaliensis*, *A. movilensis*, *A. neoflavipes*, *A. polyporicola*, *A. spelaeus*, *A. templicola*, *A. micronesiensis*.

Секция Jani

A. janus, *A. brevijanus*

Подрод Nidulantes

Секция Nidulantes

A. aurealatus, *A. astellatus*, *A. caespitosus*, *A. jaipurensis*, *A. venezuelensis*, *Emericella nidulans*, *E. quadrilineata*, *E. gemmata*, *E. corrugata*, *E. omanensis*, *E. falconensis*, *E. striata*, *E. stellamaris*, *E. cleistominuta*, *E. rugulosa*, *E. echinulata*, *E. stellata*, *E. violacea*, *E. foveolata*, *E. desertorum*, *E. navahoensis*, *E. fructiculosa*, *E. unguis*, *E. varicolor*, *E. undulata*, *E. qingxianii*, *E. aurantiobrunnea*, *E. appendiculata*, *E. olivicola*.

Секция Aenei

A. aeneus, *A. karnatakaensis*, *A. eburneocremaeus*, *A. crustosus*, *A. heyangensis*, *Emericella bicolor*, *E. spectabilis*, *E. foeniculicola*, *E. discophora*.

Секция Versicolores

A. amoenus, *A. asperescens*, *A. austroafricanus*, *A. creber*, *A. cvjetkovicii*, *A. fructus*, *A. jensenii*, *A. protuberus*, *A. puulauensis*, *A. subversicolor*, *A. sydowii*, *A. tabacinus*, *A. tennesseensis*, *A. venenatus*, *A. versicolor*, *A. griseoaurantiacus*, *A. tardus*.

Секция Usti

A. calidoustus, *A. deflectus*, *A. granulatus*, *A. insuetus*, *A. keveii*, *A. monodii*, *A. pseudodeflectus*, *A. puniceus*, *A. ustus*, *Emericella heterothallica*, *A. porphyrostipitatus*, *A. baeticus*, *A. thesausicus*, *A. subsessilis*, *A. carlsbadensis*, *A. californicus*, *A. germanicus*, *A. pseudoustus*, *A. turkensis*, *A. aegypticus*.

Секция Sparsi

A. amazonicus, *A. anthodesmis*, *A. biplanus*, *A. conjunctus*, *A. diversus*, *A. ecuadorensis*, *A. funiculosus*, *A. haitiensis*, *A. implicatus*, *A. panamensis*, *A. quitensis*, *A. sparsus*.

Подрод Aspergillus

Секция Aspergillus

A. apendiculatus, *A. brunneus*, [*A. chevalieri*], *A. cibarius*, *A. costiformis*, [*A. citrisporus*], *A. cristatus*, *A. glaucus*, *A. intermedius*, *A. leucocarpus*, *A. montevidensis*, *A. neocarnoyi*, *A. niveoglaucus*, *A. proliferans*, *A. pseudoglaucus*, *A. ruber*, *A. tonophilus*, *A. xerophilus*, *A. halophilicus*, [*A. amstelodami*], [*A. repens*], *A. sloanii*, *A. posadasensis*.

Секция Restricti

A. caesiellus, *A. conicus*, *A. gracilis*, *A. penicillioides*, *A. restrictus*, *A. vitricola*.

Подрод Candidi

Секция Candidi

A. campestris, *A. candidus*, *A. taichungensis*, *A. tritici*, *A. implicatus*, *A. pragensis*, *A. subalboidus*.

Секция Petersonii

A. arenarioides, *A. peyronellii*, *A. petersonii*, *A. asclerogenus*

Подрод Ornati

Секция Ornati

Scleroclista ornata, *S. taxteri*.

Группа видов с неясной принадлежностью

A. zonatus, *A. rambelli*, *A. ivoriensis*, *A. raperi*, *A. silvaticus*, [*A. arxii*], *A. sublatus*, *A. maritimus*, *A. pachycristatus*.

Группа видов, близких *Aspergillus* spp. по молекулярно-генетическому критерию

Род Phialosimplex: *Ph. caninus*, *Ph. sclerotialis*, *Ph. chlamydosporus*, *Ph. halophilus* s. *A. baarnensis*.

Род Polypaecilum: *P. pisci*, *P. capsici*, *P. insolitus*.

Род Penicillioipsis: *Penicillioipsis clavariiformis*.

Род Penicillium: *P. inflatum* s. *A. inflatus*, *P. paradoxum* s. *A. paradoxum*.

Род Warcupiella: *Warcupiella spinulosa*.

Род Dichotomomyces: *Dichotomomyces cejpaii*.

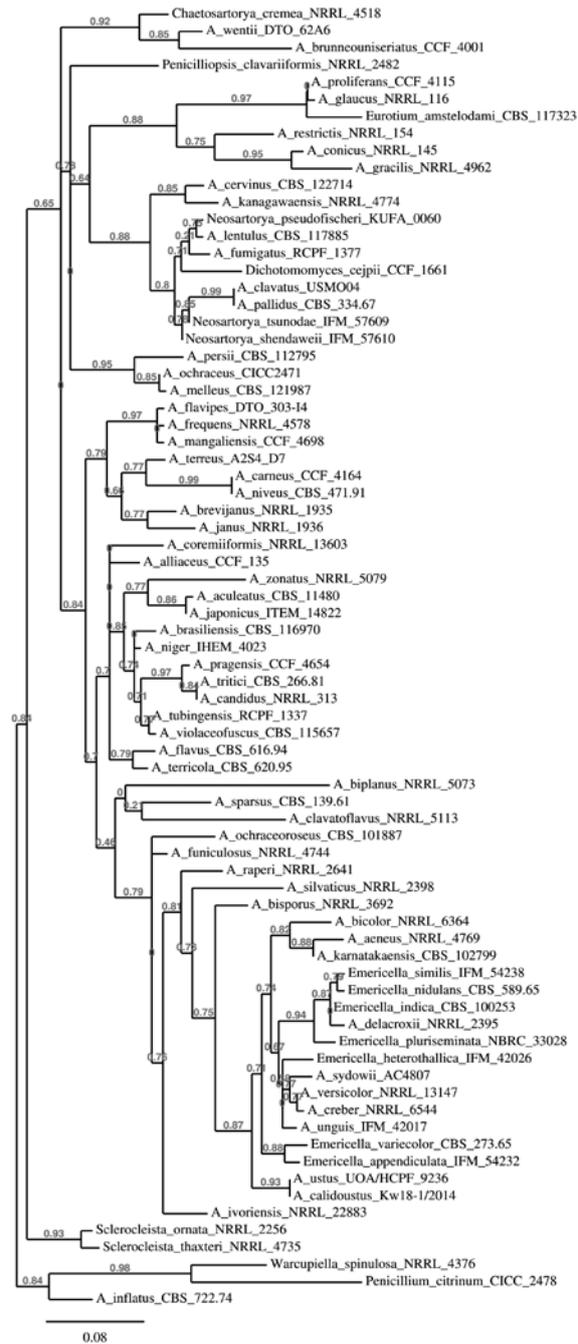


Рис. 1. Филограмма избранных представителей рода *Aspergillus* по частичным последовательностям локуса β-тубулина, полученным через ресурс BLAST.

ОБСУЖДЕНИЕ

Подробнее остановимся на внесенных нами изменениях в систему рода. Секции *Versicolores* и *Aenei* сохранены отдельно от секции *Nidulantes*, а подрод *Stilbothamnium* возвращен в классификационную систему временно в ранге группы секции *Flavi*. В одной из обобщающих монографий по аспергиллам, изданной Maren A. Klich в 2002 г. [29], в системе рода *Aspergillus* упомянут в качестве самостоятельного подрода *Stilbothamnium*, однако, далее в тексте представителей этого рода не обсуждают. Автор, в свою очередь, ссылается на более раннюю работу Gams W. и соавторов (1985 г.). Хотя некоторые представители рода были впервые описаны Hennings P. еще в 1904 г.

в работе «Грибы Амазонии», наиболее доступное морфологическое описание этих грибов представлено в труде Samson R.A. и Pitt J.I. «Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics» (1985). Saccardo P.A. в работе «*Sylloge Fungorum*» затрагивает три вида: *S. penicillopsis*, *S. javanicum* и *S. dybowskii*. В международной базе PubMed род *Stilbothamnium* упомянут в единственной статье Rank C. et al., 2011 [35], в базе ScienceDirect – в девяти работах. В «*Index Fungorum*» отмечены 8 видов рода *Stilbothamnium*, а также некоторые варианты и формы: *S. amazonense* Henn., 1904 (*A. amazonensis* Samson & Seifert, 1986); *S. dybowskii* (Pat., 1892) Henn., 1899 (*A. dybowskii* Samson & Seifert, 1986); *S. dybowskii* var. *dybowskii* (Pat., 1892) Henn., 1899; *S. dybowskii* var. *levisporum* Hauman, 1936; *S. javanicum* Henn. & E. Nyman, 1899; *S. novoguineense* Syd. & P. Syd., 1917; *S. nudipes* Hauman, 1936; *S. nudipes* f. *gracilis* Hauman, 1936; *S. nudipes* f. *nudipes* Hauman, 1936; *S. nudipes* f. *robusta* Hauman, 1936; *S. penicillopsis* Henn. & E. Nyman, 1899; *S. togoense* Henn., 1897 (*A. togoensis* Samson & Seifert, 1986); *S. usneoides* Syd. & P. Syd., 1916; *S. usneoides* var. *usneoides* Syd. & P. Syd., 1916; *S. usneoides* var. *verrucosum* Hauman, 1936.

Проблема изучения рода связана с тем, что молекулярно-генетическими методами исследованы представители только вида *A. togoensis* (*S. togoense*) и схожего со *Stilbothamnium* spp. *A. coremiiformis* (секция *Flavi*), а прочие в коллекциях представлены только гербарными образцами. Необходима экспедиционная работа для сбора новых изолятов этой интересной группы.

Также мы не исключили из системы виды *A. hollandicus* / *Eurotium amstelodami* и *A. reptans* / *E. repens* в секции *Aspergillus*. Сомнения в их реальном существовании ранее высказывали в своих работах Hubka V. и Samson R.A., однако, представители этих видов хорошо известны, неоднократно упомянуты различными авторами за длительный период развития микологии, поэтому целесообразнее будет пересмотреть генетическую концепцию данных видов, нежели проводить их реклассификацию под новыми названиями. При рассмотрении полученной филограммы заметно, что *P. citrinum*, первоначально избранный в качестве «внегруппового» участника, оказался в одной кладе с *Warcupiella spinulosa* и *A. inflatus*. Оба вида имеют проблемное положение в роду *Aspergillus* и, по-видимому, представляют собой маргинальную группу, находящуюся как бы между родов *Aspergillus* и *Penicillium*. Samson R.A. указывает на необходимость исключения *W. spinulosa* из рода *Aspergillus*. Видовая принадлежность *A. inflatus* пересмотрена сравнительно недавно, ранее его обозначали как *Penicillium inflatum*. Вероятно, *W. spinulosa* и *P. inflatum* являются представителями предковой группы трихокомовых аскомицетов, от которых в эволюционном пути выделились *Penicillium* spp. и *Aspergillus* spp. Секцию *Petersonii* перенесли в подрод *Candidi* из подрода *Circumdati* (авторы секции в оригинальной публикации и публикации трактуют подрод *Circumdati* очень широко и включают в него даже секцию *Candidi*).

Samson R.A. на основании некоторых молекулярно-генетических признаков перенес в род *Aspergillus* некоторых представителей родов *Phialosimplex* и *Polyraecilum*. В нашей системе они оставлены временно в «группе видов, близких *Aspergillus* spp. по молекуляр-

но-генетическому критерию» под старыми родовыми именами, поскольку аппарат спорообразования этих грибов мало схож с продукцией конидий у *Aspergillus* spp.

Внутри ветвей, охватывающих большую часть выборки, наиболее дистантная ветвь включила представителей *Sclerocleista* spp. (секция *Ornati*), крупную совокупность прочих ветвей можно обозначить, как *Aspergillus sensu stricto*. В этой группе также оказался штамм *Penicillioopsis clavariiformis* (встречается также написание *P. clavariaeformis*). Он представлен самостоятельной ветвью в кладе, включающей представителей подрода *Aspergillus*, подрода *Fumigati* и секции *Circumdati*. Род *Penicillioopsis* обладает своеобразно устроенным конидиогенным аппаратом, который включает ветвление стеригм (как у *Penicillium*), размещенных на терминальных расширениях (как у *Aspergillus*). Учитывая яркое отличие аппарата спороношения, а также наличие синнем, необходимо предпринять поиск других молекулярных маркеров в попытке более детально и объективно установить филогенетические связи родов *Aspergillus* и *Penicillioopsis*.

При анализе филограммы выявили, что некоторые секции «расщепились» на две ветки, к таким можно отнести *Fumigati*, *Clavati*, *Flavi*, *Nigri*, *Nidulantes*, *Sparsi*, а также условных секций *Zonati* (3 ветви) и *Raperi*. Представители секций *Cremeri*, *Aspergillus*, *Restricti*, *Cervini*, *Circumdati*, *Flavipedes*, *Terrei*, *Jani*, *Candidi*, *Aenei* и *Ornati* оказались сгруппированными в единые клады.

Представители подрода *Aspergillus* были собраны вместе, секций *Restricti* и *Aspergillus* – заняли отдельные ветви в соответствии с секционной принадлежностью. Подрод *Fumigati* также представлен отдельной ветвью, однако, внутри клады представители секций разделились не вполне четко: виды *Cervini* выделены в отдельную кладу, а представители *Fumigati* и *Clavati* – перемешаны. Своеобразный представитель секции *Clavati* – *Dichotomomyces cejprii* – по последовательности β-тубулина проявил сходство с классическими видами секции *Fumigati*: *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *N. pseudofischeri*; в то же время «новые» виды секции *Fumigati* – *N. tsunodae* и *N. shendawei* попали в общую кладу с *A. clavatus* и родственным ему *A. pallidus*. В подрode *Terrei* *A. janus* и *A. brevijan* образовали самостоятельную ветвь от видов *Flavipedes*, что служит показателем в пользу выделения отдельной секции *Jani*. В подрode *Nidulantes* представители секций *Nidulantes* и *Versicolores* оказались перемешанными между собой, что оправдывает предложение объединить эти секции (по генетическому признаку), выдвинутое Peterson S.W. В то же время представители секции *Aenei* образовали самостоятельную кладу, что упрочняет данную секцию.

В августе 2016 г. французскими микологами Gautier M., Normand A.-C. и Ranque S. опубликована новейшая система рода *Aspergillus* [36]. Ее особенностью является попытка авторов разделить секции на клады и некоторые группы видов. Система достаточно детализированная, однако, в ней есть некоторые дискуссионные моменты. Так, *A. inflatus* внесен в секцию *Cremeri*. *A. bisporus*, а также группы *A. ivoriensis* и *A. raperi* авторы обозначили как «неназванные новые секции», хотя ранее их уже называли *Bispori* и *Raperi* соответственно. Отсутствует секция *Petersonii*. В секции *Nigri* нет *A. awamori*, но внесен *A. welwitschiae*, который ранее

признали синонимом первого упомянутого вида [37]. В любом случае, *A. awamori* / *A. welwitschiae* состоят в близком родстве с *A. niger*, но в данной системе в «кладе *Niger*» эти виды не включены. Авторы исключили из системы *A. hollandicus (amstelodami)* и *A. reptans*, замечания о существовании данных видов мы привели выше. Из рода почему-то исключили секцию *Ornati*. Вид *A. silvaticus*, ранее находившийся в одноименной секции *Silvati*, перемещен в секцию *Nidulantes*.

Авторы поместили в секцию *Fumigati* своеобразные виды – *A. beijingensis*, *A. wangduanlii* и *A. qiuzutongii*. Ранее об отнесении их к данной секции упоминали в работе, связанной с разработкой ПЦР-тест-системы, в которой не объяснена причина такого положения [Zhao J. et al., 2001]. Данные виды отличаются образованием довольно небольших изящных конидиальных головок с одним рядом стеригм, способностью к ветвлению конидиеносцев и образованию вторичных конидиальных головок. Они известны по единичным изолятам, выделенным из верхнечелюстных пазух людей в Китае. Морфологическое изучение проведено в единственной работе [Li D.M., Horie Y., Wang Y., Li R., 1998]. Проверить их филогенетические связи с другими представителями рода *Aspergillus* затруднительно, поскольку они не внесены в реестр видовых названий BLAST. Последнее обстоятельство может означать, что их последовательности ДНК не депонированы. Также в секцию *Fumigati* авторы включили *D. sejpii*. Данный вид действительно по генетическим маркерам (последовательности β -тубулина) сходен более с представителями секции *Fumigati*, чем *Clavati*. Он также обладает способностью продуцировать глиотоксин (другие аспергиллы секции *Clavati* к этому не способны). Однако авторы обозначили его анаморфным именем *A. sejpii (Aspergillus sejpii)*, но такое наименование вида нельзя считать безусловно корректным. Во-первых, *D. sejpii* гомоталлический гриб, который существует в телеоморфном состоянии, во-вторых, структуры бесполого спороношения резко отличаются от остальных представителей рода *Aspergillus*, а скорее, по замечанию Varga J., сходны с родом *Polypaecilum*: конидиальных головок нет, споры формируются на дихотомических ветвях-стеригмах на вершине конидиеносца. В секцию *Fumigati* не внесены открытый в 2016 г. *A. oerlinghausenensis*, отличающийся природной устойчивостью к итраконазолу (в BLAST уже доступна его последовательность ланостерол-14 α -деметилазы) [38]. Как и

Gautier M. с соавторами, так и Samson R.A., включили в род *Aspergillus* представителей рода *Phialosimplex (P. caninus, P. sclerotialis и P. chlamydosporus)*, присвоили им соответствующее родовое имя. Готье, Норманд и Ранке выделили их в отдельную секцию «*Phialosimplex*» (в авторском написании). Как и *Dichotomyces, Phialosimplex* spp. никогда не образуют конидиальных головок, их фиалиды (стеригмы), производящие конидии в цепочках, расположены на мицелии одиночно. Неясность в систему Готье-Норманда-Ранке вносит одновременное упоминание видовых названий, которые признали синонимами: *A. subsessilis = A. kassunensis*, *A. sublatus = A. montenegroi, A. otanii = N. fennelliae*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате аналитического обзора составлен компромиссный вариант внутривидовой системы *Aspergillus* spp. Показано, что изолированное использование отдельных молекулярно-генетических маркеров (на примере локуса β -тубулина), как, вероятно, и других микромицетов, не является достаточно надежным основанием для внесения изменения в систему аспергиллов. В частности, развитие такого подхода привело к неоднозначным решениям, связанным с пересмотром границ рода *Aspergillus* и некоторых других родов семейства *Trichocomaceae*. Представленную здесь несколько скорректированную систему рода, а также систему, предложенную Gautier M., Normand A.-C. и Ranque S., не следует рассматривать как взаимоисключающие мнения. По-видимому, наиболее оправданной позицией является признание некоего «ядра» рода *Aspergillus*, основанного на видах, детально описанных и неоднократно выделенных из различных источников; а также ранее известных редких и новых видов, позиции которых пересматривают. По этой же причине попытка уточнять вплоть до единиц количество видов аспергиллов несостоятельна, поскольку работы по разнообразию этих грибов ведут интенсивно и приводят к новым коррективам. По-видимому, общая численность видов на данный момент составляет около 330.

Для дальнейшего совершенствования систематики рода *Aspergillus* и других трихокомовых аскомицетов необходимо создание общедоступных баз данных на основе ведущих коллекций микробов, которые включали бы подробные паспорта штаммов с тщательно приведенными морфологическими, биохимическими и генетическими свойствами.

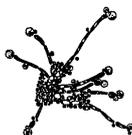
ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Samson R.A., et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*// Studies in Mycology. – 2014. – Vol. 78. – P. 141-173.
2. Machida M., Gomi K. *Aspergillus*: molecular biology and genomics. – Norfolk: Horizon Scientific Press, 2010. – 238 p.
3. Visagie C.M., et al. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*)// Studies in Mycology. – 2014. – Vol. 78. – P. 1-61.
4. Samson R.A., et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*// Studies in Mycology. – 2007. – Vol. 59. – P. 147-203.
5. Barrs V.R., et al. *Aspergillus felis* sp. nov., an emerging agent of invasive aspergillosis in humans, cats, and dogs// PLOSone. – 2013. – Vol. 8, Is. 6. – e64871. – 9 p.
6. Sugui J.A., et al. Genetic relatedness versus biological compatibility between *Aspergillus fumigatus* and related species// J. of Clinical Microbiology. – 2014. – Vol. 52, №10. – P. 3707-3721.
7. Matsuzawa T., et al. Two new species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from caatinga soil in the state of Pernambuco, Brazil// Mycoscience. – Vol. 55, №2. – P. 79-88.
8. Matsuzawa T., et al. *Aspergillus huiyaniae* sp. nov., a teleomorphic species in sect. *Fumigati* isolated from desert soil in China// Mycoscience. – Vol. 55, Is. 3. – P. 213-220.
9. Novakova A., Hubka V., Dudova Z., Kolarik M. New species in *Aspergillus* section *Fumigati* from reclamation sites in Wyoming

- (U.S.A.) and revision of *A. viridinutans* complex// Fungal diversity. – 2014. – Vol. 64, Is.1. – P. 253-274.
10. Varga J., Frisvad J.C., Samson R.A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*// Studies in Mycology. 2011. – Vol. 69, №1. – P. 57-80.
 11. Soares C., et al. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal// Mycologia. – 2012. – Vol. 104, №3. – P. 682-697.
 12. Taniwaki M.H., et al. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from brazil nuts// PLOS one. – 2012. – Vol. 7, №8. – <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0042480>.
 13. Varga J., et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*// Studies in Mycology. – 2011. – Vol. 69. – P. 1-17.
 14. Samson R.A., et al. Diagnostic tools to identify black aspergilli// Studies in Mycology. – 2007. – Vol. 59. – P. 129-145.
 15. Noonim P., et al. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans// International J. of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2008. – Vol. 58, Pt. 7. – P. 1727-1734.
 16. Jurjevic Z., et al. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air// IMA Fungus. – 2012. – Vol. 3, №2. – P. 159-173.
 17. Houbraken J., et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti*// Studies in Mycology. – 2007. – Vol. 59. – P. 107-128.
 18. Novakova A., Hubka V., Saiz-Jimenez C., Kolarik M. *Aspergillus baeticus* sp. nov. and *Aspergillus thesauricus* sp. nov., two species in section *Usti* from Spanish caves// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2012. – Vol. 62, Pt. 11. – P. 2778-2785.
 19. Samson R.A., Varga J., Meijer M., Frisvad J.C. New taxa in *Aspergillus* section *Usti*// Studies in Mycology. – 2011. – Vol. 69, №1. – P. 81-97.
 20. Varga J., Frisvad J.C., Samson R.A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Sparsi*// IMA Fungus. – 2010. – Vol. 1, Is.2. – P. 187-195.
 21. Samson R.A., Peterson S.W., Frisvad J.C., Varga J. New species in *Aspergillus* section *Terrei*// Studies in Mycology. 2011. – Vol. 69. – P. 39-55.
 22. Hubka V., et al. Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov.// Mycologia. – 2015. – Vol. 107, №1. – P. 169-208.
 23. Varga J., Frisvad J.C., Samson R.A. *Aspergillus* sect. *Aenei* sect. nov., a new section of the genus for *A. karnatakaensis* sp. nov. and some allied fungi// IMA Fungus. – 2010. – Vol. 1, №2. – P. 197-205.
 24. Jurjevic Z., Peterson S.W., Horn B.W. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny// IMA Fungus. – 2012. – Vol. 3, №1. – P. 59-79.
 25. Varga J., Due M., Frisvad J.C., Samson R.A. Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data// Studies in Mycology. – 2007. – Vol. 59. – P. 89-106.
 26. Varga J., Frisvad J.C., Samson R.A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data// Studies in Mycology. – 2007. – Vol. 59. – P. 75-88.
 27. Hubka V., et al. *Aspergillus pragensis* sp. nov. discovered during molecular reidentification of clinical isolates belonging to *Aspergillus* section *Candidi*// Medical Mycology. – 2014. – Vol. 52. – P. 565-576.
 28. Jurjevic Z., Kubatova A., Kolarik M., Hubka V. Taxonomy of *Aspergillus* section *Petersonii* sect. nov. encompassing indoor and soil-borne species with predominant tropical distribution// Plant Systematics and Evolution. – Vol. 301, №10. – P. 2441-2462.
 29. Klich M.A. Identification of common *Aspergillus* species. – Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. – 116 p.
 30. Hubka V., Kolarik M., Kubatova A., Peterson S.W. Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus* // Mycologia. – 2013. – Vol. 105, №4. – P. 912-937.
 31. Marin-Felix Y., Cano-lira J.F., Guarro J., Stchigel A.M. *Leiothecium cristatum* sp. nov. and *Aspergillus posadasensis* sp. nov., two species of *Eurotiales* from rainforest soils in South America// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2014. – Vol. 64, Pt. 8. – P. 2871-2877.
 32. Samson R.A., Varga J. *Aspergillus* systematics in the genomic era. – Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007. – 206 p.
 33. Visagie C.M., et al. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world// Studies in Mycology. – 2014. – Vol. 78. – P. 63-139.
 34. Dereeper A., et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist// Nucleic Acids Res. – 2008. – Vol. 1, №36 (web server is.). – P. w465 – w469.
 35. Rank C., Nielsen K.F., Larsen T.O., et al. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi// Fungal Biology. – 2011. – Vol. 115, Is. 4-5. – P. 406-420.
 36. Gautier M., Normand A.-C., Ranque S. Previously unknown species of *Aspergillus*// Clin. Microbiol. Infect. – 2016. – Vol. 22, №8. – P. 662-669.
 37. Varga J., Baranyi N., Chandrasekaran M., Vagvolgyi C., Kocsube S. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: an update// Acta Biologica Szegadiensis. – 2015. – Vol. 59, Is. 2. – P. 151-167.
 38. Houbraken J., et al. *Aspergillus oerlinghausenensis*, a new mould species closely related to *A. fumigatus*// FEMS Microbiology Letters. – 2016. – Vol. 363, Is. 3. – 10.1093/femsle/fnv236.

Поступила в редакцию журнала 21.11.2016

Рецензент: Е.Р. Рауш



ОЦЕНКА КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МОДУЛЯ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ LOGODERM

¹Купеева И.А. (заместитель директора),
²Разнатовский К.И. (зав. кафедрой), ²Раводин Р.А.
(доцент кафедры)*

¹ Департамент медицинского образования и кадровой политики в здравоохранении, Москва; ²Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра дерматовенерологии), Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2016

Статья посвящена проблеме повышения качества оказания медицинской помощи населению. В качестве одного из способов повышения качества дерматовенерологической помощи предложена интеллектуальная система поддержки принятия врачебных решений, особое внимание уделено оценке клинической эффективности диагностического модуля данной системы.

Ключевые слова: дерматовенерология, интеллектуальные системы, медицина, системы поддержки принятия врачебных решений

CLINICAL EFFICIENCY ASSESSMENT OF DIAGNOSTIC MODULE OF INTELLECTUAL SYSTEM LOGODERM

¹Kupeeva I.A. (deputy director), ²Raznatovsky
K.I. (head of the chair), ²Ravodin R.A. (associate
professor of the chair)

¹ Department of health education and personnel policy in health care, Moscow; ² North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (chair of dermatovenerology), St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2016

The article is devoted to the problem of improving the quality of health care. As one of the ways to improve the quality of dermatological care is proposed intellectual system to support medical decision. Special attention is paid to the clinical efficiency assessment of diagnostic module of this system.

Key words: dermatovenerology, intellectual systems, medicine, support systems clinical decision

Качество оказываемой медицинской помощи населению в значительной степени зависит от уровня подготовки (компетентности) врачебного персонала [1-6]. Врач всегда был и остаётся главным звеном всей системы здравоохранения, но, в то же время, он является и наиболее уязвимым элементом данной системы, поскольку способен ошибаться и принимать неправильные решения. Проблема врачебных ошибок стоит достаточно остро в медицине [7-10; Лепяхин В.К. и др., // Качественная клинич. практика. – 2002. – №1; Kohn L.T., et al. To err is human: building a safer health system, 2000; Kaushal R., et al. // Arch. Intern. Med. – 2003. – Vol. 163]. Дерматовенерология не является в этой связи исключением [11-15; Шапошников О.К. и др. Ошибки в дерматологии, 1987].

Другие актуальные проблемы современной медицины – лавинообразный рост знаний, появление новых лекарственных препаратов, технологий, а также возникновение совершенно новых медицинских специальностей (иммунологии, аллергологии и ряда других), что приводит к информационному коллапсу, справиться с которым рядовому практикующему врачу с помощью стандартных справочных средств становится всё сложнее. Одновременно с ростом информационной нагрузки на врача в современном мире стремительно уменьшается время на принятие решения [16-19; Барбинов В.В. дис... д.м.н., 1998; Киликоский В.В. // Врач и информ. технологии. – 2004. – №9].

В этих условиях одним из перспективных направлений повышения качества медицинской помощи больным дерматовенерологического профиля, отвечающим современным требованиям, является создание систем поддержки принятия врачебных решений, а также развитие на их базе телемедицинских технологий.

Цель работы – оценить клиническую эффективность диагностического модуля разработанной интеллектуальной системы поддержки принятия врачебных решений в области дерматовенерологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами разработана интеллектуальная информационно-диагностическая и обучающая система поддержки принятия врачебных решений в области дерматовенерологии, получившая название «Logoderm» [20], выполненная как онлайн-приложение в виде динамически генерируемых html-страниц, доступных в сети Интернет под доменным именем logoderm.ru. Система «Logoderm» имеет модульное строение и состоит из следующих основных модулей: «Диагностика онлайн», «Консультация эксперта», «Школа врача», «Атлас», «Рекомендации», «Справочник симптомов», «Фарм-справочник», «Медучреждения и реабилитация», «Вопрос врачу».

Диагностический модуль предназначен для автоматизированного анализа вводимых врачом симптомов заболевания, помогая ему быстро построить дифференциально-диагностический ряд вероятных диагнозов. Модуль «Диагностика онлайн» состоит из отдельных разделов, описывающих пациента. Наименования разделов соответствуют 20 классам онтологии, разработанной нами ранее, при этом часть из этих разделов носит обязательный характер для заполнения, а часть – необязательный (однако их включение способствует повышению точности диагностики) [21]. Обязательными для заполнения являются все разделы,

* Контактное лицо: Раводин Роман Анатольевич,
e-mail: rracad@mail.ru

описывающие сыпь: виды сыпи на коже и слизистых оболочках, изменения волос и ногтей, особенности расположения сыпи, взаимное расположение элементов сыпи, локализация сыпи и начальных высыпаний, пол, возраст начала заболевания, жалобы, начало заболевания, длительность, течение заболевания (Рис.1-3). Для удобства работы пользователя каждый симптом, который может быть визуализирован, снабжён фотографиями и имеет лаконичное текстовое описание. Мы стремились разработать интуитивно понятный «дружественный» интерфейс страниц, позволяющий даже неподготовленному пользователю работать с ним самостоятельно. При этом практикующему врачу предоставляется возможность самому выбрать симптомы, имеющиеся у пациента, путём сопоставления их со стандартизированными изображениями симптомов дерматологических заболеваний и их кратким описанием в системе.

Точное определение локализации высыпаний достигается путём сопоставления расположения имеющихся у пациента высыпаний с текстовым описанием анатомической области и одновременным выделением соответствующих зон на теле компьютерной модели человека.

После заполнения обязательных полей модуля «диагностика» система «Logoderm» выдаёт перечень из 10 диагнозов с указанием их вероятностей. Анализ симптомов происходит автоматизировано в соответствии с разработанной нами ранее формулой, учитывающей количество и различную значимость высоко-, средне- и низкоспецифичных симптомов для постановки диагнозов тех или иных заболеваний. В процессе работы мы ограничили максимальную вероятность диагностики любого заболевания 80%. Это было сделано намеренно, чтобы исключить излишнюю самоуверенность практикующих врачей.

Онлайн-диагностика по дерматовенерологии

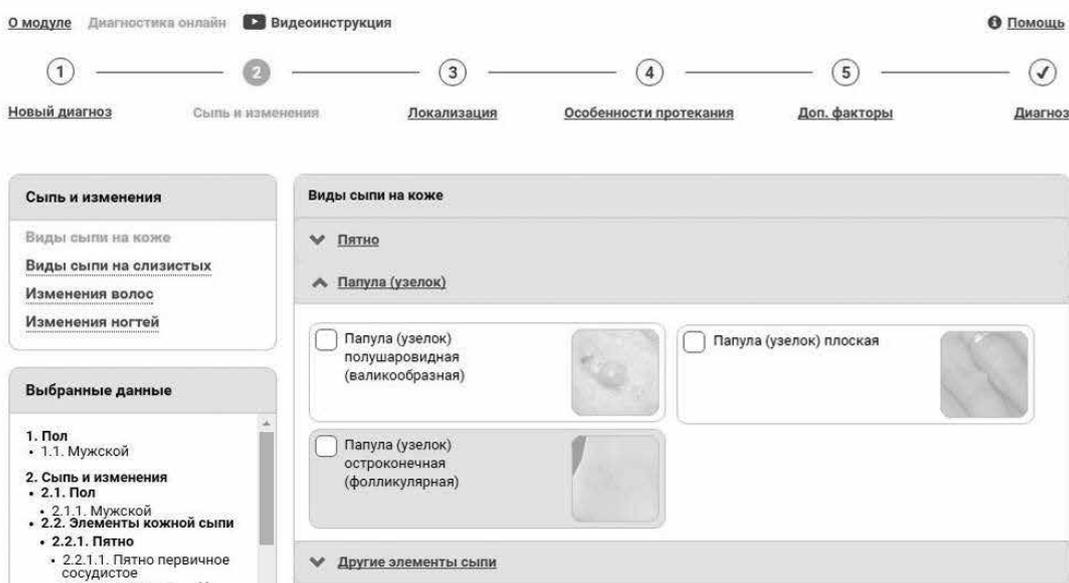


Рис. 1. Раздел «Виды сыпи на коже»

Онлайн-диагностика по дерматовенерологии

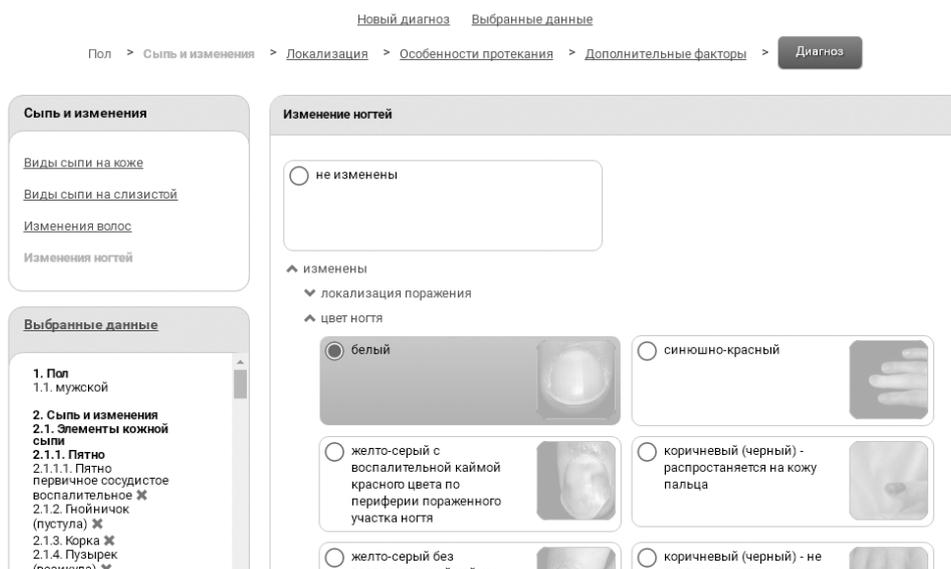


Рис. 2. Раздел «Изменения ногтей»

Онлайн-диагностика по дерматовенерологии

Новый диагноз Выбранные данные

Пол > Сыпь и изменения > Локализация > Особенности протекания > Дополнительные факторы > Диагноз

Локализация

Локализация сыпи

Особенности расположения сыпи

Взаимное расположение элементов сыпи

Локализация сыпи

голова

волосистая часть головы

по краю роста волос

лицо

лоб брови

височные области скуловые дуги

верхние веки нижние веки

нос щеки

Выбранные данные

1. Пол

1.1. мужской

2. Сыпь и изменения

2.1. Элементы кожной сыпи

2.1.1. Пятно

2.1.1.1. Пятно первичное сосудистое воспалительное ✖

2.1.2. Гнойничок (пустула) ✖

2.1.3. Корка ✖

2.1.4. Пузырек (везикула) ✖

Рис. 3. Раздел «Локализация сыпи»

Для определения клинической эффективности модуля «Диагностика» разработанной информационной системы мы сотрудничали с ГБУЗ КВД №1 Василеостровского района Санкт-Петербурга и дерматологическим отделением ГБУЗ ГП №60 Поликлинического отделения №67 г. Павловска (Санкт-Петербург). В соответствии с планом нашей работы, практикующие врачи-дерматовенерологи из данных лечебных учреждений проводили первичное обследование пациентов, устанавливали предварительный диагноз, а затем вводили симптомы заболеваний в диагностический модуль системы «Logoderm». Для постановки окончательного диагноза все пациенты впоследствии были осмотрены врачами-экспертами, в роли которых выступали главный дерматовенеролог Санкт-Петербурга профессор Разнатовский К.И. и доцент кафедры дерматовенерологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова Равдин Р.А. В исследование включали только те случаи, где экспертами был установлен окончательный диагноз. Для оценки клинической эффективности диагностического модуля было обследовано 96 пациентов, 43 женщины и 53 мужчины (в возрасте от 9 до 90 лет), при этом мы анализировали процент (частоту) совпадений окончательного диагноза, установленного при очной консультации врача-эксперта, и диагноза практикующего врача, а также первых трёх заключений диагностического модуля системы «Logoderm».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Продемонстрируем работу диагностического модуля на конкретном клиническом примере. Пациент Д., 29 лет, обратился с жалобами на распространённые высыпания на коже с незначительным зудом. Высыпания существуют около 3-х недель, постепенно распространяются по телу. Объективно: процесс поражения кожи носит распространённый характер с локализацией высыпаний на туловище (живот, спина) и правом плече; сами очаги имеют кольцевидную форму и представлены воспалительными пятнами с незначительным центральным шелушением (Рис. 4-5). Пациент лечился самостоятельно – местно использовал спир-

товой раствор 5% йода с незначительным положительным эффектом. В окружении пациента высыпаний на коже ни у кого нет, контакт с животными отрицает.



Рис. 4. Очаг поражения на передне-боковой поверхности живота.



Рис. 5. Очаги поражения на медиальной поверхности правого плеча.

Практикующим врачом был выставлен предварительный диагноз: «Распространённый экзематид». Назначена местная противовоспалительная терапия, включающая топические глюкокортикоидные кремы.

Для отработки первичной диагностической гипотезы симптомы были внесены в модуль системы «Logoderm». Из элементов кожной сыпи у данного пациента присутствовали воспалительные пятна и чешуйки. Волосы в очагах поражения – видимо не изме-

нены. При оценке особенности расположения кожной сыпи отмечали поражение двух и более анатомических областей – сыпь носила распространённый асимметричный характер. Элементы кожной сыпи имели кольцевидную группировку. Высыпания располагались в области передне-боковой поверхности живота, медиальной поверхности правого плеча и левой подлопаточной области. Пациент – мужчина в возрасте от 17 до 50 лет с жалобами на наличие высыпаний.

Онлайн-диагностика по дерматовенерологии

[Новый диагноз](#) [Выбранные данные](#)

[Пол](#) > [Сыпь и изменения](#) > [Локализация](#) > [Особенности протекания](#) > [Дополнительные факторы](#) > [Диагноз](#)

Результаты онлайн-диагностики от 01.04.2016, 18:04

<p>Вероятные диагнозы</p> <table border="0"> <tr><td>Поверхностная трихофития (микроспория) гладкой кожи</td><td style="text-align: right;">47.53 %</td></tr> <tr><td>Микоз крупных складок тела</td><td style="text-align: right;">46.32 %</td></tr> <tr><td>Розовый лишай</td><td style="text-align: right;">39.81 %</td></tr> <tr><td>Микроспория волосистой части головы</td><td style="text-align: right;">37.63 %</td></tr> <tr><td>Сквамозная форма микоза стоп</td><td style="text-align: right;">36.10 %</td></tr> <tr><td>Парапсориаз острый (подострый) лихеноидный вариолиформный (парапсориаз типа Мухи-Габермана)</td><td style="text-align: right;">34.72 %</td></tr> <tr><td>Парапсориаз хронический лихеноидный</td><td style="text-align: right;">33.20 %</td></tr> <tr><td>Инфильтративно-нагноительная трихофития области бороды и усов</td><td style="text-align: right;">30.37 %</td></tr> <tr><td>Крапивница</td><td style="text-align: right;">29.54 %</td></tr> <tr><td>Парапсориаз мелкобляшечный</td><td style="text-align: right;">28.50 %</td></tr> </table>	Поверхностная трихофития (микроспория) гладкой кожи	47.53 %	Микоз крупных складок тела	46.32 %	Розовый лишай	39.81 %	Микроспория волосистой части головы	37.63 %	Сквамозная форма микоза стоп	36.10 %	Парапсориаз острый (подострый) лихеноидный вариолиформный (парапсориаз типа Мухи-Габермана)	34.72 %	Парапсориаз хронический лихеноидный	33.20 %	Инфильтративно-нагноительная трихофития области бороды и усов	30.37 %	Крапивница	29.54 %	Парапсориаз мелкобляшечный	28.50 %	<p>Выбранные данные</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Пол <ol style="list-style-type: none"> 1.1. мужской 2. Сыпь и изменения <ol style="list-style-type: none"> 2.1. Элементы кожной сыпи <ol style="list-style-type: none"> 2.1.1. Пятно <ol style="list-style-type: none"> 2.1.1.1. Пятно первичное сосудистое воспалительное 2.1.2. Чешуйка x x 2.2. Придатки кожи <ol style="list-style-type: none"> 2.2.1. Изменение волос <ol style="list-style-type: none"> 2.2.1.1. на волосистой части головы <ol style="list-style-type: none"> 2.2.1.1.1. не изменены x 2.2.1.2. в области роста бороды и усов <ol style="list-style-type: none"> 2.2.1.2.1. не изменены x 2.2.1.3. на гладкой коже <ol style="list-style-type: none"> 2.2.1.3.1. не изменены x 2.2.1.4. в подмышечных впадинах
Поверхностная трихофития (микроспория) гладкой кожи	47.53 %																				
Микоз крупных складок тела	46.32 %																				
Розовый лишай	39.81 %																				
Микроспория волосистой части головы	37.63 %																				
Сквамозная форма микоза стоп	36.10 %																				
Парапсориаз острый (подострый) лихеноидный вариолиформный (парапсориаз типа Мухи-Габермана)	34.72 %																				
Парапсориаз хронический лихеноидный	33.20 %																				
Инфильтративно-нагноительная трихофития области бороды и усов	30.37 %																				
Крапивница	29.54 %																				
Парапсориаз мелкобляшечный	28.50 %																				

Рис. 6. Заключение, выданное системой (в виде перечня возможных диагнозов с указанием их вероятностей).

Введенные Вами симптомы для диагностики:

- 1. Элементы кожной сыпи
 - 1.1. Чешуйка
 - 1.2. Пятно
 - 1.2.1. Пятно первичное сосудистое воспалительное
- 2. Придатки кожи
 - 2.1. Ногтевые пластинки
 - 2.1.1 не изменены
 - 2.2. Волосы
 - 2.2.1. на волосистой части головы
 - 2.2.1.1. не изменены
 - 2.2.2. в области роста бороды и усов
 - 2.2.2.1. не изменены
 - 2.2.3. на гладкой коже
 - 2.2.3.1. не изменены
 - 2.2.4. в подмышечных впадинах
 - 2.2.4.1. не изменены
 - 2.2.5. на лобке
 - 2.2.5.1. не изменены
 - 2.2.6. брови
 - 2.2.6.1. не изменены
 - 2.2.7. ресницы
 - 2.2.7.1. не изменены
- 3. Особенности расположения сыпи
 - 3.1. распространенность
 - 3.1.1. распространенная – поражены две и более анатомические области
 - 3.2. симметричность
 - 3.2.1. асимметричная
 - 3.3. распространенное [расположение элементов сыпи в пределах нескольких анатомических областей]
 - 3.3.1.1. с кольцевидной [расположение сыпи с образованием кольца]
 - 4. Пол
 - 4.1. мужской
 - 5. Локализация сыпи
 - 5.1. туловище
 - 5.1.1. живот
 - 5.1.1.1. передне-боковые поверхности
 - 5.1.2. спина
 - 5.1.2.1. подлопаточная область
 - 5.2. верхние конечности
 - 5.2.1. плечи
 - 6. Возраст начала заболевания
 - 6.1. от 17 до 50 лет
 - 7. Жалобы
 - 7.1. жалобы со стороны кожи (придатков кожи) и слизистых оболочек
 - 7.1.1. наличие высыпаний (новообразований)

Рис. 7. Формализованное описание пациента, выдаваемое системой.

На основании полученного заключения (Рис. 6) практикующий врач склонился к диагнозу «Поверхностная трихофития (микроспория) гладкой кожи». По указанию врача пациент прекратил наружную терапию и в течение недели ничем не лечился. На повторном приёме очаги поражения исследовали в лучах лампы Вуда, где обнаружили специфическое зеленоватое свечение (Рис. 8), микроскопически в чешуйках эпидермиса из очагов поражения был обнаружен мицелий, посев не выполняли. Диагноз «Микроспория гладкой кожи» был окончательно подтверждён. Пациенту были назначены местные антимикотики. Результатом терапии явилось полное разрешение очагов поражения.



Рис. 8. Специфическое свечение очага поражения в лучах лампы Вуда.

Для оценки клинической эффективности диагностического модуля системы «Logoderm» нами обследовано 96 пациентов (43 женщины и 53 мужчины), при этом для практикующего врача процент правильных диагнозов составил 68,8% при 95% доверительном интервале от 58,7% до 75,1%, для диагностического модуля системы «Logoderm» – 82% при 95% доверительном интервале от 69,9% до 86,3%.

Клиническая эффективность работы диагностического модуля была выше, чем клиническая эффективность практикующего врача, различия были статистически значимы ($p_0 < 0,05$).

При оценке эффективности совместного функционирования практикующего врача и модуля «Диагностика онлайн» при расчётах допускали, что их совместная работа помогает врачу диагностировать заболевание, если хотя бы кто-то из них установил правильный диагноз. Исходя из этого, оставили только те ситуации, когда врач и система действовали параллельно: поставили «1», если хотя бы один из них установил правильный диагноз, «0» – если оба выставили

неправильный диагноз.

При совместной работе врача и системы процент постановки правильного диагноза вырос до 92,7%, а соответствующий 95% доверительный интервал был в пределах от 87,5% до 97,9%. На основании полученных результатов можно утверждать о наличии значимых различий между вычисленными частотами.

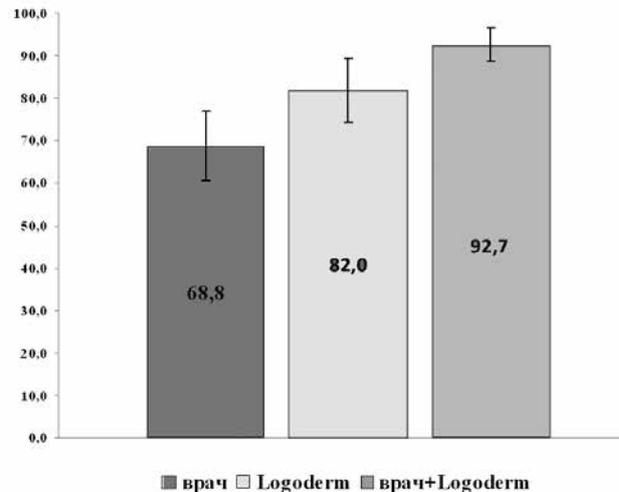


Рис. 9. Процент совпадений диагнозов в зависимости от типа консультаций по сравнению с очной консультацией эксперта (в %).

ВЫВОДЫ

1. Разработанный интерфейс модуля «Диагностика онлайн» и предлагаемый механизм ввода симптомов позволяют максимально упростить работу пользователя, а выдаваемый в заключении перечень вероятных заболеваний – быстро сформировать дифференциально-диагностический ряд возможных диагнозов. Данная информация даёт возможность практикующему врачу самостоятельно провести дифференциальную диагностику, обращаясь к подробному описанию заболеваний из выводимого перечня благодаря имеющимся гиперссылкам. По результатам работы с данным модулем также формируется стандартизированное описание пациента, которое вместе с перечнем вероятных диагнозов можно сохранить из системы или отправить на телемедицинскую консультацию эксперту, снабдив их результатами анализов и фотографиями высыпаний, а также словесным описанием клинической ситуации.

2. Совместное функционирование практикующего врача и диагностического модуля ИСППВР «Logoderm» позволяет значительно повысить клиническую эффективность работы врача-дерматовенеролога.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Вялков А.И., Хальфин Р.А., Разумов А.Н., Ткаченко С.Б. Государственная политика в области информатизации здравоохранения в Российской Федерации // Главврач. – 2008. – №4. – С. 19-33.
2. Кайдалов А. Информатизация медицины: проблемы и решения [Электронный ресурс] // PCWeekDoctor. – 2008. – № 2. – Режим доступа: <http://www.pcweek.ru/themes/detail.php?ID=111200>. – Загл. с экрана.
3. Лапун И. ИТ в отечественной медицине. Всё еще в начале пути? // Врач и информ. технологии. – 2008. – № 1. – С. 28-37.
4. Леванов В.М. От телемедицины до электронного здравоохранения: эволюция терминов // Мед. альманах. – 2012. – №2. – С. 16-19.
5. Зарубина В.Т. Основные направления информатизации здравоохранения России на современном этапе // Федеральный справочник «Здравоохранение России». – 2014. – Т. 15. – С. 355-360.
6. Совещание о реализации региональных программ модернизации здравоохранения. [Электронный ресурс]. – Режим

- доступа: <http://kremlin.ru/news/16739>. – 31.10.2012. – Загл. с экрана.
7. *Герасименко И.Н.* Телемедицинские технологии как организационный и методический фактор предупреждения ошибочных действий медицинских специалистов // *Здравоохранение Рос. Федерации*. – 2007. – №6. – С. 34-36.
 8. *Круглый стол* Комиссии Общественной палаты Российской Федерации по охране здоровья, экологии, развитию физической культуры и спорта «Роль патологоанатомической службы в повышении качества медицинской помощи в Российской Федерации» от 17.03.2011 г. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.oprf.ru/ru/press/news/2011/newsitem/8712>. – Загл. с экрана.
 9. *Галанова Г.И.* Врачебная ошибка – проблема не только врача // *Менеджер здравоохранения*. – 2014. – №8. – С. 49-52.
 10. *Oyebode F.* Clinical errors and medical negligence // *Adv. Psychiatr. Treat.* – 2006. – №12. – P. 221-227.
 11. *Скрипкин Ю.К., Пашиных А.Г.* Профессиональные ошибки и дефекты оказания дерматовенерологической помощи. – М.: Мед. книга, 2007. – 120 с.
 12. *Елистратова И.В.* Экспертиза дефектов оказания дерматовенерологической помощи: Автореф. дис... канд. мед. наук. – М.: 2008. – 25 с.
 13. *Смирнова И.О., Карачевцева М.А., Михайлов С.М., Куликова Е.А.* Оказание медицинской помощи пациентам с акне. Результаты экспертизы качества медицинской помощи // *Вестн. дерматологии и венерологии*. – 2015. – №1. – С. 76-84.
 14. *David C.V., Chira S., Eells S.J., Ladrigan M., et al.* Diagnostic accuracy in patients admitted to hospitals with cellulitis // *Dermatol. Online J. et al.* – 2011. – Vol. 17. – P. 1.
 15. *Barbieri J.S., French B., Umscheid C.A.* Uptake and impact of a clinical diagnostic decision support tool at an academic medical center // *Diagnosis*. – 2015. – Vol. 2, Is.2. – P. 123-127.
 16. *Лукашевич И.П., Дмитрова Е.Д., Киселёва О.А.* Структурно-организованные экспертные и обучающе-диагностические системы в медицине // *Врач и информ. технологии*. – 2007. – №6. – С. 37-42.
 17. *Кобринский Б.А.* Системы поддержки принятия решений в здравоохранении и обучении // *Врач и информ. технологии*. – 2010. – № 2. – С. 39-45.
 18. *Bond W.F., Schwartz L.M., Weaver K.R., Levick D.* Differential diagnosis generators: an evaluation of currently available computer programs // *J. Gen. Intern. Med.* – 2012. – Vol. 27. – P. 213-219.
 19. *Segal M.M., Williams M.S., Gropman A.L., Torres A.R.* Evidence-based decision support for neurological diagnosis reduces errors and unnecessary workup // *J. Child. Neurol.* – 2014. – Vol. 29. – P. 487-492.
 20. *Раводин Р.А., Раводина Ю.В.* Программа для ЭВМ «Интеллектуальная медицинская система «LOGODERM» для диагностики, самодиагностики кожных и венерических заболеваний и обучения врачей-дерматовенерологов» // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2015661682 от 03 ноября 2015 г.
 21. *Раводин Р.А.* Создание онтологии при проектировании систем интеллектуальной поддержки врачебных решений в дерматовенерологии // *Проблемы медицинской микологии*. – 2013. – Т. 15, №1. – С. 3-7.

Поступила в редакцию журнала 12.09.2016

Рецензент: Т.В. Медведева



РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ТЯЖЕЛЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ МИКОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН

¹Кемайкин В.М. (руководитель отдела)*, ¹Табынбаев Н.Б. (председатель правления), ¹Худайбергенова М.С. (главный эксперт по клинической фармакологии), ¹Олифинович А.А. (старший ординатор- гематолог), ¹Абдрахманова Л.М. (начальник отдела медицинского планирования и управления движением пациентов), ²Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

¹ Национальный научный центр онкологии и трансплантологии, Астана, Казахстан; ² Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии), Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2016

Впервые провели оценку распространенности тяжелых и хронических микотических заболеваний в Республике Казахстан с помощью модели, предложенной организацией LIFE (Leading International Fungal Education). Расчет выполняли по состоянию на 2015 г. Были изучены опубликованные результаты исследований микозов в Казахстане, 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 296 273 (1,7% населения), из них острых микотических заболеваний – 14 401 случаев, хронических – 281 872. Наиболее распространены: хронический рецидивирующий кандидозный вульвовагинит (273 258), микозы волосистой части головы (11 847) и рецидивирующий кандидоз полости рта (5 814). По результатам исследования выявили значительную распространенность микозов в Республике Казахстан, что обуславливает необходимость более глубокого изучения их эпидемиологических и клинических особенностей, а также совершенствование мер профилактики.

Ключевые слова: LIFE PROGRAM, микозы, микотические заболевания, Республика Казахстан

PREVALENCE OF SEVERE AND CHRONIC MYCOTIC DISEASES IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

¹Kemaikin V.M. (head of the department), ¹Tabinbaev N.B. (chairman), ¹Khudaibergenova M.C. (chief expert in clinical pharmacology), ¹Olifirovich A.A. (hospital physician - hematologist), ¹Abdrakhmanova L.M. (head of the department of health planning and movement of patients control), ²Klimko N.N. (head of the chair)

¹ National scientific center for oncology and transplantology, Astana, Kazakhstan; ² North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (chair of clinical mycology, allergology and immunology), St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2016

For the first time assessed the prevalence of severe and chronic fungal diseases in Republic of Kazakhstan with a model proposed by LIFE (Leading

* Контактное лицо: Кемайкин Вадим Матвеевич, e-mail: hematology.astana@gmail.com

International Fungal Education) organization. Calculation was carried out on conditions of 2015. Published results of studying mycoses in Kazakhstan 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 was 296 273 (1,7% of population). There were 14 401 cases of acute mycotic diseases, and chronic – 281 872. The most frequent were chronic recurrent vulvovaginal candidiasis (273 258 cases), scalp mycoses (11847) and relapsed oral candidiasis (5814). Results of investigation indicate significant prevalence of mycoses in the Republic of Kazakhstan 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 Kazakhstan

ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия микозы стали важной клинической проблемой. По данным ВОЗ, около 1/3 населения Земли страдает грибковыми заболеваниями [1, 2]. В некоторых странах грибковыми инфекциями поражено до 40% населения. Некоторые инфекции можно встретить повсеместно (кандидозный вагинит), другие более распространены в странах экваториальной Африки (криптококковый менингит при СПИДе) или в промышленно развитых странах (бронхиальная астма с микогенной сенсibilизацией). Актуальна проблема доступности и стоимости диагностики и терапии микозов. Только в США лечение микозов (по данным 2002 года, до внедрения в практику эхинокандинов и триазолов II поколения) обходилось в 2,6 млрд. долларов [1].

Для инвазивных микозов характерна высокая летальность. По данным LIFE, в США при криптококковом менингите она составляет 20%, в странах Африки – более 50%, а ежегодно от этого микоза умирает более 600 000 человек. При инвазивном аспергиллезе летальность – 50%, даже при проведении лечения, и более 99% – при отсутствии такового, от 100 000 до 200 000 летальных исходов ежегодно. Хронический аспергиллез легких – более 3 миллионов заболевших во всем мире, летальность в течение 6 месяцев – 30%, 450000 смертей в год. Пневмоцистная пневмония – 80 000 смертей в год, инвазивный кандидоз – 120 000. Бронхиальная астма с микогенной сенсibilизацией – летальность до 350 000 ежегодно [1].

Основная цель данной работы – оценка распространенности тяжелых и хронических грибковых заболеваний в Республике Казахстан с помощью модели LIFE PROGRAM. Ранее такую оценку не проводили.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ по методике LIFE осуществляли в соответствии с показателями 2015 г. При проведении расчетов использовали опубликованные результаты регистрации микозов в Республике Казахстан (РК). Также, в зависимости от групп риска развития грибковых инфекций, вычисляли возможную распространенность микозов. Использовали методику прогнозирования распространенности микозов в Российской Федерации [2].

Статистические данные о численности и составе населения РК получили из опубликованных данных государственной статистики [3]. На момент проведения анализа население РК составляло 17 670 600 человек.

Оценка заболеваемости микозами волосистой ча-

сти головы основана на статистических данных Министерства здравоохранения и социального развития РК за 2015 г.

Число женщин репродуктивного возраста в РК в 2015 г. составило 4 554 300 [3]. Количество пациенток с хроническим рецидивирующим кандидозным вульвовагинитом рассчитывали по данным международных эпидемиологических исследований, согласно которым это заболевание возникает у 6% женщин [1].

Количество больных ВИЧ/СПИД в РК определили по статистическим данным Министерства здравоохранения и социального развития РК за 2015 г, что составило 38 на 100 000 населения [4]. По данным Smith E. и Orholm M. (1990), Matee M.I. с соавт. (2000), орофарингеальный кандидоз выявляли у 90% ВИЧ-инфицированных пациентов, а кандидозный эзофагит – у 20%.

По результатам исследований Климко Н.Н с соавторами, частота кандидемии и кандидозного перитонита составляет 0,37 на 1000 госпитализированных в стационар пациентов [2]. Общее количество лиц, прошедших стационарное лечение, определили по статистическим данным Министерства здравоохранения и социального развития РК за 2015 г. [4].

Распространенность гематологических заболеваний оценивали по данным Министерства здравоохранения и социального развития РК, на 2015 г. данный показатель составил 433,5 случая на 100 тысяч населения [4].

Риск развития инвазивного аспергиллеза (ИА) у больных с гематологическими заболеваниями рассчитывали по методике Климко Н.Н. с соавт. [2].

Показатели заболеваемости туберкулезом получены из статистических данных Министерства здравоохранения и социального развития РК [4]. Расчет возможных случаев хронического аспергиллеза легких (ХАЛ) проводили по формуле, предложенной Denning D.W. и соавт. [5]: количество ежегодно возникающих случаев туберкулеза легких с наличием полостей (12% от общего количества) x риск развития ХАЛ (22%) + число возникающих случаев туберкулеза без наличия полостей (88% от общей заболеваемости) x риск возникновения ХАЛ у этих пациентов (2%). При этом учитывали, что перенесшие туберкулез пациенты составляют 33% общего количества больных ХАЛ.

Распространенность бронхиальной астмы (БА) получили из статистических данных Министерства здравоохранения и социального развития РК (73,4 на 100 000 человек) [4]. Предполагаемое число больных аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (АБЛА) рассчитывали по формуле, предложенной Denning D.W. и соавторами: 2,5% больных бронхиальной астмой + 15% взрослых больных муковисцидозом [6].

Для оценки больных тяжелой БА с микогенной сенсibilизацией учитывали, что тяжелое течение БА развивается у 10% пациентов, из них микогенная сенсibilизация – у 33% [7].

Для расчета уровня заболеваемости криптококковым менингитом учитывали данные Климко Н.Н. с соавт. (2014 г.), согласно которым криптококковый менингоэнцефалит возникает у 0,44 больных с ВИЧ-инфекцией [2].

Далее, вероятное развитие случаев пневмоцистной пневмонии рассчитывали согласно рекоменда-

циям LIFE – заболевание развивается у 60% пациентов с ВИЧ, получающих антиретровирусную терапию [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Население Республики Казахстан в 2015 г. составило 17 670 600 человек [3], взрослых – 63,5%, женщин – 51,8%.

Результаты по распространенности грибковых заболеваний в РК представлены в таблице.

Таблица

Распространенность грибковых заболеваний в Республике Казахстан (заболеваемость и распространенность по данным за 2015 г.)

	Микотические заболевания	Заболеваемость на 100 000 человек	Количество заболеваний
Острые	Инвазивный аспергиллез	2,2	390
	Инвазивный кандидоз	4,3	765
	Криптококковый менингит	0,06	10
	Мукормикоз	0,09	16
	Пневмоцистная пневмония	7,8	1 373
	Микозы волосистой части головы	66,9	11 847
Итого: 14 401			
Хронические	Хронический рецидивирующий кандидозный вульвовагинит	2 985	273 258
	Рецидивирующий кандидоз полости рта	32,8	5 814
	Рецидивирующий кандидоз пищевода	7,3	1 292
	Хронический аспергиллез легких	4,4	780
	Аллергический бронхолегочный аспергиллез	1,7	306
	Бронхиальная астма с микогенной сенсibilизацией	2,4	422
Итого: 281 872			
Всего: 296 273			

Кандидоз слизистых оболочек

Хронический рецидивирующий кандидозный вульвовагинит (ХРКВ) относится к наиболее распространенным микотическим заболеваниям у женщин [1]. В 2015 г. в Казахстане было 4 554 300 женщин репродуктивного возраста [3]. По данным международных эпидемиологических исследований, ХРКВ возникает у 6% женщин репродуктивного возраста [4]. Отсюда, количество пациенток с этим заболеванием составило 273 258 человек, или 2 985 случаев на 100 000 женщин. Эти показатели сравнимы с данными РФ (2 900/100 000) и европейских стран, например, Венгрии (2 193/100 000) [2, 8].

В 2015 г. в Казахстане было зарегистрировано 6 460 лиц с ВИЧ/СПИД [4], что составляет 38 человек на 100 000 населения. Соответственно, число больных ВИЧ с орофарингеальным кандидозом составило 5 814 (32,8 случаев на 100 000 населения), кандидозным эзофагитом – 1 292 (7,3/100 000). Показатели заболеваемости в РК сравнимы с аналогичными показателями в РФ (42,4 и 9,42 соответственно) [2].

Микозы волосистой части головы

Микроспория и трихофития волосистой части головы в Казахстане были выявлены у 11 847 человек. Заболеваемость из расчета на 100 000 человек составила 66,9. Для сравнения, по данным Министерства здравоохранения РФ, общее количество больных микозами волосистой части головы (микроспорией и трихофитией) в РФ составляла 60 366 человек. Причем, забо-

леваемость микроспорей волосистой части головы составляет 40,8 случаев на 100 000 населения, а трихофитией - 1,8/100 000 [2]. Таким образом, по официальным данным, распространенность микозов волосистой части головы в РК выше, чем в РФ.

Инвазивный кандидоз

Общее количество пациентов в стационарах Казахстана в 2015 г. составило 2 550 816 человек [4]; отсюда общее число больных инвазивным кандидозом в этот период – 765 (4,3 случая на 100 000 населения). Эти данные ниже аналогичного показателя РФ (8,29/100 000) и соответствуют европейским данным [2].

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% [1]. В нашей республике в 2015 г. было 113 больных ОМЛ и, по крайней мере, у 11 из них был ИА. 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 госпитализированных в стационар пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) [1, 9]. В оценке частоты ХОБЛ ориентировались на статистические данные [4] и работы отечественных авторов [2]. В итоге получили 390 больных ИА, или 2,2 случая на 100 000 населения. Этот показатель соответствует данным в РФ (2,27/100000) [2].

Хронический аспергиллез легких (ХАЛ) обычно возникает у пациентов с хроническими заболеваниями органов дыхания (туберкулез, саркоидоз, ХОБЛ, муковисцидоз). Общая заболеваемость туберкулезом в Казахстане в 2015 г. составила 10 296 чел (58,5 /100 000) [4]. Расчет возможных случаев ХАЛ проводили по формуле, предложенной Denning D.W. и соавт. [5], в результате получили 260 больных ХАЛ, возникшим на фоне туберкулеза (1,47 случая на 100 000 населения). Этот показатель оказался значительно ниже аналогичных данных по РФ (36/100 000) [2]. Общее расчетное количество больных ХАЛ в РК составило 780 (4,4 случая на 100 000 населения), что несколько ниже в сравнении со странами Европы: в Великобритании – 8,1/100 000, в Греции – 3,48/100 000, в Дании – 3,05/100 000 населения [9-11].

При расчете частоты АБЛА учитывали следующие исходные данные: количество больных бронхиальной астмой в 2015 г. – 12 478, муковисцидозом – 68. В итоге получили 306 пациентов с АБЛА (1,7/100 000). Больных бронхиальной астмой с микогенной сенсibilизацией (БАМС) в 2015 г. оказалось 408 человек (2,4/100 000). В сравнении с показателями заболеваемости АБЛА и БАМС в РФ (122,52 и 161,65 на 100 000 населения соответственно) данные по Казахстану оказались значительно ниже [2]. Такое незначительное количество пациентов в РК, вероятно, связано с недостаточно от-

работанной диагностикой и регистрацией БА.

Пневмоцистная пневмония и криптококковый менингит

Пневмоцистная пневмония и криптококковый менингит являются основными оппортунистическими микозами у пациентов с ВИЧ-инфекцией. В 2015 г. в Казахстане было зарегистрировано 6 460 больных с ВИЧ/СПИД [4]. Соответственно, расчетное количество пациентов с пневмоцистной пневмонией составило 1 373, а заболеваемость – 7,8 случая на 100 000 населения, что выше аналогичной заболеваемости в РФ (5,65/100 000) [2]. В странах Европы показатели значительно ниже: в Великобритании – 0,94/100 000, в Греции – 0,52/100 000, в Венгрии – 0,05/100 000 [9-11].

Расчетная заболеваемость криптококковым менингоэнцефалитом в Казахстане в 2015 г. составила 10 случаев (0,06/100 000). В России уровень заболеваемости данным микозом оказался значительно выше (0,21/100 000) [2].

Мукормикоз

Частоту мукормикоза в Казахстане в 2015 г. рассчитывали, используя данные о заболеваемости ОМЛ. По данным научной литературы, частота мукормикоза у больных ОМЛ составляет 3,6% [2]. В Казахстане в 2015 г. выявили 113 случаев ОМЛ, соответственно, было 4 случая мукормикоза. По данным Климов Н.Н. с соавт. [2], ОМЛ является фактором риска развития мукормикоза лишь в 25% случаев, в результате общее количество больных этим заболеванием составило 16 человек (0,09/100 000).

Данное исследование в РК проведено впервые. Из полученных показателей следует, что распространенность микозов в Казахстане, так же, как и во всем мире, представляет актуальную проблему.

Необходимо учитывать, что мы оценили не все микотические заболевания, а только те, которые представлены в модели LIFE. Так как это первый опыт проведения такого анализа и представленные результаты являются предварительными, они будут уточнены и дополнены по мере интенсификации эпидемиологических исследований.

ВЫВОДЫ

Согласно проведенным расчетам, в 2015 г. в Республике Казахстан количество больных тяжелыми и хроническими микотическими заболеваниями составило 296 273 (1,7% населения).

Из них, острых микотических заболеваний было 14 401, хронических – 281 872. Наиболее распространены: хронический рецидивирующий кандидозный вульвовагинит (273 258 случаев), микозы волосистой части головы (11 847) и рецидивирующий кандидоз полости рта (5 814).

Необходимы регистрация тяжелых и хронических микотических заболеваний, а также проведение дальнейших эпидемиологических исследований микозов для разработки мер профилактики и оптимизации лечения микотических заболеваний в Республике Казахстан.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. LIFE (Leading international fungal education). Официальный сайт организации – www.LIFE-worldwide.org.
2. 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.
3. Аналитическая справка по основным демографическим показателям <https://www.zakon.kz/171061>.
4. «Здоровье населения Республики Казахстан и деятельность организаций здравоохранения в 2015 году» Министерство здравоохранения и социального развития Республики Казахстан. Статистический сборник. – Астана, 2016 <http://pharm.reviews/images/novosty/stat-sbornik-2015.pdf>.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Sulyokl Z., Sulyok M., Denning D.W., Sinko J. Burden of serious fungal infections in Hungary / Burden of Fungal Infection abstracts submitted to the European Conference on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. The Global Action Fund for Fungal Infections (GAFFI) by fungal disease experts working with the LIFE program. – 2014.
9. Chrdle A., Mallatova N, Denning D.W. Burden of serious fungal infections in the Czech Republic /Burden of Fungal Infection abstracts submitted to the European Conference on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. The Global Action Fund for Fungal Infections (GAFFI) by fungal disease experts working with the LIFE program. – 2014.
10. Arendrup M.C., Benfield T., Denning D.W. Burden of serious fungal infections in Denmark /Burden of Fungal Infection abstracts submitted to the European Conference on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. The Global Action Fund for Fungal Infections (GAFFI) by fungal disease experts working with the LIFE program. – 2014.
11. Pegorie M., Denning D.W., Welfare W. The burden of invasive and serious fungal disease in the UK. /Burden of Fungal Infection abstracts submitted to the European Conference on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. The Global Action Fund for Fungal Infections (GAFFI) by fungal disease experts working with the LIFE program. – 2014.

Поступила в редакцию журнала 10.11.2016

Рецензент: А.В. Соболев



КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ИНВАЗИВНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА ЛЕГКИХ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБИТОРА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ-АЛЬФА

¹Шадривова О.В. (ассистент кафедры)*, ¹Козлова О.П. (ассистент кафедры), ²Десятник Е.А. (врач-миколог), ¹Шагдилеева Е.В. (ассистент кафедры), ²Борзова Ю.В. (главный врач), ²Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ²Игнатъева С.М. (в.н.с.), ¹Трофимова О.А. (старший лаборант кафедры), ¹Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

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

© Коллектив авторов, 2016

В статье представлено описание случая инвазивного аспергиллеза легких у пациента с анкилозирующим спондилоартритом, возникшего на фоне терапии инфликсимабом.

Ключевые слова: анкилозирующий спондилоартрит, иммуносупрессивная терапия, инвазивный аспергиллез, инфликсимаб, фактор некроза опухоли-альфа

A CLINICAL CASE OF INVASIVE ASPERGILLOSIS OF LUNGS ON THE BACKGROUND OF THE USE OF TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA INHIBITOR

¹Shadrivova O.V. (assistant of the chair), ¹Kozlova O.P. (assistant of the chair), ²Desyatnik E.A. (physician-mycologist), ¹Shagdileeva E.V. (assistant of the chair), ²Borzova Y.V. (head of the clinic), ²Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ²Ignatyeva S.M. (leading scientific collaborator), ¹Trofimova O.A. (senior laboratorian of the chair), ¹Klimko N.N. (head of the chair)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹Chair of Clinical Mycology, Allergology And Immunology and ²Kashkin Research Institute of Medical Mycology, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2016

A case of invasive pulmonary aspergillosis emerged during therapy with infliximab in a patient with ankylosing spondyloarthritis has been presented in the article.

Key words: ankylosing spondyloarthritis, factor-alpha inhibitor, immunosuppressive therapy, invasive aspergillosis, infliximab, tumor necrosis

ВВЕДЕНИЕ

Внедрение в широкую клиническую практику антицитокиновых препаратов для лечения аутоиммунных заболеваний (псориаз, ревматоидный артрит, болезнь Крона, системный васкулит, анкилозирующий спондилоартрит и др.) стало одним из ярких достижений медицины последних десятилетий. Основными достоинствами антицитокиновой терапии являются патогенетическая направленность и высокая терапевтическая эффективность. Наряду с этим, применение данных лекарственных средств приводит к снижению иммунной реактивности организма, что повышает риск развития оппортунистических инфекций, в том числе грибковых. В настоящее время нет четких рекомендаций, в том числе и в отечественной литературе, по выявлению и ведению пациентов с инвазивным аспергиллезом (ИА), возникшим на фоне применения блокаторов фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α).

Материалы и методы

Для постановки диагноза ИА использовали клинические и лабораторные критерии, разработанные Европейской организацией по исследованию и лечению рака (EORTC/MSG, 2008) [1]. Пациенту проводили компьютерную томографию (КТ) органов грудной клетки в условиях высокого разрешения, выполняли фибробронхоскопию (ФБС) с забором бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) для дальнейшего серологического и микологического исследований. Лабораторная диагностика ИА состояла из определения наличия галактоманна в сыворотке крови и БАЛ иммуноферментным методом с применением специфической диагностической тест-системы PLATELIA *Aspergillus* (BIO-RAD Laboratories, США). Диагностически значимым считали индекс выше «0,5» в сыворотке крови и выше «1,0» – в БАЛ. Также лабораторная диагностика включала микроскопию и посев БАЛ.

Мы проанализировали данные научной литературы в базах PubMed за последние 10 лет и www.aspergillus.org.uk. При поиске информации использовали следующие ключевые слова: *invasive aspergillosis, immunosuppressive therapy, ankylosing spondylitis, infliximab*.

Описание клинического случая.

Пациент М., 53 г., обратился в микологическую клинику в октябре 2015 г. с жалобами на продуктивный кашель в течение трех недель, периодически – с примесью крови, одышку при незначительной физической нагрузке (подъем на 2 этаж), боли в грудной клетке, повышение температуры тела до 37,5–38,5 °С. Диагноз: Болезнь Бехтерева. Резекция желудка по поводу язвенной болезни в 1990 г. Гипертоническая болезнь I ст., риск сердечно-сосудистых осложнений – 2. Диффузный кардиосклероз. Аспергиллема верхней доли правого легкого?

Из анамнеза известно, что в возрасте 30 лет у пациента впервые появились боли в тазобедренных суставах. В 1987 г. был установлен диагноз «анкилозирующий спондилоартрит (болезнь Бехтерева), смешанный вариант, активность 2 степени, рентгенологическая стадия 4, HLA-B27(+)», по поводу чего наблюдался в ревматологическом центре. В течение первого года заболевания проводили терапию хлорохином, который был отменен в связи с непереносимостью. Далее длительно получал сульфасалазин и нестероидные про-

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

тивовоспалительные препараты с малым эффектом. В 2008 г. отмечали прогрессию заболевания с вовлечением в патологический процесс плечевых суставов, проведена пульс-терапия метилпреднизолоном.

С 2012 г. больного наблюдали в центре антицитокиновой терапии (ЦАЦТ СПбМАПО). В связи с неэффективностью терапии на предыдущем этапе начали лечение ремикейдом (моноклональные антитела к ФНО- α) в дозе 300 мг/сутки 1 раз в 6 недель; получен положительный клинический эффект. При выраженном болевом синдроме пациент продолжал применение нестероидных противовоспалительных препаратов, нежелательных явлений не отмечал. Плановые рентгенологические исследования органов грудной полости – без патологии. Общая длительность регулярного применения препарата составила три года. Последняя инфузия ингибитора ФНО- α – в августе 2015 г., после чего перенес острую респираторную вирусную инфекцию с повышением температуры до фебрильных цифр. На фоне симптоматической терапии достигнута положительная динамика. Рентгенологическое исследование легких не проводили.

С сентября 2015 г. пациента начала беспокоить выраженная слабость, появился инфекционный синдром в виде лихорадки и кашля, в мокроте периодически отмечал примесь крови. На компьютерной томограмме органов грудной клетки (КТ ОГК) в верхней доле левого легкого впервые была выявлена полость с содержимым на фоне массивной инфильтрации. После консультации фтизиатром туберкулезный процесс был исключен. Больной направлен для обследования в микологическую клинику.

При осмотре: состояние средней степени тяжести, температура тела в подмышечной впадине – 38,2 °С. При аускультации над легочными полями жесткое дыхание, в межлопаточном пространстве – ослабленное, слева в лопаточной области и паравертебрально – амфорическое дыхание. Влажные среднепузырчатые хрипы больше слева, а также крепитирующие хрипы и притупление перкуторного звука паравертебрально на уровне VII- IX межреберий и по заднеаксиллярной линии слева на этом же уровне. ЧДД – 24/мин. Границы относительной сердечной тупости в пределах нормы. Тоны сердца ритмичные, патологических шумов нет. Отмечали умеренную тахикардию, пульс = ЧСС = 86/мин. Артериальное давление – 130/80 мм рт.ст.

В клиническом анализе крови: выраженный лейкоцитоз, абсолютный и относительный нейтрофилез, признаки умеренной гипохромной анемии (лейкоциты – $22,2 \cdot 10^9/\text{л}$; нейтрофилы – 91,1% ($20,2 \cdot 10^9/\text{л}$); эритроциты – $3,56 \cdot 10^{12}/\text{л}$; гематокрит – 32,6%; гемоглобин – 109 г/л). Количество лимфоцитов в пределах нормальных значений ($1,6 \cdot 10^9/\text{л}$).

06.11.2015 г. пациенту выполнили фибробронхоскопию (ФБС). Получены положительные тесты на галактоманнан в сыворотке крови и БАЛ (ИОП=0,66 и 4,4 соответственно), при микроскопии БАЛ обнаружена нить септированного мицелия, при культуральном исследовании получен рост *Aspergillus niger* в трех точках посева (Рис. 1).



Рис. 1. Рост *Aspergillus niger* при посеве БАЛ на агаризованную среду Сабуро.

На повторной КТ органов грудной клетки (ОГК) определяли в S1+2 левого легкого крупную воздушную полость с зоной деструкции легочной ткани и наличием содержимого, размеры полости увеличились по сравнению с предыдущим исследованием. В обоих легких выявляли интерстициальные изменения и множественные двусторонние инфильтраты, расположенные преимущественно субплеврально (Рис. 2, 3).

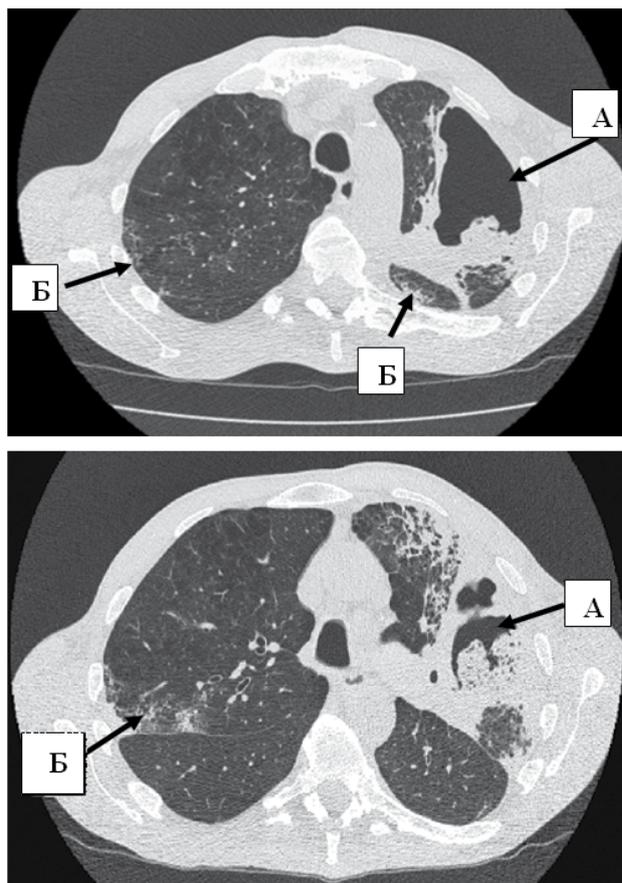


Рис 2, 3. КТ ОГК от 09.11.2015 г. А – деструкция легочной ткани, Б – инфильтраты.

На основании наличия у пациента объективных признаков поражения легких, данных КТ ОГК и результатов серологического и микологического обследования диагностировали инвазивный аспергиллез с поражением легких.

С 10.11.2015 г. больной получал антимикотическую терапию позаконазолом 800 мг в сутки с частичной положительной динамикой: уменьшение кашля, отсутствие примеси крови в мокроте, снижение температуры тела до субфебрильной, стихание болей в грудной клетке. Однако сохранялась одышка при незначительной физической нагрузке, нарастала слабость, периодически беспокоил озноб. В клиническом анализе крови от 17.11.2015 г. отмечали уменьшение лейкоцитоза ($15,6 \cdot 10^9/\text{л}$), тенденцию к нормализации относительного и абсолютного количества нейтрофилов (79% и $12,3 \cdot 10^9/\text{л}$ соответственно). Относительное и абсолютное количество лимфоцитов – в пределах нормы. Сохранялись признаки гипохромной анемии. При биохимическом исследовании наблюдали гипоальбуминемию – 28 г/л.

21.11.2015. наступил летальный исход в результате острой сердечно-сосудистой недостаточности. На вскрытии у больного выявили сливную пневмонию с участками карнификации, абсцедированием в верхней доле левого легкого. Общая длительность антимикотической терапии составила 10 суток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Биологические иммуносупрессоры, такие как моноклональные антитела с антилимфоцитарной активностью, ингибиторы ФНО- α , антиtimoцитарный глобулин и др. находят все большее применение в клинической практике благодаря высокой эффективности в лечении аутоиммунных и онкогематологических заболеваний. Моноклональные антитела к определенным детерминантам иммунокомпетентных клеток или «провоспалительным» цитокинам обеспечивают «точечное» блокирование ключевых моментов воспаления, что позволяет контролировать активность болезни и даже достигать стойкой ремиссии у некоторых категорий больных [2]. Однако применение этих препаратов не только тормозит аутоиммунный воспалительный процесс, но и изменяет естественные иммунные реакции, повышая восприимчивость к инфекции. Известно, что блокаторы ФНО- α ингибируют продукцию интерферона-гамма и других провоспалительных цитокинов, снижают экспрессию рецепторов к патоген-ассоциированным молекулярным паттернам, уменьшают миграцию фагоцитирующих клеток и усиливают апоптоз лейкоцитов, нарушая механизмы клеточного иммунного ответа [3]. Таким образом анти-ФНО- α терапия ассоциируется с повышенным риском инфицирования внутриклеточными микроорганизмами, такими как *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila* и др [4, 5]. При анализе результатов более чем 10-летнего применения ингибиторов ФНО- α отмечали широкий спектр серьезных инфекционных осложнений, связанных с их использованием [3, 6]. При проведении кли-

нических испытаний ингибиторов ФНО- α тяжелые инфекции наблюдали с частотой от 7% до 20% [7, 8]. Наиболее часто в инфекционный процесс вовлекались дыхательные и мочевыводящие пути, а также кожа, мягкие ткани и суставы. Среди тяжелых осложнений были зарегистрированы пневмония, абсцессы и сепсис [9, 10]. Так, риск развития или активации туберкулеза на фоне применения генно-инженерных биологических препаратов возрастает в 5-10 раз [9, 11]. Согласно данным испанского регистра биологических препаратов BIOBADASER, относительный риск туберкулеза составил 7,09 для больных, получавших ингибиторы ФНО- α , по сравнению с контролем [12]. В связи с этим во многих странах разработаны методические рекомендации по скринированию данной группы пациентов для своевременного выявления туберкулезной инфекции [13, 18, 19].

По данным мировых исследований, применение ингибиторов ФНО- α является признанным фактором риска развития оппортунистических инфекций [1, 14, 15]. Самые распространенные среди них – гистоплазмоз (30%), кандидоз (23%) и аспергиллез (23%) [16]. В литературе показаны случаи возникновения инвазивных микозов, в том числе и ИА, на фоне терапии блокаторами ФНО- α [16]. В отечественной литературе нет описания клинических случаев развития ИА на фоне применения биологических иммуносупрессоров.

Однако недостаточно данных относительно эффективности антифунгальной терапии и профилактики у этой когорты больных, а также нет рекомендаций по применению диагностических тестов для выявления ИА. Несмотря на то, что применение биологических иммуносупрессоров во многих случаях улучшает качество жизни пациентов, получающих эти методы лечения, блокада ключевых цитокинов сопряжена с определенными рисками. Поскольку использование этих методов лечения, несомненно, будет возрастать в клинической практике, стоит ожидать увеличения количества больных ИА. Известно, что у пациентов после лучевой или цитостатической терапии, а также с проявлениями «реакции трансплантат против хозяина», имеется повреждение эпителия дыхательных путей, что облегчает адгезию на эпителиальных клетках конидий *Aspergillus* spp. В данных случаях использование ингибиторов ФНО- α может служить «триггером» для аспергиллезной инфекции [17].

ВЫВОДЫ

При появлении признаков инфекции у пациентов на фоне применения ингибиторов ФНО- α необходимо своевременно выполнять диагностические процедуры: КТ органов грудной клетки, определение галактоманна в БАЛ, микроскопическое и культуральное исследование биосубстратов с целью ранней диагностики инвазивного аспергиллеза.

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. Dis. – 2008. – Vol. 46, №12. – P. 1813-1821.
2. Карамеев Д.Е. Вопросы безопасности терапии ингибиторами ФНО- α // Современная ревматология. – 2009. – Т. 3. – С. 36-39.
3. Dias O.M., Pereira D.A., Baldi B.G., et al. Adalimumab-induced acute interstitial lung disease in a patient with rheumatoid arthritis // J. Brasileiro Pneumologia. – 2013. – Vol. 40, №1. – P. 77-81.

4. *Pranatharthy H., Chandrasekar.* Infections in the immunosuppressed patient: an illustrated case-based approach // Oxford University Press. – 2016. – 416 p.
5. *Keyser F.* Choice of biologic therapy for patients with rheumatoid arthritis: the infection perspective // *Current Rheumatology Reviews.* – 2011. – Vol. 7. – P. 77-87.
6. *Kalb R.E., Fiorentino D.F., Lebwohl M.G., et al.* Risk of serious infection with biologic and systemic treatment of psoriasis. Results from the psoriasis longitudinal assessment and registry (PSOLAR) // *JAMA Dermatology.* – 2015. – Vol. 151, №9. – P. 961-969. doi:10.1001/jamadermatol.2015.0718
7. *Lane M.A., McDonald J.R., Zeringue A.L., et al.* TNF-alpha antagonist use and risk of hospitalization for infection in a national cohort of veterans with rheumatoid arthritis // *Medicine (Baltimore).* – 2011. – Vol. 90, №2. – P. 139-145.
8. *Alawneh K.M., Ayesb M.H., Khassawneh B.Y., et al.* Anti-TnF therapy in Jordan: a focus on severe infections and tuberculosis // *Biologics: Targets and Therapy.* – 2014. – Vol. 8. – P.193-198.
9. *Dixon W.G., Watson K., Lunt M., Hyrich K.L., et al.* Rates of serious infection, including site-specific and bacterial intracellular infection, in rheumatoid arthritis patients receiving anti-tumor necrosis factor therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register // *Arthritis Rheumatology.* – 2006. – Vol. 54, Iss. 8. – P. 2368-2376.
10. *Furst D.E.* The risk of infections with biologic therapies for rheumatoid arthritis // *Seminars in Arthritis Rheumatism.* – 2010. – Vol. 39. – P. 327-346.
11. *Буряк И.С., Мучаидзе Р.Д., Данцев В.В., Волков К.Ю.* Туберкулез на фоне терапии ингибитором ФНО- α инфликсимабом по поводу болезни Бехчета // *Русский Медицинский Журнал.* – 2015. – № 25. – С. 1515-1517.
12. *Gomez-Reino J.J., Carmona L., Angel Descalzo M.; Biobadaser Group.* Risk of tuberculosis in patients treated with tumor necrosis factor antagonists due to incomplete prevention of reactivation of latent infection // *Arthritis Rheum.* – 2007. – Vol. 57. – P. 756-761.
13. *Dixon W.G., Hyrich K.L., Watson K.D., et al.* Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR) // *Ann Rheum Dis.* – 2010. – Vol. 69. – P. 522-528.
14. *Kourbeti I.S., Ziakas P., Mylonakis E.* Biologic therapies in rheumatoid arthritis and the risk of opportunistic infections: a meta-analysis // *Clinical Infectious Diseases.* – 2014. – Vol. 58. – P. 1649-1657.
15. *Pagano L., Akova M., Dimopoulos G., et al.* Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients // *J. of Antimicrobial Chemotherapy.* – 2011. – Vol. 66, №1. – P. 5-14.
16. *Tsiodras S., Samonis G., Boumpas D.T., et al.* Fungal infections complicating tumor necrosis factor alpha blockade therapy // *Mayo Clinic Proceedings.* – 2008. – Vol. 83, №2. – P. 181-194.
17. *Nedel W.L., Kontoyiannis D.P., Pasqualotto A.C.* Aspergillosis in patients treated with monoclonal antibodies // *Revista Iberoamericana Micologia.* – 2009. – Vol. 26, №3. – P. 175-183.
18. *Yoo I.K., Choung R.S., Hyun J.J., et al.* Incidences of serious infections and tuberculosis among patients receiving anti-tumor necrosis factor- α therapy // *Yonsei Med J.* – 2014. – Vol. 55. – P. 442-448.
19. *Wang Q, Wen Z, Cao Q.* Risk of tuberculosis during infliximab therapy for inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, and spondyloarthritis: A meta-analysis // *Exp. Ther. Med.* – 2016. – Vol. 12, №3. – P. 1693-1704.

Поступила в редакцию журнала 16.11.2016

Рецензент: М.А. Шевяков



ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО БРОНХОЛЕГОЧНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

¹Козлова Я.И. (доцент кафедры)*, ²Учеваткина А.В. (с.н.с.), ²Фролова Е.В. (зав. лаб.), ²Филиппова Л.В. (с.н.с.), ²Аак О.В. (в.н.с.), ¹Понная В.В. (студент), ¹Соболев А.В. (профессор кафедры), ¹Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

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

© Коллектив авторов, 2016

Аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА) – заболевание легких, обусловленное гиперчувствительностью к *Aspergillus spp.*, которое осложняет течение бронхиальной астмы (БА) и муковисцидоза. По оценкам экспертов, количество больных АБЛА в мире составляет около четырех миллионов человек, в Российской Федерации – сто семьдесят пять тысяч. Иммунопатогенез АБЛА у больных БА изучен недостаточно. Нами проведено иммунофенотипирование лимфоцитов методом проточной цитометрии и исследование продукции цитокинов у больных АБЛА и БА. Установлены однонаправленные изменения: снижение абсолютного и относительного количества NK-клеток, продукции IFN- α и IFN- γ , повышение числа NKT-клеток и общего уровня IgE. У больных АБЛА выявили повышенную продукцию IL-10 на фоне угнетения выработки IFN- γ в ответ на аллергены *A. fumigatus*. Таким образом, уровни цитокинов могут служить прогностическими биомаркерами течения заболевания и быть использованы при мониторинге терапии АБЛА.

Ключевые слова: аллергический бронхолегочный аспергиллез, *Aspergillus spp.*, бронхиальная астма, лимфоциты, цитокины

IMMUNOLOGICAL FEATURES OF ALLERGIC BRONCHOPULMONARY ASPERGILLOSIS IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

¹Kozlova Y.I. (associate professor of the chair), ²Uchevatkina A.E. (senior scientific collaborator), ²Frolova E.V. (head of the laboratory), ²Filippova L.V. (senior scientific collaborator), ²Aak O.V. (leading scientific collaborator), ¹Ponnaya V.V. (student), ¹Sobolev A.V. (professor of the chair), ¹Klimko N.N. (head of the chair)

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

© Collective of authors, 2016

Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) is a lung disease caused by hypersensitivity to *Aspergillus spp.*, which complicates the course of bronchial asthma and cystic fibrosis. According to experts, the number of patients with ABPA in the world is about four million people, in the Russian

Federation – one hundred seventy-five thousand. The immunopathogenesis of ABPA in patients with asthma is studied insufficiently. We carried out the immunophenotyping of lymphocytes by flow cytometry and study of cytokine production in patients with ABPA and asthma. Unidirectional changes were established: the decrease of the absolute and relative amount of NK-cells, production of IFN- α and IFN- γ , increase of the NKT cells number and of the total IgE levels. In patients with ABPA was revealed the increased of IL-10 production on the background of reduce secretion of IFN- γ in response to the allergens of *A. fumigatus*. Thus, the cytokine levels may serve as predictive biomarkers of disease and to be used in monitoring of ABPA therapy.

Key words: allergic bronchopulmonary aspergillosis, *Aspergillus spp.*, bronchial asthma, cytokines, lymphocytes

ВВЕДЕНИЕ

Аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА) – заболевание легких, обусловленное гиперчувствительностью к *Aspergillus spp.*, которое осложняет течение бронхиальной астмы и муковисцидоза [1, 2]. По оценкам экспертов, количество больных АБЛА в мире составляет около четырех миллионов человек, а в Российской Федерации – порядка ста семидесяти пяти тысяч [3, 4]. Для АБЛА характерны разнообразные клинические и рентгенологические проявления, которые обычно сопровождаются неконтролируемой бронхиальной астмой, рецидивирующими легочными инфильтратами, бронхоэктазами и прогрессирующей дыхательной недостаточностью [5]. При обострении АБЛА у пациентов наблюдают лихорадку, свистящие хрипы, кровохарканье и продуктивный кашель с мокротой, содержащей коричневатые-черные слизистые пробки [6-8].

Плесневые грибы *Aspergillus spp.* чрезвычайно широко распространены в окружающей среде и могут быть источником аллергенов как на открытом воздухе, так и внутри помещений. Колонизируя бронхиальное дерево, конидии грибов активируют иммунный ответ. Вначале клетки врожденной иммунной системы начинают распознавать микромицеты посредством паттерн распознающих рецепторов (PRRs), таких как Toll-подобные рецепторы (TLRs), лектиновые рецепторы С-типа (CLRs) и NOD-рецепторы (*Nucleotide Oligomerization Domain* – домен олигомеризации нуклеотидов) [9]. Связывание *Aspergillus spp.* с PRRs активирует внутриклеточные сигнальные пути дендритных клеток, что приводит к выработке хемокинов и цитокинов, ответственных за формирование различных типов адаптивного иммунного ответа. Считают, что в патогенезе АБЛА ведущую роль играет существенное усиление активности Т-хелперов 2 типа, в результате чего развивается эозинофилия, гиперпродукция слизи и переключение синтеза иммуноглобулинов на IgE класс. Впоследствии воспалительная реакция приводит к гиперчувствительности дыхательных путей, которая клинически проявляется типичными астматическими симптомами, такими как приступы бронхиальной обструкции, кашель и одышка. Таким образом, многие исследователи считают, что сенсибилизация к *Aspergillus spp.* у пациентов с БА существенно усугубляет дисбаланс Th2/Th1 и поддерживает хроническое аллергическое воспаление при АБЛА [10, 11]. Однако количество публикаций по этой теме ограничено, а патогенетические механизмы АБЛА требуют дальнейшего изучения.

Цель исследования – изучить иммунологические показатели аллергического бронхолегочного аспергиллеза у больных бронхиальной астмой.

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проспективное исследование включили две группы пациентов. Первую группу составили 11 больных аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (мужчин – 2, женщин – 9; медиана возраста – 38 лет), который развился на фоне тяжелой бронхиальной астмы; вторую группу – 15 больных тяжелой бронхиальной астмой (мужчин – 3, женщин – 12; медиана возраста – 45 лет).

Обследование пациентов включало сбор анамнестических данных (первые симптомы заболевания и время их появления, динамика развития, возможный контакт с плесневыми грибами дома или на работе, наличие аллергических реакций, наследственность по атопии, предшествующая терапия и ее эффективность, и т.д.), а также оценку результатов общеклинических, лабораторных, инструментальных методов диагностики. Для выявления микогенной сенсибилизации и АБЛА всем больным бронхиальной астмой проводили специфическое аллергологическое обследование – кожное тестирование с 6 грибковыми аллергенами: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Candida* («Allergopharma», Германия). В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяли уровень общего IgE (ООО «Полигност», Россия) и специфических IgE (sIgE) к грибковым аллергенам (панель биотинилированных аллергенов «Алкор Био», Россия). Микологическое обследование состояло из микроскопии и культурального исследования образцов респираторных биосубстратов (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж /БАЛ/). При подозрении на АБЛА выполняли компьютерную томографию (КТ) органов грудной клетки. Уровень контроля симптомов и степень тяжести БА выявляли в соответствии с критериями «Глобальной стратегии лечения и профилактики бронхиальной астмы» (GINA, 2014). Диагноз АБЛА устанавливали на основании критериев R. Agarwal et al., 2013 г. [12]. Контрольную группу составили 18 условно здоровых людей (медиана возраста – 37,5 лет, мужчин – 5, женщин – 13).

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводили методом проточной цитометрии с применением проточного цитометра «FC-500» (Beckman Coulter, США) с программным обеспечением CXP Software. Лимфоциты окрашивали моноклональными антителами, мечеными флуорохромами: CD45-FITC, CD4-RD1, CD8-ECD, CD3-PC5, CD19-ECD и CD56-RD1 (Beckman Coulter, США). Для дополнительной характеристики Т-клеточного звена иммунной системы вычисляли иммунорегуляторный индекс (ИРИ) – соотношение CD3+CD4+/CD3+CD8+.

Для исследования спонтанной и индуцированной продукции IFN- γ и IFN- α использовали гепаринизированную кровь, разведенную в 5 раз полной питательной средой (ППС): среда RPMI 1640 с добавлением L-глутамин («Биолот», Россия), 200 мкг/мл гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «Биолот», Россия). Для спонтанной продукции интерферонов в лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл ППС и 100 мкл разведенной в 5 раз крови. Для индуцированной продукции интерферонов в лунки планшета помещали по 100 мкл разведенной в 5 раз крови и, соответственно, добавляли 100 мкл рабочего раствора фитогемагглютина (ФГА) («Sigma», США)

или вирус болезни Ньюкасла (цитолитический титр 1/256, ФГБУ «НИИ гриппа», Россия) в конечной дозе 25 мкг/мл. Планшеты с исследуемыми образцами культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе. Через 24 часа надосадочную жидкость отбирали для исследования спонтанной и индуцированной продукции интерферонов.

С целью изучения антиген-специфической продукции IFN- γ , IL-4 и IL-10 было проведено сравнение способности цельной крови и выделенных мононуклеарных клеток к синтезу цитокинов в ответ на стимуляцию аллергеном *A. fumigatus*. Мононуклеарные клетки крови (МНК) выделяли на градиенте плотности с использованием лимфолита (Lympholyte-H, Cedarlane, США): кровь разводили в 2 раза фосфатно-солевым буфером (ФСБ, «ЭКО сервис», Россия), наслаивали на лимфолит в соотношении 4 : 1,5 и центрифугировали 40 мин при 1500 об/мин. МНК отмывали 2 раза ФСБ и разводили до концентрации 1·10⁶кл/мл ППС.

Для спонтанной продукции цитокинов в лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл ППС и 100 мкл разведенной в 5 раз крови или 100 мкл 1·10⁵ МНК. Для антиген-индуцированной выработки цитокинов к 100 мкл разведенной в 5 раз крови или 1·10⁶ МНК добавляли 100 мкл аллергена *A. fumigatus* («Алкор Био», Россия), разведенного ППС в конечной концентрации 10 мкг/мл. В предварительных экспериментах были определены оптимальная доза аллергена и сроки культивирования клеток. Через 144 часа (6 суток) инкубации клеток надосадочную жидкость аликвотировали и хранили при -20 °С до проведения анализа.

Интерфероны и цитокины в надосадочной жидкости выявляли с помощью иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем («Вектор-Бест», Россия) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Полученные оптические плотности определяли на иммуноферментном анализаторе Human (Германия). Расчеты количества цитокинов проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Количество выражали в пг/мл.

Полученные в процессе исследования данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA 10. Данные представляли в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей (25-го и 75-го процентилей, Lq и Hq). Для оценки различий между независимыми выборками применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Достоверными различиями сравниваемых параметров считали значения $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время описаны две группы риска развития АБЛА: бронхиальная астма и муковисцидоз. По данным международных исследований, частота развития АБЛА у больных бронхиальной астмой составляет 12,9% [13], муковисцидозом – 8,9% [14]. Для данных категорий пациентов характерны нарушения защитных механизмов слизистых оболочек дыхательных путей, в том числе дефекты мукоцилиарного клиренса и функции эпителиальных клеток [15]. Все это облегчает колонизацию дыхательных путей грибковыми спорами. У всех больных АБЛА, включенных нами в исследование, заболевание сформировалось на фоне атопической бронхиальной астмы. Также у всех пациентов

этой группы была отягощенная наследственность по атопии. Кроме того, на основании данных анамнеза, у шести человек выявлен контакт с плесневыми грибами дома или на работе. АБЛА – хроническое рецидивирующее заболевание, которое протекает с чередованием периодов обострений и ремиссий. С момента установления диагноза средняя продолжительность АБЛА у обследованных нами больных составила 4,7 лет.

Микогенная сенсibilизация – важный этап в патогенезе АБЛА. Поэтому обязательным диагностическим критерием служит положительная кожная проба и/или выявление sIgE к *Aspergillus* spp. в сыворотке крови > 0,35 МЕ/мл [1, 3, 5, 12]. В группе АБЛА у всех пациентов кожная проба с аллергеном *A. fumigatus* была положительная, уровень sIgE к *Aspergillus* spp. повышен – Ме 4,59 (0,48 ÷ 13,1) МЕ/мл. В группе больных тяжелой бронхиальной астмой получены отрицательные результаты кожного тестирования с грибковыми аллергенами, уровень sIgE к *Aspergillus* spp. составил Ме 0,02 (0,01 ÷ 0,02) МЕ/мл и был достоверно ниже, чем в группе АБЛА (p=0,0006).

Известно, что у больных АБЛА уровень общего IgE может достигать чрезвычайно высоких значений, отражая продолжительную аллергенную стимуляцию гуморального иммунного ответа [5, 12]. В ходе нашего исследования по уровню данного показателя в группе пациентов с АБЛА и тяжелой БА получены достоверные различия (p=0,0002). У больных АБЛА установлено значительное повышение уровня общего IgE – Ме 963 (954 ÷ 1691) МЕ/мл, во второй группе этот показатель был значительно ниже – Ме 68 (10,0 ÷ 600,0) МЕ/мл.

В то время как многочисленные современные исследования посвящены изучению иммунологических изменений, которые лежат в основе патогенеза БА [16, 17], работ, направленных на оценку количества и функциональной активности лимфоцитов при развитии АБЛА, недостаточно. Сравнительная характеристика иммунологических показателей больных АБЛА, тяжелой БА и лиц контрольной группы представлена в таблице 1.

Таблица 1

Сравнительная характеристика иммунологических показателей у больных бронхиальной астмой и аллергическим бронхолегочным аспергиллезом

Группы / Показатели	Больные АБЛА, n=11	Больные БА, n=15	Условно здоровые лица, n=18
	Ме (Lq-Hq)		
Возраст, лет	38,0 (30,0÷61,0)	45,0 (25,0÷54,0)	37,5 (33,0÷45,0)
Лейкоциты (x10 ⁹ /л)	6,8 (6,2÷8,5)*	6,6 (5,2÷8,5)	5,6 (5,2÷6,6)
Лимфоциты (x10 ⁹ /л)	1,86 (1,34÷2,45)	1,97 (1,55÷2,94)	2,22 (1,89÷2,46)
CD3+CD19- (%)	78,0 (67,0÷79,0)	78,0 (70,0÷82,0)	75,5 (72,0÷79,0)
CD3+CD19- (x10 ⁹ /л)	1,49 (0,93÷1,77)	1,56 (1,19÷2,48)	1,67 (1,37÷1,91)
CD3+CD4+ (%)	46,0 (39,0÷54,0)	46,0 (40,0÷54,0)	44,5 (39,0÷46,0)
CD3+CD4+ (x10 ⁹ /л)	0,91 (0,62÷1,10)	0,92 (0,67÷1,35)	0,98 (0,81÷1,13)
CD3+CD8+ (%)	25,0 (22,0÷31,0)	24,0 (19,0÷36,0)	26,5 (22,0÷31,0)
CD3+CD8+ (x10 ⁹ /л)	0,54 (0,36÷0,67)	0,64 (0,41÷0,80)	0,56 (0,40÷0,74)
CD3-CD19+ (%)	9,0 (8,0÷13,0)	11,0 (9,0÷18,0)	11,0 (10,0÷12,0)
CD3-CD19+ (x10 ⁹ /л)	0,16 (0,12÷0,29)	0,25 (0,17÷0,35)	0,24 (0,20÷0,28)
CD3+CD4+CD25+ (%)	2,9 (2,3÷4,2)	2,7 (1,9÷5,0)	3,0 (2,2÷4,1)
CD3+CD4+CD25+ (x10 ⁹ /л)	0,05 (0,04÷0,12)	0,06 (0,04÷0,10)	0,06 (0,05÷0,08)
CD3-CD56+ (%)	9,0 (6,3÷16,0)	9,0 (6,0÷11,0) *	11,0 (10,0÷14,0)
CD3-CD56+ (x10 ⁹ /л)	0,17 (0,12÷0,28)	0,17 (0,14÷0,24)*	0,25 (0,21÷0,29)
CD3+CD56+ (%)	4,2 (2,0÷5,4)	3,4 (1,5÷6,5) *	1,6 (1,1÷3,8)
CD3+CD56+ (x10 ⁹ /л)	0,09 (0,03÷0,11)	0,09 (0,04÷0,12)*	0,04 (0,02÷0,07)

ИРИ	1,6 (1,3÷2,5)	1,9 (1,2÷2,6)	1,6 (1,4÷2,4)
IFN-α инд (пг/мл)	166,0 (119,0÷234,0)*	106,0 (71,0÷160,0)*	246,0 (192,0÷387,0)
IFN-γ сп (пг/мл)	22,0 (6,0÷39,0)	2,0 (0,0÷11,0)	12,0 (5,0÷16,0)
IFN-γ инд (пг/мл)	668,0 (328,0÷1276,0)*	938,0 (616,0÷1900,0)	1935,5 (1822,0÷2080,0)

Примечание. Представлены медианные значения с интерквартильным размахом 25%÷75%; Ме (Lq-Hq)

*- достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

При иммунофенотипировании лимфоцитов у больных АБЛА и БА не выявили различий в относительном и абсолютном числе как Т-лимфоцитов в целом (CD3+CD19-), так и основных их субпопуляций (CD3+CD4+, CD3+CD8+), по сравнению с условно здоровыми лицами. Не установлено изменений в экспрессии маркера ранней активации (α-цепи рецептора интерлейкина-2) на Т-хелперах (CD3+CD4+CD25+) в обеих группах обследованных лиц. Полученные данные совпадают с результатами других исследований [18], что предполагает необходимость более углубленного изучения субпопуляций Т-лимфоцитов, которые включают в себя Th1, Th2, Th17, на основе уникального сочетания хемокиновых рецепторов с помощью многоцветного цитометрического анализа.

Особенностью больных БА, по сравнению с контрольной группой, было снижение абсолютного и относительного количества естественных киллеров или НК-клеток (Natural Killer cell) (CD3-56+) и повышение числа NKT-клеток (Natural Killer T-cell) (CD3+56+). В группе больных АБЛА снижение числа естественных киллеров отмечали в 72% случаев, а повышение количества NKT-клеток – в 56%. Однако из-за большого разброса данных статистически значимых различий с условно здоровыми лицами не наблюдали. Известно, что НК-клетки являются ранними продуцентами IFN-α и IFN-γ, участвующими в поляризации иммунного ответа по Th1 типу [19]. В нашем исследовании установлено ослабление способности клеток крови к продукции IFN-α в обеих группах пациентов, достоверное снижение секреции IFN-γ у больных АБЛА и тенденция к снижению митоген-индуцированной продукции данного цитокина у больных БА. NKT-клетки рассматривают как неклассическую субпопуляцию Т-лимфоцитов. Уровень тех или иных цитокинов, продуцируемых NKT-клетками, может изменяться в зависимости от вида презентуемого антигена [20]. Считают, что при развитии аллергического воспалительного процесса NKT-клетки поддерживают активацию Th2, которые играют важную роль в патогенезе аллергических заболеваний.

В ходе исследования иммунологических показателей больных БА и АБЛА выявили однонаправленные изменения: снижение абсолютного и относительного количества НК-клеток, продукции IFN-α и IFN-γ, повышение числа NKT-клеток и общего уровня IgE. Таким образом, полученными данными подтверждено развитие у больных АБЛА и БА хронического аллергического воспалительного процесса. Тем не менее, этого недостаточно для оценки особенностей специфического иммунного ответа.

Цитокины, являясь трансммиттерами межклеточных взаимодействий, не только влияют на миграцию, активацию и выживаемость клеток, участвующих в воспалительной реакции, но и меняют приоритет эф-

факторов аллергических реакций и вызывают морфологические изменения в легочной ткани. На следующем этапе исследования провели сравнительный анализ уровней патогенетически значимых цитокинов, продуцируемых клетками цельной крови и МНК, в ответ на инкубацию с аллергеном *A. fumigatus*. Результаты определения цитокинов представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Показатели цитокинового статуса у больных бронхиальной астмой и аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (кровь 144 часа)

Показатели Группы	IFN-γ (пг/мл)		IL-10 (пг/мл)	
	спонтанная	<i>A.fumigatus</i>	спонтанная	<i>A.fumigatus</i>
	Me(Lq-Hq)		Me(Lq-Hq)	
Больные АБЛА (n=7)	7,2 (3,5÷22,0)	27 (16,4÷59,0)	21,6 (15,7÷32)	72,2 (44,8÷108,2)*
Больные БА (n=6)	20,8 (20÷26)	28 (21÷41)	26,4 (24÷54)	8,2 (2÷25,2)
Контрольная группа (n=5)	20 (18÷24)	55 (40÷55)	20 (14÷45)	17 (8÷45)

Примечание: Представлены медианные значения с интерквартильным размахом 25%÷75%; Me(Lq-Hq)

* - достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой (p<0,05);

** - достоверность различий показателей между группами (p<0,05).

Таблица 3

Показатели цитокинового статуса у больных бронхиальной астмой и аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (МНК 144 часа)

Показатели Группы	IFN-γ (пг/мл)		IL-10 (пг/мл)	
	спонтанная	<i>A.fumigatus</i>	спонтанная	<i>A.fumigatus</i>
	Me(Lq-Hq)		Me(Lq-Hq)	
Больные АБЛА (n=7)	4,0 (2÷12,0)	25,5 (2÷34,6)	56 (15,2÷82)	57,0 (33,0÷87,0) *
Больные БА (n=6)	18,9 (8,2÷30,4)	5,8 (2÷26,6)*	52,5 (28,8÷146,0)*	42,6 (26,0÷94,0)
Контрольная группа (n=5)	34 (2÷41)	40 (19,8÷78)	18 (16÷26)	19 (16÷21)

Примечание: Представлены медианные значения с интерквартильным размахом 25% ÷ 75% - Me(Lq-Hq);

* - достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой (p < 0,05);

** - достоверность различий показателей между группами (p<0,05).

Нами, как и другими исследователями, не установлена способность аллергенов *A. fumigatus* стимулировать клетки крови к продукции IL-4 [21]. Предполагают, что это связано с тем, что IL-4 в большей степени участвует в инициации иммунного ответа по Th2 типу, в то время как IL-13 и IL-5 поддерживают дальнейшую поляризацию иммунного ответа [1]. При сравнении способности МНК и клеток цельной крови к спонтанной продукции IFN-γ и IL-10 не отмечали достоверных различий между исследуемыми группами. Стимуляция МНК и клеток периферической крови аллергеном *A. fumigatus* в течение 144 часов выявила различия в цитокиновом профиле между больными и условно здоровыми лицами. В контрольной группе грибковый аллерген стимулировал лимфоциты к продукции IFN-γ, но не к выработке IL-10, что подтверждено индексами стимуляции (ИС). ИС вычисляли как соот-

ношение индуцированной и спонтанной продукции цитокинов. ИС IFN-γ и IL-10 имели сходные значения: 2,75 и 1,0 – для клеток крови, 1,49 и 0,79 – для МНК соответственно. Полученные нами данные совпадают с результатами других авторов, которые оценивали способность клеток крови человека к продукции различных цитокинов в ответ на антигены *Aspergillus* spp. [22]. Показано, что у здоровых людей чаще выявляют *Aspergillus*-специфичные клоны Т-лимфоцитов, вырабатывающие IFN-γ и редко секретирующие IL-4, IL-17 и IL-10.

Не установлено достоверных отличий между спонтанной и индуцированной грибковым аллергеном продукцией IFN-γ и IL-10 у больных БА. Полученные данные могут быть показателем выраженной активации клонов Т-лимфоцитов, специфичных к другим аэроаллергенам, но не к микросплетам. Это подтверждено отсутствием у пациентов с БА sIgE к *A. fumigatus*. В нашем исследовании у больных АБЛА антиген-специфическая стимуляция выявила достоверно более высокую продукцию МНК и клетками периферической крови IL-10, по сравнению со значениями в группе контроля и БА, и тенденцию к снижению выработки IFN-γ.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что оценка продукции цитокинов клетками цельной крови и выделенными МНК имела сходную информативность. Это является подтверждением возможности использования цельной периферической крови для изучения цитокинового профиля больных АБЛА.

По данным цитокинового профиля пациентов с АБЛА отмечали усиление активности специфических к *A. fumigatus* регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), что характерно для включения механизмов ограничения воспалительного процесса. Однако высокие уровни sIgE к *A. fumigatus* служат показателем того, что противовоспалительный цитокин IL-10 преимущественно подавляет продукцию IFN-γ, и это способствует преобладанию Th2-типа иммунного ответа у больных АБЛА. Полученные нами данные совпадают с результатами Becker K.L. и соавторов, которые установили, что пациенты с АБЛА, в отличие от больных БА, имели значительно более высокое соотношение *A. fumigatus* – специфичных Th2/Th1 [21].

Полученные данные согласуются с мнением, что именно сенсibilизация к *Aspergillus* spp. играет значительную роль в иммунопатологических механизмах, лежащих в основе патогенеза АБЛА. Следовательно, уровни цитокинов могут служить прогностическими биомаркерами течения заболевания и быть использованы при мониторинге терапии АБЛА.

ВЫВОДЫ

При изучении иммунологических показателей больных АБЛА и БА установлены однонаправленные изменения: снижение абсолютного и относительного количества НК-клеток, продукции IFN-α и IFN-γ, повышение числа NKT-клеток и общего уровня IgE.

АБЛА у больных БА формировалось на фоне повышенной продукции IL-10 при угнетении выработки IFN-γ в ответ на аллергены *A. fumigatus*.

Уровни IFN-γ и IL-10, индуцированных *Aspergillus* spp., могут быть прогностическими биомаркерами те-

чения АБЛА, которые можно применять для оценки эффективности лечения этого заболевания.

Для изучения цитокинового профиля больных

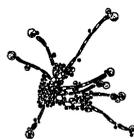
АБЛА возможно использовать не только выделенные мононуклеарные клетки, но и цельную периферическую кровь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agarwal R. Severe asthma with fungal sensitization // *J. Fungi*. – 2016. – Vol. 2. – P.13-18.
2. Moss R.B. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and *Aspergillus* infection in cystic fibrosis // *Curr. Opin. Pulm. Med.* – 2010. – Vol. 16. – P. 598-603.
3. 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.
4. Клишко 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. 3-9.
5. Hogan C., Denning D.W. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and related allergic syndromes // *Semin Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – Vol. 32. – P. 682-692.
6. Agarwal R., Chakrabarti A. Clinical manifestations and natural history of allergic bronchopulmonary aspergillosis / In: *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. A.C. Pasqualotto (ed). – Springer, 2010. – P. 707-724.
7. Agarwal R., Gupta D., Aggarwal A.N., et al. Clinical significance of hyperattenuating mucoid impaction in allergic bronchopulmonary aspergillosis: an analysis of 155 patients // *Chest*. 2007. – Vol. 132. – P. 1183-1190.
8. Козлова Я.И., Соболев А.В., Фролова Е.В. и др. Аллергический бронхолегочный аспергиллез у больных бронхиальной астмой // *Российский аллергологический журнал*. – 2015. – №2. – С. 37-46.
9. Gresnigt M.S., Netea M.G., van de Veerdonk F.L. Pattern recognition receptors and their role in invasive aspergillosis // *Ann. N-Y Acad. Sci.* – 2012. – Vol. 1273. – P. 60-67.
10. Chai L.Y., van de Veerdonk F., Marijnissen R.J., et al. Anti-*Aspergillus* human host defense relies on type 1 T helper (Th1), rather than type 17 T helper (Th17), cellular immunity // *Immunology*. – 2010. – Vol. 130. – P. 46-54.
11. Bouzani M., Ok M., McCormick A., et al. Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN-gamma release // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 187. – P. 1369-1376.
12. 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.
13. Agarwal R., Aggarwal A.N., Gupta D., Jindal, S.K. *Aspergillus* hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma: Systematic review and meta-analysis // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2009. – Vol. 13. – P. 936-944.
14. Maturu V.N., Agarwal R. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: Systematic review and meta-analysis // *Clin. Exp. Allergy*. – 2015. – Vol. 45. – P. 1765-1778.
15. Chaudhary N., Datta K., Askin F.B., et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates epithelial cell response to *Aspergillus* and resultant pulmonary inflammation // *J. Respir. Crit. Care Med.* – 2012. – Vol. 185. – P. 301-310.
16. Broide D. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2008. – Vol. 121. – P. 560-70.
17. Williams C. M., Hubeau S., Meara H. Cytokine Pathways in Allergic Disease // *Toxicologic Pathology*. – 2012. – Vol. 40. – P. 205-215.
18. Рябова Л.В., Зурочка А.В., Хайдуков С.В. Местные и системные иммунные механизмы хронического воспаления у больных бронхиальной астмой легкой степени тяжести // *Медицинская Иммунология*. – 2009. – Т. 11, № 2-3. – С. 169-176.
19. Акинфиева О.В., Бубнова Л.Н., Бессмельцев С.С. NKT-клетки: Характерные свойства и функциональная значимость для регуляции иммунного ответа // *Онкогематология*. – 2010. – №4. – С. 39-46.
20. Margalit A., Kavanagh K. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2015. – Vol. 39. – P. 670-687.
21. Becker K.L., Gresnigt M S., Smeekens S.P., et al. Pattern recognition pathways leading to a Th2 cytokine bias in allergic bronchopulmonary aspergillosis patients // *Clinical & Experimental Allergy*. – 2014. – Vol. 45. – P. 423-437.
22. Jolink H., Meijssen I.C., Hagedoorn R.S. et al. Characterization of the T-cell mediated immune response against the *Aspergillus fumigatus* proteins Crf1 and catalase 1 in healthy individuals // *J. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 208. – P. 847-856.

Поступила в редакцию журнала 23.11.2016

Рецензент: В.С. Митрофанов



РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ИНВАЗИВНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА ЛЁГКИХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

¹Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой), ¹Босак И.А. (с.н.с.), ¹Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ¹Выборнова И.В. (с.н.с.), ¹Филиппова Л.В. (с.н.с.), ¹Учеваткина А.Е. (с.н.с.), ¹Степанова А.А. (зав. лаб.), ¹Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.), ¹Чилина Г.А. (зав. лаб.), ²Еремина Н.В. (руководитель проекта)

¹ НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург; ² ООО «Панацела Лабс», Москва, Россия

© Коллектив авторов, 2016

Инвазивный аспергиллез легких (ИАЛ) – тяжелая микотическая инфекция, развивающаяся у пациентов с иммуносупрессией после длительного применения кортикостероидов или цитостатических препаратов. В статье представлены результаты разработки модели ИАЛ при интраназальном способе заражения мышей линии BALB/C в состоянии нейтропении после введения цитостатического препарата (циклофосфан). Оптимизирована схема введения циклофосфана для индукции и поддержания нейтропении, выбран штамм возбудителя и определена эффективная заражающая доза, получено культуральное и гистологическое подтверждение развития инфекции.

Ключевые слова: *Aspergillus fumigatus*, инвазивный аспергиллез легких, нейтропения, цитостатическая полихимиотерапия, штамм, экспериментальная модель

ELABORATION OF INVASIVE PULMONARY ASPERGILLOSIS EXPERIMENTAL MODEL USING *ASPERGILLUS FUMIGATUS* CLINICAL ISOLATES

¹Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the chair), ¹Bosak I.A. (senior scientific collaborator), ¹Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ¹Vybornova I.V. (scientific collaborator), ¹Filippova L.V. (senior scientific collaborator), ¹Uchevatkina A.E. (senior scientific collaborator), ¹Stepanova A.A. (head of the laboratory), ¹Avdeenko Yu.L. (senior scientific collaborator), ¹Chilina G.A. (head of the laboratory), ²Eremina N.V. (project manager)

¹ Kashkin Research Institute of Medical Mycology of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg; ² ООО «Panacela labs», Moscow, Russia

© Collective of authors, 2016

Invasive pulmonary aspergillosis (IPA) is a severe fungal disease observed in immunocompromised patients after prolonged corticosteroid or cytostatic therapy. We present results of elaboration of IPA model based on

* Контактное лицо: Богомолова Татьяна Сергеевна, Тел.: (812) 510-62-69

the intranasal inoculation of cyclophosphane-induced neutropenic BALB/C mice. Original scheme of cyclophosphane injection is described. Optimal fungal strain and inoculation dose were selected. Development of the infection was confirmed by culture and histological studies.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, cytostatic polychemotherapy, experimental model, invasive pulmonary aspergillosis, neutropenia, strain

Грибы рода *Aspergillus* широко распространены в природе: в почве, на остатках гниющих растений. Условно-патогенные *Aspergillus* spp., прежде всего, *A. fumigatus* и *A. flavus*, являются частыми возбудителями нозокомиальных грибковых инфекций [Елинов Н.П. и др. // Проблемы мед. микологии. – 2002. – Т. 4, №1]. Споры (конидии) из-за их небольшого размера (диаметр 2-3 мкм) легко могут проникать в альвеолы легких. У здоровых людей конидии эффективно элиминируются макрофагами и нейтрофилами, у иммунокомпрометированных – ингаляция конидий аспергиллов может привести к развитию инфекции; при этом происходит трансформация конидий (прорастание) в гифы, которые поражают ткань.

Методы лечения микотических заболеваний не всегда достаточно эффективны. Общая и атрибутивная летальность при инвазивных микозах выше, чем при аналогичных бактериальных или вирусных инфекциях. Возрастает частота случаев развития устойчивости возбудителей ИАЛ к противогрибковым препаратам, в том числе новым [1].

Количество противогрибковых препаратов, эффективных в отношении возбудителей аспергиллеза, на рынке ограничено, при этом отечественных препаратов нет. В связи с этим необходимо продолжать научные исследования в области создания новых эффективных антифунгальных препаратов. Разработка и доклинические испытания новых антимикотических препаратов невозможны без использования экспериментальных моделей на лабораторных животных. Отметим, что отечественные руководства по доклиническому изучению новых фармакологических веществ не содержат описаний экспериментальных *in vivo* моделей инвазивных микозов лёгких [2]. В зарубежных научных источниках приведены различные модели экспериментального ИАЛ с применением разных схем индукции нейтропении и методов заражения животных [3-6], однако, их эффективность недостаточно апробирована. Представляется актуальным создание модели ИАЛ с выбором оптимальной схемы индукции нейтропении и использованием штаммов *A. fumigatus*, выделенных от пациентов в России.

Цель работы – разработать экспериментальную модель инвазивного аспергиллеза легких, вызванного наиболее частым возбудителем – *A. fumigatus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Для проведения исследования были выбраны самцы линейных мышей BALB/C весом 18-22 г [4]. Животные были адаптированы/акклиматизированы в лаборатории в течение 7 дней.

Выбор схемы введения циклофосфана. С целью достижения необходимой и стабильной нейтропении было проведено сравнение трёх схем введения циклофосфана животным [4-7] с определением количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы крови. Подсчет форменных элементов крови проводили в камере Горяева в мазках крови мышей, предварительно окра-

шенных по Паппенгейму-Крюкову. Лейкоцитарную формулу рассчитывали на 200 лейкоцитов.

Для выбора оптимальной схемы индукции нейтропении сформировали три группы животных:

Группа 1 – внутривенно вводили циклофосфан в дозе 200 мг/кг в -3, 0 и 1 дни эксперимента (0 день – день заражения).

Группа 2 – внутривенно вводили циклофосфан в дозе 150 мг/кг в -3, 0 и 3 дни эксперимента.

Количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу периферической крови животных обеих групп определяли непосредственно перед первым введением циклофосфана, затем каждые трое суток в течение 14 дней.

Группа 3 – внутривенно вводили циклофосфан в дозе 150 мг/кг в -3, 0, 4-й и 8-й дни эксперимента. Определение количества лейкоцитов и лейкоцитарную формулу периферической крови экспериментальных животных проводили:

- перед первым введением циклофосфана (-3 день эксперимента);

- через 4 часа после второго введения циклофосфана (0 день эксперимента);

- далее перед введением циклофосфана на 4-й и 8-й дни эксперимента.

Культуры грибов. В исследовании использовали 5 штаммов *A. fumigatus*: РКПГ F 1172, 1248, 1267, 1277, 1384 из «Российской коллекции патогенных грибов» НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Все штаммы *A. fumigatus* были выделены из бронхоальвеолярного лаважа пациентов с инвазивным аспергиллезом легких; видовую идентификацию аспергиллов подтверждали методом ДНК-секвенирования.

Процедура заражения животных. Для заражения животных готовили взвеси конидий из трехсуточных культур *A. fumigatus* на агаризованной среде Сабуро в чашках Петри, смывая с поверхности стерильным 0,85% раствором хлорида натрия. После количественного подсчета конидий в камере Горяева густоту взвеси доводили до концентраций $1 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^7$, $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Животным, наркотизированным диэтиловым эфиром и подготовленным к заражению (введение циклофосфана по схеме), интраназально вводили 0,05 мл взвеси конидий грибов.

В целях получения сведений об эффективности используемого метода заражения в исследование была введена контрольная группа из 5-ти мышей, которым интраназально вводили 0,05 мл взвеси конидий штамма *A. fumigatus* РКПГ F 1267 концентрацией $4,2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. В качестве критерия оценки эффективности метода заражения использовали результаты культурального исследования легких лабораторных животных (количество жизнеспособных клеток микромицета на грамм ткани легкого) через 2 часа после интраназального заражения.

Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 дней, ежедневно регистрировали количество погибших мышей.

Подтверждение развития инвазивного аспергиллеза легких. У погибших животных в день гибели извлекали оба легких для гистологического и культурального исследований. У выживших животных материал для гистологического и культурального исследований отбирали в день окончания эксперимента (14-й день).

Для гистологического исследования кусочки легкого мыши фиксировали в 10% растворе забуференного формалина. Материал проводили через серию изопропилового спирта и гистомикса с помощью гистологического процессора марки Tissue-Tek® VIP. Затем образец, пропитанный гистомиксом, переносили в заливочную станцию для изготовления парафиновых блоков, с которых на санном микротоме Slide 2003 получали серийные срезы толщиной 3 мкм. После удаления гистомикса ксилолом срезы окрашивали гематоксилин-эозином, по Гомори-Грокотт и PAS-методом. После заключения в среду Bio Mount срезы исследовали с фотофиксацией и морфометрией в световом микроскопе Leica DM LB2 (Германия) при увеличениях 100х, 400х.

Для культурального исследования биоматериал от каждого животного изучали следующим способом. Легкое взвешивали в стерильных условиях и измельчали в гомогенизаторе, в полученную массу добавляли 1 мл стерильного 0,85% раствора хлорида натрия и готовили ряд 10-ти кратных серийных разведений с высевом 0,1 мл на плотную питательную среду Сабуро в чашках Петри.

Чашки Петри инкубировали при температуре 37 °С в течение 3 суток. Подсчитывали количество выросших колоний гриба и рассчитывали количество жизнеспособных клеток гриба на единицу массы исследуемого легкого (КОЕ/г).

Выделенные культуры грибов идентифицировали по морфологическим и физиологическим признакам согласно определителям грибов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение различных схем введения циклофосфана для индукции и поддержания стабильной нейтропении у мышей.

При выборе экспериментальной модели нейтропении на мышах использовали 2 дозы введения циклофосфана: группа 1 – 200 мг/кг, группа 2 – 150 мг/кг. До введения препарата, при исследовании лейкоцитарной формулы, в обеих группах были получены сопоставимые результаты, соответствующие реферативным нормам абсолютного количества лейкоцитов и нейтрофилов для мышей. В группе 1 количество лейкоцитов составило $10,17 \pm 2,35 \cdot 10^9$ /л, нейтрофилов $-3,03 \pm 0,38 \cdot 10^9$ /л, в группе 2: лейкоцитов – $13,8 \pm 1,99 \cdot 10^9$ /л, нейтрофилов – $4,38 \pm 0,82 \cdot 10^9$ /л.

Согласно обеим схемам, лейкопения и нейтропения у мышей развились уже после первого введения препарата. В момент заражения экспериментальных групп животных количество лейкоцитов у мышей из группы 1 составило $1,6 \cdot 10^9$ /л, нейтрофилов – $0,37 \pm 0,09 \cdot 10^9$ /л, в группе 2: лейкоцитов – $2,27 \pm 0,54 \cdot 10^9$ /л, нейтрофилов – $0,39 \pm 0,05 \cdot 10^9$ /л.

В группе 1 на шестой день после первого введения циклофосфана у мышей развился агранулоцитоз: количество лейкоцитов снизилось до $0,57 \pm 0,13 \cdot 10^9$ /л, нейтрофилов – до нуля. Данное состояние привело к гибели 6 экспериментальных животных. У оставшихся 3 мышей на 9 день после первого введения препарата произошло полное восстановление показателей крови до нормальных значений.

На основании полученных в ходе эксперимента данных было принято решение отказаться от схемы

введения циклофосфана, примененной в группе 1.

В группе 2 использовали циклофосфан в меньшей дозе (150 мг/кг), кратность введения – 3 раза (-3; 0; +3 день эксперимента). Состояние агранулоцитоза развилось на 9 день после первого введения препарата (количество лейкоцитов – $0,57 \pm 0,13 \cdot 10^9/\text{л}$ при отсутствии нейтрофилов в мазках крови), восстановление нормальных показателей крови произошло на 12 день. В группе погибло 1 животное.

Сопоставив полученные результаты, определили оптимальную дозу циклофосфана – 150 мг/кг. Для исключения развития агранулоцитоза и формирования более длительного состояния адекватной нейтропении мы применили новую схему введения циклофосфана: четырёхкратно в -3, 0, +4 и +8 день эксперимента. При исследовании крови животных данной группы до первого введения циклофосфана количество лейкоцитов ($M \pm m$) составило $10,13 \pm 1,36 \cdot 10^9/\text{л}$, нейтрофилов – $2,36 \pm 0,15 \cdot 10^9/\text{л}$. В день заражения количество их снизилось до $1,7 \pm 0,21$ и $0,43 \pm 0,07 \cdot 10^9/\text{л}$ соответственно. На 4-ый и 8-ой дни эксперимента показатели продолжали находиться ниже нормы ($2,03 \pm 0,15$ и $0,28 \pm 0,02 \cdot 10^9/\text{л}$) и ($1,1 \pm 0,06$ и $0,22 \pm 0,01 \cdot 10^9/\text{л}$), а к 12-ому дню эксперимента составили $11,2 \pm 5,72$ и $6,40 \pm 3,12 \cdot 10^9/\text{л}$.

Выбор оптимальной заражающей дозы и штамма *A. fumigatus*.

Была проведена серия экспериментов по оценке выживаемости мышей при интраназальном введении различных штаммов и доз *A. fumigatus*.

Динамика гибели мышей после заражения суспензиями спор различных штаммов *A. fumigatus* с концентрацией 10^6 КОЕ/мл показана на рисунке 1. Максимальную гибель животных через 14 дней после заражения вызвал шт. 1267 (выжило 2 мыши из 10). После заражения шт. 1384 к этому сроку выжило 4 мыши, при заражении остальными штаммами – по 5 животных.

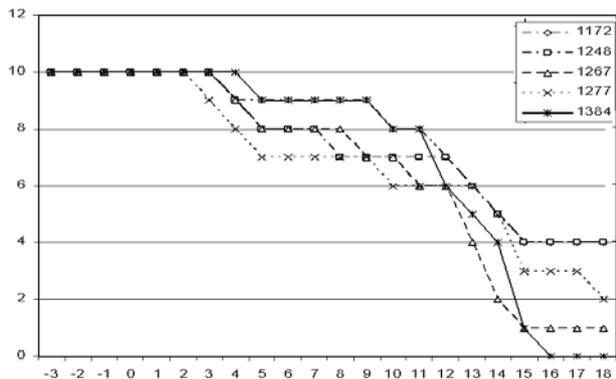


Рис. 1. Выживаемость мышей после интраназального введения суспензий спор с концентрацией 10^6 КОЕ/мл пяти штаммов *A. fumigatus*.

Кривые выживаемости животных после интраназального заражения различными дозами возбудителя (штамм *A. fumigatus* № 1267) приведены на рисунке 2.

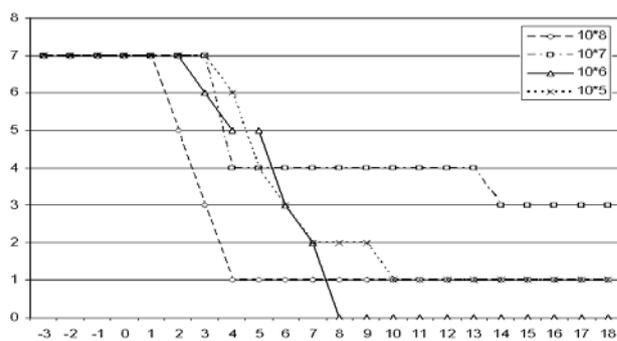


Рис. 2. Динамика гибели мышей после интраназального введения суспензий спор штамма *A. fumigatus* № 1267 различных концентраций.

При введении суспензии спор гриба в максимальной концентрации (10^8 КОЕ/мл) через 4 дня после заражения погибали 6 из 7 мышей (86%). На 14 сутки после заражения этой дозой выживало 1 животное. Интраназальное введение суспензии с минимальной концентрацией клеток гриба (10^5 КОЕ/мл) приводило к гибели 86% мышей через 10 дней после инфицирования. Гибель 100% животных в течение периода наблюдения отмечали только при использовании спор гриба в концентрации 10^6 КОЕ/мл на 8 сутки после введения.

На рисунке 3 представлены кривые выживаемости мышей после интраназального заражения штаммами *A. fumigatus* №№1267, 1277, 1384 при введении суспензий в двух концентрациях (10^7 и 10^8 КОЕ/мл). Выживаемость животных закономерно снижалась с увеличением заражающей дозы. Для разработки экспериментальной модели была отобрана оптимальная динамика гибели животных в группе *A. fumigatus* № 1384 с концентрацией 10^7 КОЕ/мл (гибель 60% животных с 6 по 14-е сутки эксперимента).

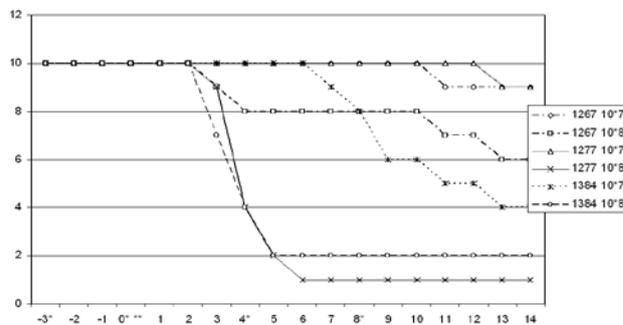


Рис. 3. Динамика гибели мышей после интраназального заражения мышей тремя штаммами *A. fumigatus*, концентрация суспензии спор 10^7 - 10^8 КОЕ/мл.

Культуральное и гистологическое подтверждение инфекции.

В результате культурального исследования лёгких погибших животных были получены данные, подтверждающие наличие микотической инфекции в количественном выражении (табл.).

Наиболее выраженная гистологическая картина аспергиллеза легких получена при использовании штаммов *A. fumigatus* 1267, 1277, 1384 при интраназальном введении суспензии в концентрации 10^8 КОЕ/мл. При этом в тканях легких всех исследованных мышей выявлены многочисленные очаги роста грибов (более 10 очагов в срезе).

Крупные участки разрастания септированного мицелия гриба имели место в стенках бронхов с пере-

ходом на альвеолы, межальвеолярные перегородки с разрушением ткани и прорастанием в сосуды. Отмечали наличие хаотичного и радиального роста мицелия (Рис. 4). В отдельных случаях наблюдали конидиальные головки. Воспалительная реакция в ткани легких очаговая, скудная, в основном, представлена макрофагами, лимфоцитами и нейтрофилами.

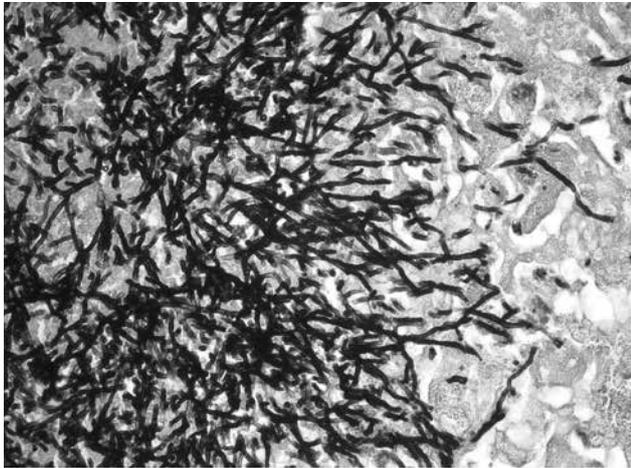


Рис. 4. Гистологическое исследование лёгкого мыши, погибшей на 6-й день после заражения *A. fumigatus* РКПГ F 1384. Ув. 400х. Окраска по Гомори-Грокотт.

Сравнительная характеристика пяти штаммов *A. fumigatus* по признакам, отражающим инфекционный процесс.

На основании анализа полученных данных штаммы 1172 и 1248 были исключены из дальнейших экспериментов по моделированию аспергиллеза, а именно: перечисленные штаммы обладали более низкой вирулентностью при интраназальном введении и более низкой высеваемостью из легких животных. Кроме того, штамм 1172 проявлял слабую интенсивность спороношения, что составляло сложность при приготовлении инокулюма. Дальнейшие эксперименты с интраназальным заражением проводили с использованием штаммов 1267, 1277 и 1384.

В таблице приведены параметры, характеризующие выраженность экспериментального аспергиллеза

за при интраназальном заражении суспензиями трех штаммов *A. fumigatus*.

Таблица

Показатели инфекционного процесса при интраназальном заражении мышей суспензиями штаммов *A. fumigatus* в концентрациях 10^7 и 10^8 КОЕ/мл

Штамм	Выживаемость мышей (количество выживших животных, 14 дней)		Высев <i>A. fumigatus</i> из легких (КОЕ/г; M±m)		Результаты гистологических исследований при заражении суспензией $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл	
	концентрация введенной суспензии клеток гриба		$1 \cdot 10^7$ (7-14 день)	$1 \cdot 10^8$ (3-6 день)	количество мышей с очагами аспергиллеза в легких/ количество исследований	количество очагов в срезе
	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^8$				
1267	9	6	7580	105000 ± 65000	2/4	+++*
1277	9	1	17200	56777 ± 19049	9/9	+++
1384	4	2	102000 ± 82451	98375 ± 32775	8/8	+++

*+++ - > 10 очагов в срезе

Наибольшую вирулентность при интраназальном заражении суспензией $1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл проявил штамм *A. fumigatus* РКПГ F 1384 (наибольшая гибель животных и обсемененность ткани легких). Учитывая, что штамм 1384 также обладает наиболее интенсивным спороношением на агаризованной среде Сабуро, он был выбран нами как оптимальный для моделирования инвазивного аспергиллеза легких.

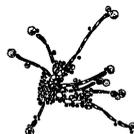
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработана модель инвазивного аспергиллеза легких, обусловленного *Aspergillus fumigatus*.
2. Рекомендованы оптимальная схема введения циклофосфана для создания иммуносупрессии (доза 150 мг/кг четырёхкратно), эффективная концентрация инокулюма (10^7 КОЕ/мл), штамм *A. fumigatus* РКПГ F 1384 и способ введения (интраназальное введение) для моделирования экспериментального аспергиллеза у мышей линии BALB/C.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Verweij P, Howard S., Melchers W., Denning D. Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints// Drug Resist. Updat. – 2009. – Vol. 12. – P. 141-147.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч.1. – М: Гриф и К, 2012. – 944 с.
3. Nagasaki Y, Eriguchi Y, Uchida Y, et al. Combination therapy with micafungin and amphotericin B for invasive pulmonary aspergillosis in an immunocompromised mouse model // J. of Antimicrobial Chemotherapy. – 2009. – Vol. 64. – P. 379-382.
4. Mitsuyma J, Nomura N., Hashimoto K., et al. In vitro and in vivo antifungal activities of T-2307, a novel arylamidine //Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2008. – Vol. 52. – P. 1318-1324.
5. Sheppard D., Rieg G., Chiang L., et al. Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2004. – Vol. 48. – P. 1908-1911.
6. Stephens-Romero S., Mednick A., Feldmesser M. The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy//Infection and Immunity. – 2005. – Vol. 73. – P. 114-125.

Поступила в редакцию журнала 09.12.2016
Рецензент: Н.Н. Климко



ОЦЕНКА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНВАЗИВНОМ АСПЕРГИЛЛЕЗЕ НОВОГО ЗАМЕЩЕННОГО КАРБАЗОЛА PLX01107

^{1,2} Еремина Н.В. (руководитель проекта), ¹ Казей В.И. (директор по доклиническим исследованиям), ² Сорокина А.В. (в.н.с.), ² Алексеева С.В. (с.н.с.), ³ Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой), ³ Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ³ Выборнова И.В. (н.с.), ³ Босак И.А. (с.н.с.), ³ Елинов Н.П. (проф. кафедры), ³ Игнатъева С.М. (в.н.с.), ³ Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.), ³ Степанова А.А. (зав. лаб.), ³ Фролова Е.В. (зав. лаб.), ³ Филиппова Л.В. (с.н.с.), ³ Чилина Г.А. (зав. лаб.), ⁴ Пурмаль А.А. (вице-президент по химическому развитию)

¹ ООО «Панацела Лабс», Москва, Россия; ² НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, Россия; ³ НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; ⁴ Кливленд БиоЛабс, Инк., Баффало, Нью-Йорк, США

© Коллектив авторов, 2016

Соединение PLX01107, являющееся производным карбазола, ранее продемонстрировало антимикотический потенциал *in vitro* в отношении *Aspergillus fumigatus* [1]. В настоящей работе оценена острая токсичность и противогрибковая активность PLX01107 *in vivo*.

При однократном внутривенном введении среднелетальная доза ЛД₅₀ PLX01107 составила 64,9 мг/кг – у самок и 56,6 мг/кг – у самцов беспородных белых мышей; при пероральном введении: 85,7 мг/кг – у самок и 94,4 мг/кг – у самцов. ЛД₅₀, определенная при внутривенном введении, составила 30,6 мг/кг – у самок и 30,1 мг/кг – у самцов беспородных белых крыс, а при пероральном введении самкам – 80,3 мг/кг, самцам – 79,0 мг/кг.

Эксперименты по оценке противогрибковой активности осуществляли на модели инвазивного аспергиллеза легких у мышей. Эффект оценивали путем сравнения долей выживших животных с отрицательным высевом из легких в разных группах. В качестве препарата сравнения использовали вориконазол (Вифенд, Пфайзер) в дозе 25 мг/кг. PLX01107 в дозах 1, 3 и 9 мг/кг, вводимый в течение 5 дней внутривенно мышам, интраназально зараженным *A. fumigatus*, не оказывал значимого эффекта на регистрируемый показатель.

Таким образом, карбазольное соединение PLX01107 относится к 3 классу токсичности и, в отличие от вориконазола, не проявляет противогрибковую активность в дозах 1, 3 и 9 мг/кг на модели аспергиллеза легких у мышей.

Ключевые слова: карбазольные соединения, модель аспергиллеза легких у мышей, острая токсичность, PLX01107

EVALUATION OF ACUTE TOXICITY AND EFFICACY IN EXPERIMENTAL INVASIVE ASPERGILLOSIS OF A NEW CARBAZOLE DERIVATIVE PLX01107

^{1,2} Eremina N.V. (project manager), ¹ Kazey V.I. (director of preclinical researches), ² Sorokina A.V. (leading scientific collaborator), ² Alekseeva S.V. (senior scientific collaborator), ³ Vasilyeva N.V. (director of the Institute, head of the chair), ³ Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ³ Vybornova I.V. (scientific collaborator), ³ Bosak I.A. (senior scientific collaborator), ³ Yelinov N.P. (professor of the chair), ³ Ignatyeva S.M. (leading scientific collaborator), ³ Avdeenko Yu.M. (senior scientific collaborator), ³ Stepanova A.A. (head of the laboratory), ³ Frolova E.V. (head of the laboratory), ³ Filippova L.V. (senior scientific collaborator), ³ Chilina G.A. (head of the laboratory), ⁴ Purmal A.A. (vice president of chemistry)

¹ Panacela Labs LLC, Moscow, Russia; ² Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russia; ³ Kashkin Research Institute of Medical Mycology of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia; ⁴ Cleveland BioLabs, Inc., Buffalo, NY, USA

© Collective of authors, 2016

Carbazole derivative PLX01107 has previously demonstrated antifungal potential *in vitro* against *Aspergillus fumigatus* [1]. In the present research the acute toxicity and *in vivo* antifungal activity of PLX01107 was evaluated.

The average lethal doses LD₅₀ of PLX01107 evaluated in white outbred mice were 64,9 mg/kg in female and 56,6 mg/kg in male after single intravenous administration, and 85,7 mg/kg in female and 94,4 mg/kg in male after oral administration. LD₅₀ evaluated in white outbred rats were 30,6 mg/kg in female and 30,1 mg/kg in male after single intravenous administration, and 80,3 mg/kg in female and 79,0 mg/kg in male after oral administration.

Murine invasive pulmonary aspergillosis model was used in the experiment to estimate the antifungal activity. The effect was evaluated by comparing the percentage of surviving animals with negative inoculation from lungs. Voriconazole (Vifend, Pfizer), 25 mg/kg, was used as a comparator. PLX01107 at doses of 1, 3 and 9 mg/kg administered intravenously 5 days daily to intranasally infected with *A. fumigatus* mice did not cause any significant effect on the registered parameter.

Thus, carbazole derivative PLX01107 relates to the 3rd class of toxicity and does not demonstrate antifungal activity at doses of 1, 3 and 9 mg/kg on murine invasive pulmonary aspergillosis model in contrast to voriconazole.

Key words: acute toxicity, carbazole compounds, murine invasive pulmonary aspergillosis model, PLX01107

ВВЕДЕНИЕ

Инвазивные грибковые заболевания, вызванные грибами рода *Aspergillus*, являются важной причиной летальности пациентов с ослабленным иммунитетом [2, 3]. Развитие резистентности у патогенных видов *Aspergillus* к существующим средствам терапии обуславливает необходимость разработки новых противогрибковых лекарств [Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. // Иммунопатол., аллергол., инфектол. – 2004. – №1].

В ходе фармакологической оптимизации структуры ранее изученного карбазольного соединения CBL0100 [4, 5] был синтезирован ряд новых веществ с потенциальной противомикробной активностью.

* Контактное лицо: Богомолова Татьяна Сергеевна, тел.: (812) 510-62-69

В частности, было обнаружено, что карбазольное соединение PLX01107 в концентрациях 5-20 мкМ проявляет выраженную противогрибковую активность в отношении широкого ряда патогенных микромицетов, что определило перспективу его разработки в качестве противогрибкового средства [1]. Необходимый этап этой работы – исследование противогрибковой активности соединения PLX01107 *in vivo* и оценка параметров острой токсичности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали субстанцию PLX01107 (6-(2-Диэтиламиноэтил)-9-оксазол-2-ил-1,2-дигидро-6Н-циклопента[с]карбазол-3-он; ЗАО «Фарм-Синтез»), готовые лекарственные формы и плацебо (30% гидроксипропил бетациклодекстрин (HPβCD) в 50 мМ ацетате натрия) (ООО «Биоинтегратор»). Надлежащее качество препаратов было подтверждено соответствующими фармакопейными методиками [6]. В качестве препарата сравнения использовали вориконазол (Вифенд®, Пфайзер). Выбор доз вориконазола определяли по данным предварительных исследований и сведениям из научной литературы [7; Denning D.W., Warn P. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1999. – Vol. 4, №11].

Эксперименты выполняли на сертифицированных животных (Филиалы «Андреевка» и «Столбовая» ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России), которых содержали в контролируемых условиях окружающей среды: 18-26 °С, относительная влажность воздуха –30-70%, 12-ти часовой цикл освещения и 8-10-ти кратная смена объема воздуха в час. Все процедуры с животными были утверждены Этическими комитетами учреждений.

Изучение острой токсичности PLX01107 при однократном внутривенном и пероральном введении мышам и крысам проводили на 279 аутбредных мышах (153 самца, 126 самок) и 180 аутбредных крысах (90 самцов, 90 самок) в соответствии с действующими рекомендациями по доклиническим исследованиям [8]. PLX01107 (в концентрациях 10 мг/мл и 5 мг/мл в составе готовой лекарственной формы (30% HPβCD в 50 мМ ацетате натрия)) предельно медленно вводили в хвостовую вену мышам в объеме 0,5 мл, крысам – 2,0 мл и перорально с помощью металлического атравматического зонда мышам – в объеме 0,5 мл, крысам – 5,0 мл. Животных наблюдали в течение 14 дней после введения препаратов. Среднелетальные дозы рассчитывали по методу Литчфилда – Уилкоксона [Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М., 1998].

Для изучения противогрибковой активности PLX01107 *in vivo* на мышинной модели инвазивного аспергиллеза легких использовали штамм *A. fumigatus* РКПГ F 1384 (Российская коллекция патогенных грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России). Исследование проводили на 168 самцах мышей BALB/C (массой 22-23 г), которые были распределены в 9 групп: группы 1–3 – лечение PLX01107 в дозах 9, 3 и 1 мг/кг, группа 4 – лечение вориконазолом (25 мг/кг), группы 5–8 – контрольные (мониторинг нейтропении, плацебо, без лечения, без заражения). Введение препаратов осуществляли путем внутривенной инъекции животным ежедневно в течение 5 дней, спустя

сутки после инфицирования. Заражение мышей проводили путем интраназального введения 0,05 мл взвеси конидий гриба в концентрации 1·10⁷ КОЕ/мл в 0-й день исследования в соответствии с ранее описанной методикой [9].

Развитие инвазивного аспергиллеза подтверждали присутствием галактоманна (антигена *A. fumigatus*) в сыворотке крови зараженных мышей (тест-система «Platelia *Aspergillus* Ag», Bio-Rad Laboratories, США; пороговая величина коэффициента оптической плотности – 0,5 в соответствии с инструкцией производителя), а также результатами гистопатологического (количество и размер очагов поражения *A. fumigatus*, выявляемые при окрашивании срезов тканей легких гематоксилин-эозином, по Гомори-Грокотт и PAS-методом) и культурального (количество жизнеспособных клеток гриба на единицу массы легкого (КОЕ/г)) исследований.

Противогрибковую активность соединений оценивали через 14 дней после инфицирования по доле выживших животных, у которых при посеве легких не было роста *A. fumigatus*, в соответствующих экспериментальных группах мышей в сравнении с результатами контрольных групп.

Полученные в ходе исследования данные статистически обрабатывали с помощью программы Statistica 6.0 for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В остром эксперименте установлено, что PLX01107 в выбранном диапазоне дозировок при внутривенном и пероральном введении в отдельных дозах вызывает гибель части животных (табл.).

Таблица

Летальность мышей и крыс после однократного перорального и внутривенного введения PLX01107 к 14 дню наблюдения в остром эксперименте

Доза, мг/кг	Мыши		Крысы				
	Перорально	Внутривенно	Перорально	Кол-во погибших / всего в группе	Внутривенно	Кол-во погибших / всего в группе	
50	0/12	25	0/12	70	1/6	25	1/12
75	1/12	50	6/24	75	3/12	30	5/12
80	3/12	60	3/6	80	3/6	35	10/12
90	4/15	70	4/6	85	5/6	40	12/12
100	19/24	75	10/12	90	11/12		
125	12/12	100	23/24	100	12/12		

При внутривенном введении PLX01107 ЛД₅₀ составила у самок беспородных белых мышей 64,9 (52,2÷80,7) мг/кг, у самцов – 56,6 (48,9÷65,5) мг/кг, при пероральном: у самок – 85,7 (77,3÷95,0) мг/кг, у самцов – 94,4 (86,9÷102,7) мг/кг. ЛД₅₀, определенная при внутривенном введении самкам беспородных белых крыс, составила 30,6 (26,7÷35,7) мг/кг, самцам – 30,1 (25,4÷35,7) мг/кг, при пероральном введении: самкам – 80,3 (75,9÷76,0) мг/кг, самцам – 79,0 (72,2÷ 86,5) мг/кг. Не было выявлено существенных половых и видовых различий в реакциях на введение PLX01107.

При патологоанатомическом исследовании животных, павших после однократного внутривенного или перорального введения PLX01107, установлено, что гибель наступала в результате патологических изменений со стороны желудочно-кишечного тракта и обе-

зоживания.

Анализ совокупности данных по оценке острой токсичности позволил отнести соединение PLX01107 к третьему классу токсичности по К.К. Сидорову (Токсикология новых промышленных химических веществ. – Л., 1973) и ко второму классу опасности – по ГОСТ 12.1.007-76 [10].

У мышей с экспериментальным аспергиллезом легких показатели содержания галактоманна (коэффициенты оптической плотности $-1,11 \pm 1,80$) во всех группах превышали контрольные значения, что являлось показателем активного протекания инфекционного процесса. Все колонии грибов, выделенные при высевах тканей легких на плотную питательную среду, не отличались по макро- и микроскопическим морфологическим признакам от штамма *A. fumigatus* РКПГ F 1384, использованного для заражения. Воспалительная реакция в ткани была представлена многочисленными нейтрофилами, лимфоцитами и макрофагами, наблюдали полнокровие и присутствие участков неравномерной воздушности в виде эмфиземы и ателектазов, отеков.

Динамика гибели животных при экспериментальном аспергиллезе представлена на рисунке 1.

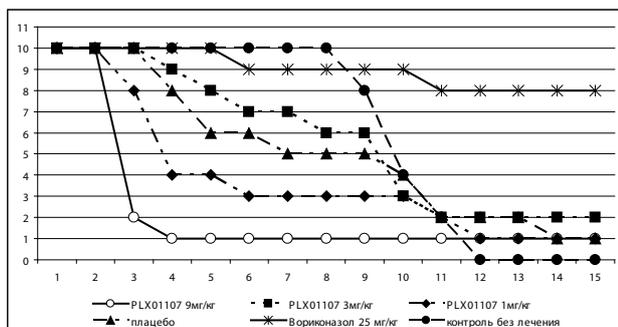


Рис. 1. Динамика гибели животных, интраназально зараженных *A. fumigatus* и леченных различными дозами PLX01107 и вориконазолом.

Выживаемость животных, леченных PLX01107 в максимальной дозе 9 мг/кг, была достоверно ниже, чем в остальных группах зараженных животных ($p \leq 0,003$), в то время как в группе животных, леченных вориконазолом, выживаемость оказалась значительно выше ($p \leq 0,01$).

При посеве легких, отобранных у подавляющего большинства (96%) мышей из групп зараженных животных, погибших в ходе эксперимента, выделен *A. fumigatus* в количестве от 10^4 до 10^2 КОЕ/г. Нагрузка гриба в ткани легких во всех группах уменьшалась с течением времени после заражения. При посеве легких мышей, выживших к концу эксперимента (14 день после заражения), в группах животных, леченных

PLX01107 в дозах 3 мг/кг и 1 мг/кг, роста *A. fumigatus* не обнаружили. Из легких одной выжившей мыши из группы PLX01107 9 мг/кг выявлен *A. fumigatus* в количестве $1,6 \cdot 10^2$ КОЕ/г. При посеве легких от 7-ми из 8-ми (87,5%) выживших животных, леченных вориконазолом, *A. fumigatus* не выделен; из легких 1 мыши из этой группы получен рост гриба в концентрации $7,3 \cdot 10^3$ КОЕ/г. При статистической обработке результатов культурального исследования легких мышей из групп леченных животных не отмечали достоверных различий.

Результаты эффективности лечения зараженных мышей разными препаратами представлены на рисунке 2. В контрольной группе без лечения высевы *A. fumigatus* получены из легких всех погибших мышей (доля животных с отрицательным высевом – 0%).

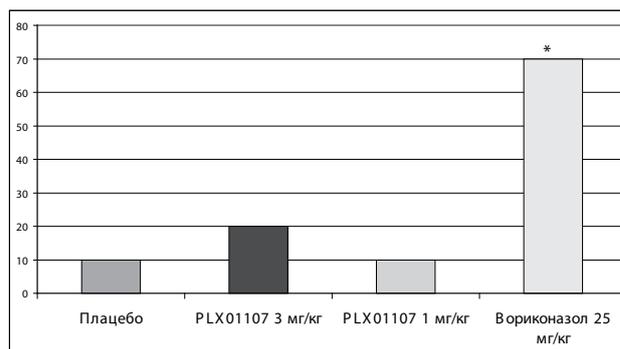


Рис. 2. Доля выживших животных с отрицательным высевом из легких мышей, зараженных *A. fumigatus* и леченных различными дозами PLX01107 и препаратом сравнения.

* - статистически значимое отличие от группы контроля без лечения

В группе мышей, леченных PLX01107 в дозе 9 мг/кг, *A. fumigatus* был выделен из легких всех исследованных мышей (0% животных с отрицательным высевом, $p \leq 0,05$), поэтому данные по этой группе не представлены на рисунке.

В экспериментах на инфицированных животных PLX01107 не проявил противогрибковой активности. Показатели выживаемости мышей с отрицательным высевом возбудителя были сравнимы с контрольными (без терапии), в отличие от леченных вориконазолом.

Таким образом, следует констатировать отсутствие противогрибковой активности PLX01107 при экспериментальном аспергиллезе легких. Это существенно ограничивает его дальнейшую разработку в качестве противогрибкового средства при инвазивном аспергиллезе и требует тщательной проверки в экспериментах *in vivo* противогрибковой активности, выявленной *in vitro* в отношении других возбудителей [5].

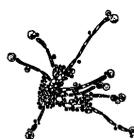
ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Gurova K., Rydkina E., Wade W. Carbazole compounds and method of using same. Патент на изобретение PCT/RU2013/000683.
2. Васильева Н.В., Климко Н.Н., Цинзерлинг В.А. Диагностика и лечение инвазивных микозов: современные рекомендации // Вестник СЗГМУ им. И.И. Мечникова. – 2010. – Т. 2. №4. – С. 5-18.
3. 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. 89, №12. – P. 864-72.
4. Еремина Н.В., Жанатаев А.К., Чайка З.В. и др. Скрининг противогрибковой активности карбазол-замещенных соединений и оценка генотоксичности молекул-лидеров // Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т. 15, №3. – С. 42-47.
5. Еремина Н.В., Казей В.И., Чуринов А.А. и др. Пилотные исследования эффективности и острой токсичности двух лекарственных композиций инновационного препарата СВЛ0100 для лечения микозов // Проблемы медицинской

- микологии. – 2014. – Т. 16, №1. – С. 23-28.
6. Государственная Фармакопея Российской Федерации (XII издание). Часть 1. – М: Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с.
 7. Salas Valentina, F. Javier Pastor, Enrique Calvo, et al. Evaluation of the In vitro activity of voriconazole as predictive of in vivo outcome in a murine *Aspergillus fumigatus* infection model// Antimicrob. Agents Chemother. – 2013. – Vol. 57, №3. – P. 1404-1408.
 8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. – М.: Гриф и К, 2012.
 9. Васильева Н.В., Богомолова Т.С., Степанова А.А. и др. Особенности моделирования аспергиллеза легких у мышей в зависимости от вирулентности штаммов *Aspergillus fumigatus*// Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, №2. – С. 50-51.
 10. ГОСТ 12.1.007-76. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

Поступила в редакцию журнала 13.12.2016

Рецензент: Н.Н. Климко



ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ *ASPERGILLUS FUMIGATUS* ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АСПЕРГИЛЛЕЗЕ У МЫШЕЙ

Степанова А.А. (зав. лаб.)*, Васильева Н.В.
(директор института, зав. кафедрой), Босак И.А.
(с.н.с.), Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.), Выборнова И.В.
(н.с.), Десятник Е.А. (врач-миколог)

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

© Коллектив авторов, 2016

Показано, что в опыте с гидрокортизоном степень развития гриба в легких мышей была низкой, наблюдали признаки, типичные для геморрагической пневмонии. Вокруг скоплений гиф гриба обнаружили хорошо выраженную воспалительную инфильтрацию. В эксперименте с циклофосфаном степень развития элементов гриба была довольно высокой. Однако признаки пневмонии и воспалительной реакции вокруг очагов некроза были слабо выражены. В первом случае из клеток иммунной системы доминировали нейтрофилы, во втором – лимфоциты.

В экспериментах с гидрокортизоном отмечали двойное влияние разных схем его введения на особенности микроморфологии, физиологии и ультраструктуру клеток гиф *Aspergillus fumigatus*. По толщине клеточной стенки клетки гиф сравниваемых вариантов не различались. Установили влияние разных концентраций конидий инокулюма на ширину гиф гриба. Зрелые клетки узких гиф синтезировали и накапливали умеренное количество темных глобул запасного белка, тогда как широких – крупные липидные включения. Внеклеточный матрикс в узких гифах был развит слабо, а в широких – отсутствовал. Клетки гиф *A. fumigatus* на фоне гидрокортизона имели характерную искривленную форму, обусловленную слабым развитием снаружи клеточных стенок их внеклеточного матрикса. Другим морфологическим феноменом слабого развития внеклеточного матрикса в варианте с гидрокортизоном является формирование широких гиф. Наличие хорошо развитого внеклеточного матрикса усиливает адгезивные свойства гиф аспергилла, что важно для их активного координированного радиального роста в ткани легкого мышей. Гифы аспергилла при введении циклофосфана имели однотипную морфологию и ультраструктуру: они синтезировали умеренное количество запасных липидов и формировали хорошо развитый внеклеточный матрикс.

Результаты настоящей работы иллюстрируют наличие высокой пластичности морфологических и ультраструктурных особенностей изученного штамма *A. fumigatus*. Исключение составляют септы и поровый аппарат данного вида гриба.

Ключевые слова: *Aspergillus fumigatus*, гидрокортизон, клетки гиф, легкие мышей, световая и трансмиссионная электронная микроскопия, циклофосфан

THE STRUCTURAL PECULIARITY OF *ASPERGILLUS FUMIGATUS* DURING THE EXPERIMENTAL ASPERGILLOSIS IN THE MICE

Stepanova A.A. (head of the laboratory), Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the chair), Bosak I.A. (senior scientific collaborator), Avdeenko Y.L. (senior scientific collaborator), Vyborno I.V. (scientific collaborator), Desyatnik E.A. (physician-mycologist)

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

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

© Collective of authors, 2016

It was shown that in variant with hydrocortisone, the level of fungal development in the murine lung of mice was low. We observed the signs typical of hemorrhagic pneumonia. Well-marked inflammatory infiltration was revealed around the fungal hyphal aggregations. In the variant with cyclophosphan the level of development of fungal elements was quite high. However symptoms of pneumonia and inflammatory reaction around the focuses of necrosis were feebly marked. In the first case neutrophils dominated in the cells of immune system, whereas lymphocytes – in the second case.

In the experiments with hydrocortisone dual influence of its different doses on the peculiarities of micromorphology, physiology and ultrastructure of *A. fumigatus* hyphal cells it was revealed. Regarding the thickness of the hyphal cell wall the compared variants didn't differ. Influence of different concentration of conidia of inoculum on width of fungal hyphae was revealed. Mature cells of narrow hyphae synthesized and accumulated moderate quantity of dark globules of storage protein whereas wide – large lipids inclusions. For the hyphal cells in variant with hydrocortisone was typical the curved form which determined by poor development outside of their cell wall of an extracellular matrix, whose presence in the normal state considerably strengthens the rigidity of the cell wall. Extracellular matrix in option with narrow hyphae has been developed poorly, and with wide was absent. Extracellular matrix in the narrow hyphae was poorly developed, whereas it was absent in wide once. We interpret the curved form of the hyphal cells which infected the murine lung tissue after injection of hydrocortisone by poor development outside of their cell walls of an extracellular matrix, whose presence in the normal state considerably strengthens the rigidity of the cell wall. Other morphological phenomenon of poor development of extracellular matrix in variants with a hydrocortisone was the formation of wide hyphal cells. The existence of well-developed extracellular matrix increased the adhesive properties of aspergillus hyphal cells which is important for their active coordinated radial growth in the murine lung tissue. In variants with a cyclophosphan hyphae of the *A. fumigatus* had the same morphology and ultrastructure: they synthesized moderate quantity of storage lipids and formed well developed extracellular matrix.

We have demonstrated the high plasticity of morphological and ultrastructural features of the studied *A. fumigatus* strain except for septae and its pore apparatus.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, hydrocortisone, hyphal cells, light- and transmission electron microscopy, murine lung, cyclophosphane

ВВЕДЕНИЕ

В научной литературе имеется небольшое число работ по экспериментальному моделированию аспергиллеза [1, Duong M., et al. // J. Infect. Des. – 1998. – Vol. 178] с целью изучения особенностей иммунного ответа на фоне иммуносупрессии. Основная цель настоящего исследования – сравнить с помощью методов световой и трансмиссионной электронной микроскопии особенности строения *A. fumigatus*, а также характера воспалительной реакции и изменений в ткани легкого мышей, инфицированных при введении им разных иммуносупрессоров – гидрокортизона и циклофосфана.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Штамм *A. fumigatus* РКПГФ-1384 был получен из Российской коллекции патогенных грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. Культура *A. fumigatus* была выделена из патологического материала пациента с инвазивным аспергиллезом легких. Для моделирования аспергиллеза на фоне иммуносупрессии гидрокортизоном использовали метод, предложенный Duong M. [Duong M., et al. // J. Infect. Des. – 1998. – Vol. 178]. Заражение наркотизированных клофосформом животных проводили интраназально вве-

Таблица 1

Номера и группы животных, дата гибели после заражения, наличие элементов гриба, высева, пневмонии и воспалительной реакции в тканях легких мышей после введения гидрокортизона

№ животного	Группы животных	Сутки гибели мышей после заражения	Диаметр гиф гриба (мкм)	Частота встречаемости гиф гриба в тканях легких мышей	Высев из ткани легкого мышей	Наличие пневмонии в легких мышей	Наличие воспалительной реакции в легких мышей
10	1	2	4,3	3	2900	+	+
11	1	2	7,8	5	9000	+	+
14	1	3	6,0	3	8000	+	+
15	1	3	-	0	100	-	-
17	1	3	3,7	4	8000	+	+
18	1	5	3,0	1	10	+	+
Средние значения:			4,96±1,94	2,67±1,9	4668±4146		
7	2	2	5,8	2	13000	+	+
8	2	2	5,5	2	4000	+	+
9	2	2	5,6	2	6000	+	+
12	2	2	7,4	4	2400	-	+
16	2	3	7,6	1	20	-	+
19	2	5	7,9	4	20	+	+
20	2	5	-	0	60	-	-
21	2	5	-	0	2600	-	+
22	2	5	5,1	1	2100	-	+
Средние значения:			6,41±1,17	1,78±1,5	3356±4132		
1	3	1	-	0	4000	-	-
2	3	1	7,0	1	5000	+	+
3	3	1	-	0	12000	+	+
4	3	2	7,7	5	7000	-	+
5	3	2	7,0	5	18000	+	+
6	3	2	7,2	3	1000	+	+
13	3	2	-	0	2400	+	+
Средние значения:			7,2±0,33	2±2,3	7057±6002		
1	4	1	3,9	2	100000	+	+
2	4	1	4,1	3	120000	+	+
3	4	1	4,3	3	-	+	+
4	4	1	4,6	3	49000	+	+
5	4	1	4,8	2	38000	-	+
6	4	1	4,6	2	14000	+	+
7	4	1	4,4	2	53000	+	+
8	4	1	-	0	-	+	+
9	4	2	4,2	2	13000	+	+
10	4	3	4,3	2	150000	+	+
11	4	3	4,1	3	11000	+	+
Средние значения:			4,33±0,28	2,18±0,9	210889 ± 484932		

Примечание: 1 группа – 1·10⁴ КОЕ/мл; 2 группа – 1·10⁵ КОЕ/мл; 3 группа – 1·10⁶ КОЕ/мл; 4 группа – 1·10⁷ КОЕ/мл. Частота встречаемости гиф гриба: 0 - нет; 1 – редко в ткани легкого; 2 – мало в ткани легкого; 3 – умеренное в ткани легкого; 4 – много только в просвете бронхов; 5 – много в бронхах и мало в ткани легкого.

Часто отмечали картины прорастания гиф гриба через стенку бронха и картины грибового бронхолита. В тканях легких мышей 1-ой группы (табл. 1, рис. 1 б) гифы гриба (окраска по методу Гомори-Грокотта) были обнаружены в 5-ти из 6-ти исследованных образцов. Из 5-ти животных 1-ой группы с наличием микотической инфекции в легких только в одном случае (животное 17) наблюдали обильные скопления хаотично расположенных сильно ветвящихся гиф гриба в просвете бронхов (Рис. 1 ж). Во всех остальных случаях гифы грибов не формировали очагов радиального роста в тканях легких, встречались редко, располагались хаотично, одиночно или в небольших группах. Гифы гриба часто были сильно искривлены. Средние значения диаметра гиф данного варианта эксперимента составляли 4,96 мкм.

дением 50 мкл взвеси спор гриба в концентрации 1·10⁴ и 1·10⁷ КОЕ/мл. В качестве иммуносупрессоров были выбраны гидрокортизон и цитостатический препарат – циклофосфан. Экспериментальным животным (самцы линейных мышей Balb/C с массой тела 18-22 г) внутрибрюшинно вводили гидрокортизон в дозе 2,56 мг в 0, 3, 4 и 5 дни эксперимента и циклофосфан в дозе 150 мг/кг соответственно в – 0, 4, 8 и 12 дни.

В экспериментах с гидрокортизоном животные, в соответствии с дозой конидий инокулюма, были разделены на следующие группы: 1 – 1·10⁴ КОЕ/мл; 2 – 1·10⁵ КОЕ/мл; 3 – 1·10⁶ КОЕ/мл; 4 группа – 1·10⁷ КОЕ/мл. В экспериментах с циклофосфаном концентрация конидий в инокулюме была постоянной – 1·10⁷ КОЕ/мл.

Для проведения гистологических исследований кусочки легких мышей располагали в биопсийные кассеты и фиксировали 6 часов 10%-ым забуференным раствором формалина. Для описания характера воспалительной реакции, а также выявления и последующего описания элементов гриба срезы окрашивали гематоксилином-эозином (Г-Э) по методу Гомори-Грокотта. Препараты изучали и фотографировали в световом микроскопе Leica DM-4000B.

После проведения гистологических исследований и определения общей картины распространения инфекции, мы вторично использовали для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ) парафиновые блоки 2-ой (мышь №12, 16, 19), 3-ей (№4, 5, 6) и 4-ой групп (№3, 4, 5, 6, 7) в варианте с гидрокортизоном, а также мышей №14, 15, 23, 24 и 25 – в варианте с циклофосфаном. В ходе изучения световых препаратов определяли зону наибольшей концентрации гиф гриба, которую отмечали маркером на блоке и вырезали для последующей депарафинизации ксилолом, после чего образцы фиксировали 3 часа в 3% растворе глутарового альдегида по методике, описанной нами ранее [3, 4]. Ультратонкие срезы получали с помощью стеклянных ножей на ультратоме LKB-V, собирали на медные сетки и окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца. Ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе просвечивающего типа JEM 100 CX-2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологическая картина (окраска Г-Э и по Гомори-Грокотту) в легких мышей (контроль) была идентичной после введения гидрокортизона и циклофосфана. Элементы гриба и признаки воспаления в тканях легких мышей отсутствовали.

После введения гидрокортизона (окраска Г-Э) в тканях легких мышей **1-ой группы** гистологически в 83% случаев (в 5-ти из 6-ти исследованных образцов) наблюдали обширную геморрагическую пневмонию (Табл. 1), бронхопневмонию с инфильтрацией многочисленными нейтрофилами (Рис. 1 а), лимфоцитами и макрофагами, с доминированием первых.

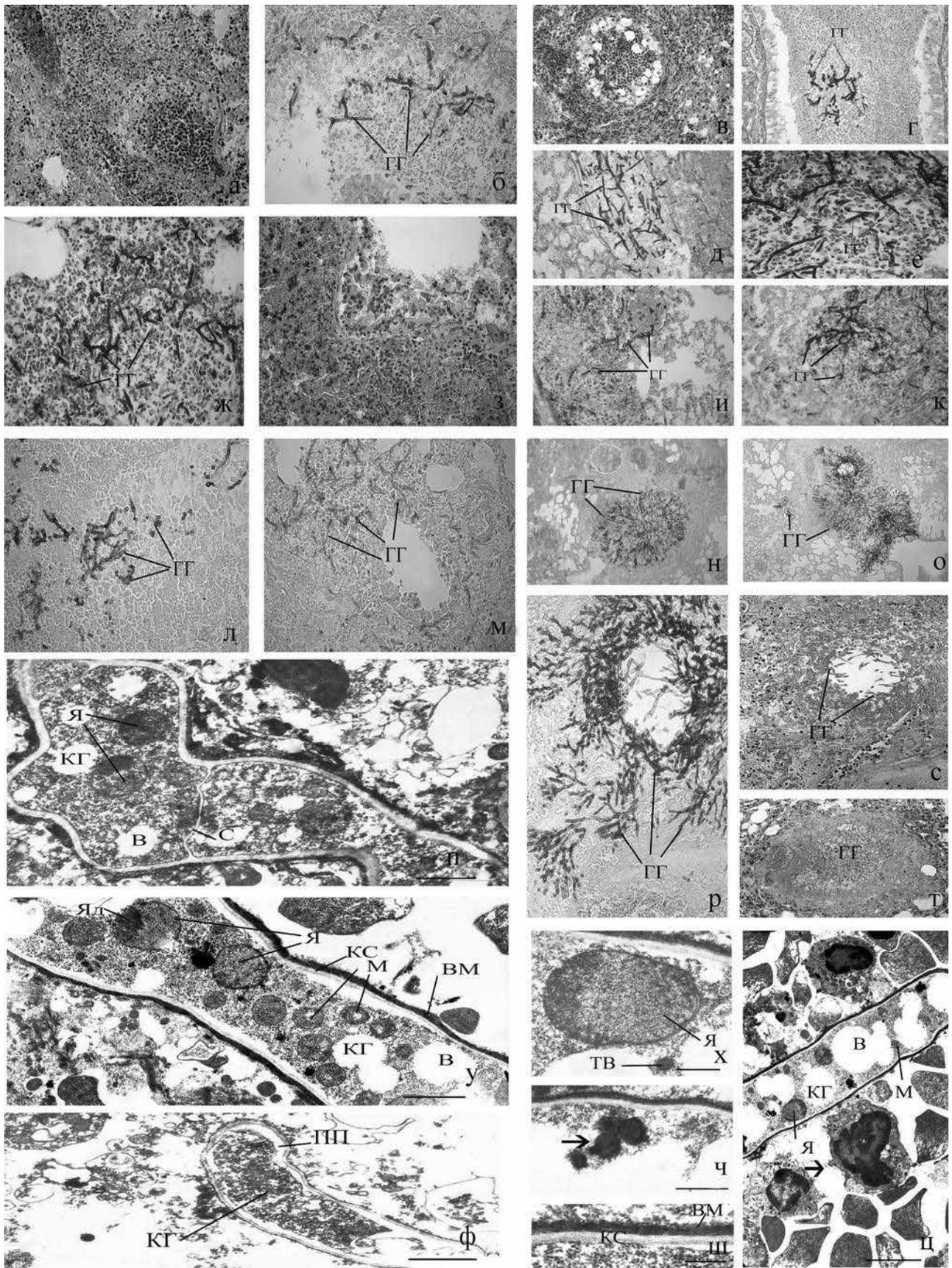


Рис. 1. Световая микроскопия фрагментов ткани легких мышей в варианте с гидрокортизоном (а, б). ж, з, л – 1-ая группа животных; м, в-е – 2-ая группа животных, к, л, м – 3-я группа животных, а, з – Г-Э, б, ж, к, л, м – Гомори-Грокотт. Ув.: а - д, р-о, р-т: х 400; е: х 500. Масштабные линейки: п, у, ф – 1 мкм, ж, з, х, ч, ш – 0, 2 мкм, к-м, к-м – 4 мкм, е, у – 3 мкм, ц – 1 мкм.

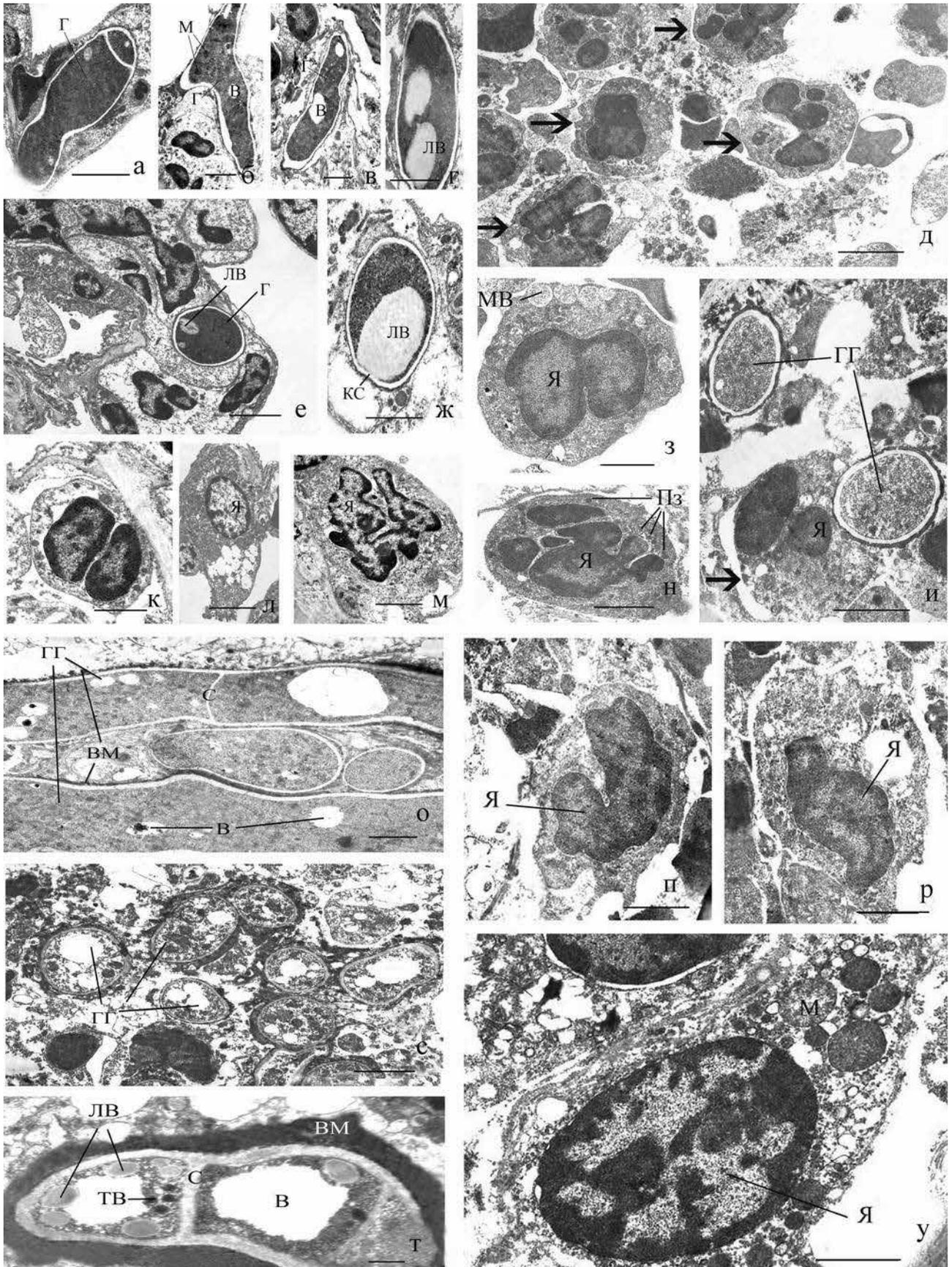


Рис. 2. Особенности тонкого строения гиф гриба и клеток иммунной системы в легких мышей после введения им гидрокортизона (а - г, и, д, к-м, н) и циклофосфана (г, о, е, и, р, у). Масштабные линейки: а, е, ж - и, к, л, о-р, у, т - 2 мкм, б, в, г, д - 3 мкм.

При окраске Г-Э для мышей **2-й группы** также было характерно венозное полнокровие. В 44% случаев (у 4-х животных из 9-ти) случаев имели место обширная геморрагическая пневмония (табл. 1, рис. 1 з), бронхопневмония с инфильтрацией многочисленными нейтрофилами, лимфоцитами и макрофагами, причем первые доминировали. Воспалительную реакцию наблюдали в легких 8-ми из 9-ти изученных животных. Часто отмечали прорастание гиф гриба через стенку бронха и картины грибкового бронхоолита (окраска по методу Гомори-Грокотта). В тканях легких мышей 2-ой группы (табл. 1) гифы гриба обнаружили у 7-ми из 9-ти исследованных животных. Только в 2-х случаях (мышь №12 и 19) гифы гриба были локализованы в просвете бронхов и сосудов (Рис. 1 д), тогда как во всех остальных случаях – еще и в тканях легких (Рис. 1 е). Несмотря на сходство в частоте встречаемости и морфологии гиф гриба данного варианта с предыдущим, значения их диаметра были значительно выше (в среднем, 6,41 мкм).

В **3-ей группе** у 5-ти из 7-ми (71%) изученных животных имела место обширная геморрагическая пневмония (табл. 1), бронхопневмония с инфильтрацией многочисленными нейтрофилами, лимфоцитами и макрофагами. Нейтрофилы доминировали. При окраске Г-Э гистологические изменения в тканях легких были сходными с описанными с двумя предыдущими вариантами эксперимента. Воспалительную реакцию в легких мышей анализируемой группы выявили в 6-ти из 7-ми случаев (86%) (табл. 1). Элементы гриба наблюдали у 4-х из 7-ми исследованных животных. Несмотря на варьирование числа гиф гриба в тканях легких мышей, среднее значение диаметра гиф было выше (7,2 мкм, Рис. 1 к). Гифы имели высокий контраст (хорошо окрашивались по методу Гомори-Грокотта). В ткани легкого мышей картины радиального роста гиф гриба отсутствовали. Гифы располагались одиночно или в небольших группах, рыхло, хаотично либо параллельно относительно друг друга.

В тканях легких мышей **4-ой группы** (окраска Г-Э) имело место венозное полнокровие. В 90% (у 10 из 11 исследованных животных) случаев отмечали обширную геморрагическую пневмонию (табл. 1) с инфильтрацией многочисленными нейтрофилами, лимфоцитами и макрофагами. Значительное число нейтрофилов в инфильтрате обнаружили в 9 из 11 изученных случаев. Довольно часто наблюдали картины инвазии гиф гриба через стенку бронха и картины грибкового бронхоолита. Только в одном случае (мышь №3) элементы гриба были микроскопически выявлены в ткани легкого, при этом высеять гриб не удалось. В ткани легких у 54% мышей элементы гриба встречали в малом количестве, тогда как у 36,3% животных число грибов оценивали как умеренное. При окраске по методу Гомори-Грокотта очаги радиального роста гриба отсутствовали. Гифы гриба, как правило, были расположены рыхло (Рис. 1 л), хаотично и довольно равномерно на площади среза легкого в области их локализации. Наблюдали одиночные или в небольших группах, короткие, сильно искривленные гифы; в основном, их обнаруживали в участках воспаления, а также внутри и вблизи бронхов. Часто наблюдали картины прорастания гиф гриба в сосуды и ткань легкого. Среднее значение диаметра гиф гриба – 4,33 мкм. Для

гиф гриба данного варианта было характерно слабое окрашивание по методу Гомори-Грокотта.

Мы выбрали для ТЕМ мышей 2-ой, 3-ей и 4-ой групп, в легких которых мы обнаружили гифы аспергилла, значительно различающиеся по диаметру. Частота встречаемости гиф гриба и особенности воспалительной реакции в этих вариантах были сходными.

В первом варианте (животные 4-ой группы) в ткани легких мышей встречали более узкие (4,3-4,8 мкм) гифы. В основном это были интактные клетки гиф. Гифы, как правило, были одиночные, короткие, сильно изогнутые (Рис. 1 п), с интерфазными ядрами, расположенными в центральной части клетки или вблизи клеточной стенки. Они были одиночными или попарно сближенными (Рис. 1 п), сферической (2,5 мкм) или эллипсоидной (2,0 x 2,5 мкм, Рис. 5 а) форм, слабо хроматизированными, с одним крупным (0,5 мкм) эксцентричным плотным ядрышком неправильной формы. Вакуоли в молодых гифах – мелкие или средних размеров (Рис. 1 п, у), равномерно распределены по площади клетки, одиночные или в небольших группах, светлые; в более зрелых гифах – крупные, занимают весь просвет клетки (Рис. 1 ц). Митохондрии многочисленные, равномерно распределены по площади среза клетки, одиночные, округлой (0,2-0,3 мкм) или эллипсоидной (0,2-0,3 x 0,3-0,4, Рис. 1 п, ц) форм. Матрикс органелл – довольно плотный, с большим числом крист и небольшой светлой зоной. Компоненты эндомембранной системы не выявлены. В умеренном количестве запасные вещества наблюдали в форме темных белковых глобул варьирующего диаметра (Рис. 1 ч), расположенных в небольших группах (от 2 до 5) вблизи клеточной стенки. Клеточная стенка – тонкая (0,2 мкм, Рис. 1 ш), однослойная, светлая, окруженная тонким (0,2-0,3 мкм) электронно-плотным матриксом. Крайне редко наблюдали гифы на разных стадиях деструкции (Рис. 1 ф), без содержимого или с плотным зернистым содержимым, лишенным органелл. В описываемом варианте эксперимента клетки иммунной системы в виде многочисленных нейтрофилов, обычно расположенных в тесных группах, реже – одиночных, были локализованы вблизи гиф гриба (Рис. 1 ц, стрелка). Из атрибутов секреторной активности в содержимом нейтрофилов как исключения обнаружены микровакуоли (Рис. 2 в) и пузырьки с темным содержимым.

Во втором варианте (животные 2-ой и 3-ей групп) в тканях легких мышей отмечали более широкие гифы аспергилла (7,0-7,9 мкм). По размерам и строению ядер, а также других компонентов цитозоля, клетки этих гиф не отличались от описанных выше. В клетках зрелых гиф присутствовали крупные (0,5-0,6 мкм) липидные включения (Рис. 2 г) умеренной электронной плотности. По строению клеточных стенок зрелые клетки гиф были сходны с аналогичными вышеописанного варианта, однако, они не несли внеклеточный матрикс. Клетки иммунной системы встречались часто и были представлены нейтрофилами (Рис. 2 к), макрофагами (Рис. 2 л) и лимфоцитами (Рис. 2 м) без цитологических признаков функциональной активности. Картины контакта или поглощения гиф гриба клетками иммунной системы отсутствовали.

В варианте с циклофосфаном в тканях легких мышей при окраске Г-Э наблюдали множественные очаги деструкции в бронхах, бронхиолах и альвеолах (Рис.

1 с, т). Зоны некроза с участками геморрагической пневмонии обнаружили только в тканях легких двух животных (№24 и 25). Очаги бронхопневмонии с наличием нейтрофилов были выявлены только у одного животного (№27).

Отмечали преимущественно лимфоцитарно-макрофагальную инфильтрацию с единичными нейтрофилами. При окраске по методу Гомори-Грокотта очаги микотической инфекции непосредственно в ткани легкого отмечали в 8 из 18 изученных случаев. Они многочисленные (от 6 до 16 на срезе, составляющие от 25 до 50% площади среза легкого), варьирующего диаметра (Рис. 1 н, о), чаще всего, крупные, округлой формы, с элементами радиального роста гиф аспергилла. Только у одного животного (№21) гифы гриба были сконцентрированы, в основном, в просвете бронхов, тогда как в ткани легкого они формировали редкие и мелкие очаги радиального роста. Морфометрические особенности и микроморфология гиф гриба анализируемого варианта (табл. 2) были сходны с выше приведенными для варианта с гидрокортизоном. Гифы в тканях легких мышей в данном опыте отчетливо окрашивались по Гомори-Грокотту и хорошо импрегнировались серебром (Рис. 1 н, о, р).

Таблица 2

Номера и группы животных, дата гибели после заражения, наличие элементов гриба, высевы, пневмонии и воспалительные реакции в тканях легких мышей после введения циклофосфана

№ животного	Сутки гибели животного после заражения	Диаметр гиф гриба (мкм)	Частота встречаемости гиф гриба в тканях легких мышей	Наличие посева из легких мышей	Наличие пневмонии в легких мышей	Наличие воспалительной реакции в легких мышей
12	2	5,0	5	19000	-	-
13	3	4,9	5	25000	-	-
14	3	4,7	5	900000	-	-
15	4	4,9	5	30000	-	-
16	4	-	-	-	-	-
17	4	-	-	-	-	-
18	4	-	-	-	-	-
19	4	4,6	5	23000	-	-
20	4	-	-	10000	-	-
21	4	4,8	5	17000	-	-
22	5	5,1	5	8000	-	-
23	5	4,8	5	7000	-	-
24	6	4,7	5	2900	+	-
25	9	4,6	5	2600	+	-
26	9	-	-	2600	-	-
27	9	-	-	-	-	-
28	9	-	-	80	-	-
29	9	-	-	100	-	-
Средние значения		4,81	5±0	74806 ± 23771,3		

Примечание. Концентрация конидий 1·10⁷ КОЕ/мл. Частота встречаемости гиф гриба: 0 - нет; 1 – редко в ткани легкого; 2 – мало в ткани легкого; 3 – умеренное в ткани легкого; 4 – много только в просвете бронхов; 5 – много в бронхах и мало в ткани легкого.

При электронно-микроскопическом изучении тканей легкого мышей (№ 14, 15, 23, 24, 25) в данном опыте были выявлены обильные скопления гиф гриба (Рис. 2 о, с), по их периферии обнаруживали концевые, апикально растущие сегменты гиф, для которых характерно наличие плотного цитозоля, митохондрий и многочисленных свободных рибосом. Вакуоли – редкие, мелкие, сосредоточенные у септ или вблизи скоплений митохондрий и небольшого числа ядер. Клеточные стенки – тонкие (0,15 мкм), однослойные,

светлые, со слабо развитым наружным внеклеточным матриксом. За апикальными сегментами гиф расположены слабо вакуолизированные (Рис. 2 о), а за ними – сильно вакуолизированные клетки (Рис. 1 с). В составе септального порового аппарата наблюдали мелкие темные тельца Воронина (Рис. 2 т), в зрелых клетках гиф – запасные вещества в виде скоплений светлых липидных капель (0,2-0,3 мкм, Рис. 2 т). В таких клетках гиф клеточные стенки были тонкими (0,2 мкм, рис. 2 т), однослойными, светлыми. Внеклеточный матрикс – хорошо развит, в 5-6 раз толще клеточной стенки. Из клеток иммунной системы в зонах скопления гиф грибов наиболее часто отмечали лимфоциты (Рис. 2 п, р), реже – одиночные или в группах макрофаги (Рис. 2 у). Клетки иммунной системы не содержали гиф гриба и не находились с ними в контакте.

Выявленное в световом микроскопе обилие клеток иммунной системы в легких мышей после введения им гидрокортизона не коррелировало с признаками их внутренней (активизация секреторных процессов) и внешней (поглощение элементов гриба) активности. Совершенно неожиданным был тот факт, что при видимой «количественной» активности клеток иммунной системы они не принимали участия в элиминации гиф патогенного гриба. Только в опыте с гидрокортизоном, где гриб формировал более узкие гифы, мы отмечали частые контакты клеток иммунной системы (лимфоцитов и нейтрофилов) с гифами гриба. Важным наблюдением в настоящем исследовании был тот факт, что введение мышам обоих иммуносупрессоров оказывало ингибирующее действие на количество и активность макрофагов, являющихся важными клетками иммунной системы, подавляющими развитие аспергилла в ткани хозяина.

В данной работе выявлены четкие различия в морфологии (топография, частота встречаемости гиф, их форма и средние значения диаметра) тканевых форм гриба одного вида и штамма аспергилла (*A. fumigatus*) на фоне введения мышам гидрокортизона и циклофосфана. Средние значения диаметров гиф гриба в тканях легких мышей первой группы при введении гидрокортизона и циклофосфана были минимальными, что соответствовало таковым, характерным для этого вида гриба в условиях культуры [2]. Средние значения диаметров гиф гриба у части 2-ой и всей 3-ей групп животных после введения конидий *A. fumigatus* в количестве 1·10⁵ КОЕ/мл и 1·10⁶ КОЕ/мл были максимальными. Это является показателем высокой пластичности гиф аспергилла и, в целом, мицелия гриба.

Проведенными исследованиями подтверждена общеизвестная [1; *Duong M., et al. // J. Infect. Des. – 1998. – Vol. 178; Елинов Н.П., Громова Э.Г. Современные лекарственные препараты, 2000*] роль клеток иммунной системы хозяина в развитии инвазивной формы аспергиллеза. Наличие в тканях легких мышей хорошо выраженной во всех вариантах эксперимента воспалительной реакции коррелировало со слабым развитием гиф гриба, имеющих морфологические признаки угнетенного состояния, тогда как отсутствие воспалительной реакции в варианте с циклофосфаном, создавало позитивный фон для активного развития микотической инфекции. Несмотря на то, что в опыте с гидрокортизоном воспалительную реакцию тканей легких мышей представляли всевозможные клетки иммунной

системы, среди них доминировали нейтрофилы. В то же время в эксперименте с циклофосфаном клетки иммунной системы наблюдали в меньшем количестве, и они были представлены, в основном, лимфоцитами. В целом, согласно полученным данным, циклофосфан, по сравнению с гидрокортизоном, оказывал более выраженное супрессивное действие на клетки иммунной системы. Результаты проведенных исследований согласуются с мнением Balloy V. с соавторами [1] в том, что степень и характер воспалительной реакции со стороны тканей хозяина играют значительную роль в патогенезе инвазивного аспергиллеза.

Установили, что при инфицировании иммуносупрессированных мышей в очагах воспаления появлялись клетки иммунной системы, количество и состав которых зависели от типа иммуносупрессора. Методами электронной микроскопии выявили отсутствие в таких клетках секреторной активности и картин поглощения гиф гриба.

Таким образом, гидрокортизон и циклофосфан оказывают существенное противоположное влияние и на ультраструктуру гиф клеток гиф *A. fumigatus*. В то же время нам удалось выявить влияние разных концентраций конидий инокулюма на тонкое строение клеток гриба, что пока трудно объяснить. Агрессивное влияние гидрокортизона на распространение грибной инфекции вызывало и угнетающее действие на развитие внеклеточного матрикса на поверхности зрелых гиф гриба. Напротив, на фоне циклофосфана бурное развитие грибной инфекции сопровождалось

формированием снаружи гиф хорошо развитого внеклеточного матрикса. Отметим, что внеклеточный матрикс начинает закладываться и формироваться уже с момента прорастания конидий *A. fumigatus* [3]. Его наличие характерно для культуральных [Степанова А.А. и др. // Пробл. мед. микологии. – 2004. – Т.6, №3] и тканевых форм этого вида гриба [4-5]. В тканях легких мышей и человека внеклеточный матрикс обычно достигает максимального развития, что связано с его протективной функцией. Интересен тот факт, что при хорошо выраженной воспалительной реакции (данные световой микроскопии) в опыте с гидрокортизоном взаимодействия между клетками иммунной системы и гифами аспергилла были выражены исключительно в форме межклеточных контактов.

В результате настоящей работы установили существенные различия между особенностями макро- и микроморфологии клеток гиф изученного вида и штамма патогенного гриба *A. fumigatus* при введении мышам разных иммуносупрессоров – гидрокортизона и циклофосфана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенными исследованиями показана высокая пластичность морфологических и ультраструктурных особенностей строения клеток гиф изученного штамма *A. fumigatus*, за исключением септ и порового аппарата, под влиянием гидрокортизона и циклофосфана, которые вызывали совершенно противоположное действие на эти признаки.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Balloy V., Huerre M., Latgè J.P., Chignard M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis // Infect. Immunol. – 2005. – Vol. 73, №1 – P. 1-15.
2. Степанова А.А., Васильева Н.В., Борзова Ю.В. и др. Электронно-микроскопическое изучение аспергиллеза легких человека на примере архивного материала // Пробл. мед. микологии. – 2014. – Vol. 16, №3. – С. 70-79.
3. Stepanova A.A., Sinitzkaya I.A. Cytological investigations of *Aspergillus fumigatus* Fres. germinating conidia // Пробл. мед. микологии. – 2012. – Т. 14, №2. – С. 43-53.
4. Степанова А.А., Босак И.А., Сеницкая И.А. Цитологическое исследование *Aspergillus fumigatus* Fres. в легких мышей // Пробл. мед. микологии. – 2013. – Т. 15, №1. – С. 52-58.
5. Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Zhang F., et al. Electron-microscopic investigations of invasive aspergillosis, caused with *Aspergillus fumigatus* // Пробл. мед. микологии. – 2015. – Т. 17, №3 – С. 38-41.

Поступила в редакцию журнала: 25.11.2016

Рецензент: Н.П. Елинов



УЛЬТРАСТРУКТУРА СТАРЕЮЩИХ И ОБЕЗВОЖЕННЫХ КЛЕТОК *CRYPTOCOCCUS* *NEOFORMANS*

¹Степанова А.А. (зав. лаб.), ¹Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой), ²Ямагучи М. (главный специалист), ²Чиба Х. (профессор)

¹ НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; ² Центр исследований по медицинской микологии, Университет г. Чиба, Япония

© Коллектив авторов, 2016

Методами световой, сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии были изучены клеточные и субклеточные аспекты морфогенеза и старения клеток 16 штаммов *Cryptococcus neoformans*. Показано, что основная модель морфогенеза клеток в пределах культуры протекает по типу «веера». Детально изучен процесс старения дрожжевых клеток на ультраструктурном уровне. Впервые представлены данные об ультраструктуре обезвоженных дрожжевых растущих *in vitro* клеток культур *C. neoformans*.

Ключевые слова: *Cryptococcus neoformans*, морфогенез, обезвоженные и стареющие дрожжевые клетки, *in vitro*, ультраструктура

ULTRASTRUCTURE OF SENESCENT AND DESICCATED CELLS OF *CRYPTOCOCCUS* *NEOFORMANS*

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

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

© Collective of authors, 2016

Using light, scanning and transmission microscopy, the cellular and sub-cellular aspects of pattern of morphogenesis and senescence of the 16 strains cells of *C. neoformans* were investigated. It was shown that the general pattern of cell morphogenesis inside culture was «fan-like». The process of yeast cell senescence on ultrastructural level was studied in detail. For the first time the data about the ultrastructure of desiccated yeast cells of *in vitro* growing *C. neoformans* cultures were presented.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, desiccated and senescent yeast cells, *in vitro*, morphogenesis, ultrastructure

INTRODUCTION

Senescence is the final stage of cell morphogenesis. Before this the cellular and sub-cellular aspects of fungal cell senescence was investigated on several species of fungi imperfecti [*Molitoris* H.P. // Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven. – 1974. – Vol. 5], discomycetes [*Kamaletdinova* F.I., *Vasilyev* A.E. Cytology of Discomycetes, 1982.], basidiomycetes [*Stepanova* A.A., *Vasilyev* A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994], euromycetes from genus *Aspergillus* [1] and *Trichophyton* [2]. Cellular and sub-cellular aspects of this process of *C. neoformans* were unknown, but their knowledge may be very important because they can be considered as a «control» for future determination *in vitro* and *in vivo* experiments on the cellular mechanisms of influence of host cells and drugs on the structure of this fungal cells.

The purpose of the work was to study the cellular pattern *in vitro* morphogenesis, the ultrastructure of senescent and desiccated *C. neoformans* cells.

MATERIALS AND METHODS

16 strains (PKIIIY–719, 881, 1063, 1067, 1085, 1088, 1091, 1093, 1095, 1105, 1165, 1166, 1175, 1176, 1178, 1180) of *C. neoformans* (Russian Collection of Pathogenic Fungi, Kashkin Research Institute of Medical Mycology) were isolated from patients and cultured *in vitro* (Sabouraud's agar, 3 days after sowing, 37 °C). Virulence of strains was determined previously [3] (LD-50 after intravenous injection varied from 8·10² to 1·10⁷ cells/mouse). Strains with LD-50 10²-10⁴ were considered as strongly virulent, with LD-50 10⁵-10⁶ - moderately virulent and with LD-50 more than 10⁶ - low virulent. The diameter of mature *in vitro* growing *C. neoformans* cells was determined under the light-microscope using Indian ink. These measurements were carried out on 100 mature cells.

For light and electron microscopy the pieces of solid nutrient medium with part of fungal colonies was fixed with using glutaraldehyde-osmium in 0,1 M cacodylate buffer according the methods which we published previously [3]. For light microscopy semi-thin sections (3-5 μm) were cut on the Pyramitome 1180 (LKB) and colored with toluidine blue. Ultrathin sections we cut on Ultratome LKB V, stained with uranyl acetate (10 minute) and lead citrate (5 minute) and examined under JEM 100 CX. For scanning electron microscopy samples were fixed in 3 % glutaraldehyde (on 0,1 M cacodylate buffer), dehydrated in series of ethanol (30°→70°), critical-point dried for 15 min, and then evaporated with gold and investigate under JSM 35. The measurements of the mean diameter of desiccated cells and its walls thickness under TEM were carried out on 20-25 cells of *C. neoformans* with using program Statistics v 6,0.

RESULTS

Cellular aspects of senescence. In the light microscope at the cross semi-thin epoxy sections of *C. neoformans* colonies, colored with toluidine blue, was visible alternation of longitudinal and radial oriented dense (Fig.1 a, 1, 2) and the light areas (Fig.1 a, 3), which organized as a result of differences in the density of concentration of the fungal yeast cells.

Dense zones of two types: 1) a wedge-shaped (expanded to the margin of the colonies (Fig.1 a, 1) and extending

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

from the center of the colony to the marginal part, and 2) more thin (Fig.1 a, 2) young strips with the same thickness of radially oriented aggregation of yeast cells with different lengths, as a rule, localized in the lower half of the colony. Between these dense zones of yeast cells concentration was localized more light wedge-shaped area (Fig.1 a, 3), in which the density of the yeast cells was noticeably lower than that of the above. Alternation of dense (Fig.1 b, 1) and light areas (Fig.1 b, 2) were clearly revealed and on a cross sections of semi-thin epoxy sections.

The study of fungal cultures in the scanning electron microscope (Fig.1 c, d) also revealed the presence of the above described areas. The dense areas (Fig.1 c) was represent the budding, growing and mature yeast cells, while the light – on different stages of senescence, dead and desiccated (Fig.1 d) cells. The described cellular pattern of in vitro *C. neoformans* morphogenesis we term as «fan-like».

Desiccated (dormant) yeast cells. The origin of desiccated yeast cells for in vitro growing *C. neoformans* may be possible in 2 ways: 1. directly from the daughter cell after its separation from the mother one; 2. from mature yeast cells. Scanning electron microscopy shows evidence of the presence part of polysaccharide capsule (Fig.1 d, e) around the developing desiccated yeast cells. The formation of this type of cells was accompanied with its dehydration, decrease in size and encapsulated after which they transit in the state of dormancy and represent the infection propagules. The sizes of desiccated yeast cells varied from 2.60 to 3.67 μm depending on the strain. (Table). Desiccated yeast cells we identify in 11 from 16 investigated strains cultures (70 % from the total number of studied strains). From these 11 strains – 4 were strong (PKПГУ – 1088, 1105, 1166, 1175), 3 medium (PKПГУ – 1063, 1067, 1176) and 3 low virulent (PKПГУ – 719, 881, 1165, 1178).

Table

The mean values of diameter and cell walls (μm) of desiccated and mature yeast cells of *C. neoformans*

Strain	Diameter of desiccated yeast cells	Cell wall thickness of desiccated yeast cells	Diameter of mature yeast cells	Cell wall thickness of mature yeast cells
719	2,90	0,45	6,32	0,40
881	2,60	0,57	6,00	0,37
1063	3,00	0,60	5,82	0,43
1067	3,50	0,50	7,43	0,18
1088	2,60	0,43	5,10	0,21
1105	3,00	0,39	7,28	0,21
1165	3,67	0,70	6,75	0,12
1166	3,30	0,56	6,65	0,14
1175	2,90	0,47	6,57	0,42
1176	3,00	0,59	5,85	0,21
1178	3,50	0,48	7,64	0,23

Comparison of the mean diameter of desiccated and mature yeast cells of investigated *C. neoformans* cultures was revealed (Table) that they are in 2 times more less that mature cells of the same strain. The thickness of the cell wall of desiccated and mature yeast cells does not vary (strains 719 and 1175) or in several (from 1,4 to 5,8) times greater for the first one. In fig. 2 we presented the diagram, which illustrated the significant differences in the mean value of cell diameter (a) and wall thickness (b) in mature and desiccated yeast cells of *C. neoformans*.

As can be seen in the scanning electron microscope, dehydration of such types of cells was accompanied by the separation of their cell wall from their polysaccharide capsules, the upper half of which completely undergo lysis during which the fungal cells became naked (*C. neoformans* strip-tease) (Fig.1 d, e). The completely developed desiccated yeast cells have a smooth surface (Fig.1 e).

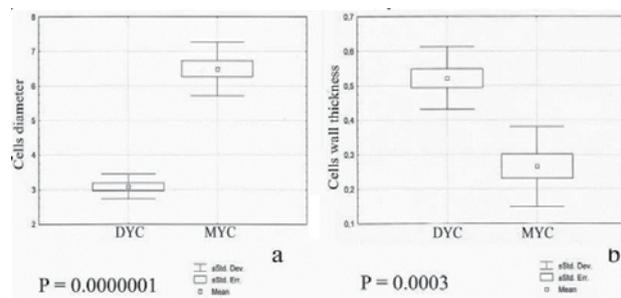


Fig. 2. Diagram which illustrated the mean value of cell diameter (a) and wall thickness (b) in mature and desiccated yeast cells of *C. neoformans*. DYC, desiccated yeast cells, MYC, mature yeast cells.

Thus, it is obvious that desiccated yeasts cells (infectious propagules) could leave the fungal colony and distribute by air flows. There was evidence of presence in senescent parts of colonies the devastated «half» from the once full developed polysaccharide capsules (Fig.1 f).

The cytosol of mature desiccated yeast cells was so dense that the nucleus and cytoplasm components were identified with difficulty (Fig.1 g, h, k) or not detected (Fig.1 j). It was possible to identify only storage substances in the form of variable morphology fibrosinous bodies (Fig.1 g, l), lipid inclusions (Fig.1 m) and glycogen granules (Fig.1 j, m). Another distinctive feature of the ultrastructure of these cells was the presence of a thick (Table; Fig.1 g-m, Fig.3 d-f) cell wall. The cell wall could be a single-layer dark homogeneous (Fig.3 d), two-layer dark with a more subtle and loose outer layers (Fig.3 e), and three-layered with a thin dark homogeneous inner (Fig.3 f, 1), less dense thick homogenous middle (Fig.3 f, 2) and thin dark fibrillar outer layers (Fig.3 f, 3). These types of the cell wall ultrastructure correspond to the three types of structure of bud scar (an integral part of the cell wall, Fig.3 a-c, arrow) with 3 different anatomical patterns.

Subcellular aspects of senescence. The senescence processes of the *C. neoformans* cells occurred after the formation of large light central vacuole (Fig.3 g, m) and were accompanied by a reduction of cytosol volume, an increase in electron density, and the reduction of organelles and free ribosomes numbers. Frequently we observed the local autolysis, during which areas of cytosol with organelles, free ribosomes and storage substances occur into the vacuolar contents by formation of tonoplast invaginations (Fig.3 m, arrows), which then isolated inside vacuoles as vesicles which undergo disruption. Negative contrast frequent was typical for nucleus and membranes of organelles (Fig.3 g). It was important to note that the first senescence changes in some cells occur in the nucleus structure (Fig.3 h, arrow), in other mitochondria (Fig.3 i, arrow), and in some cases in both types of these cells components.

The nucleoplasm was fully clarified (Fig.3 j, arrow). Chromatin was organized in dark homogeneous shapeless dark masses of variable morphology, which localized near the nucleolar envelope (Fig.3 j). Nucleolus decreased in size, granular component disappeared (degranulation), became

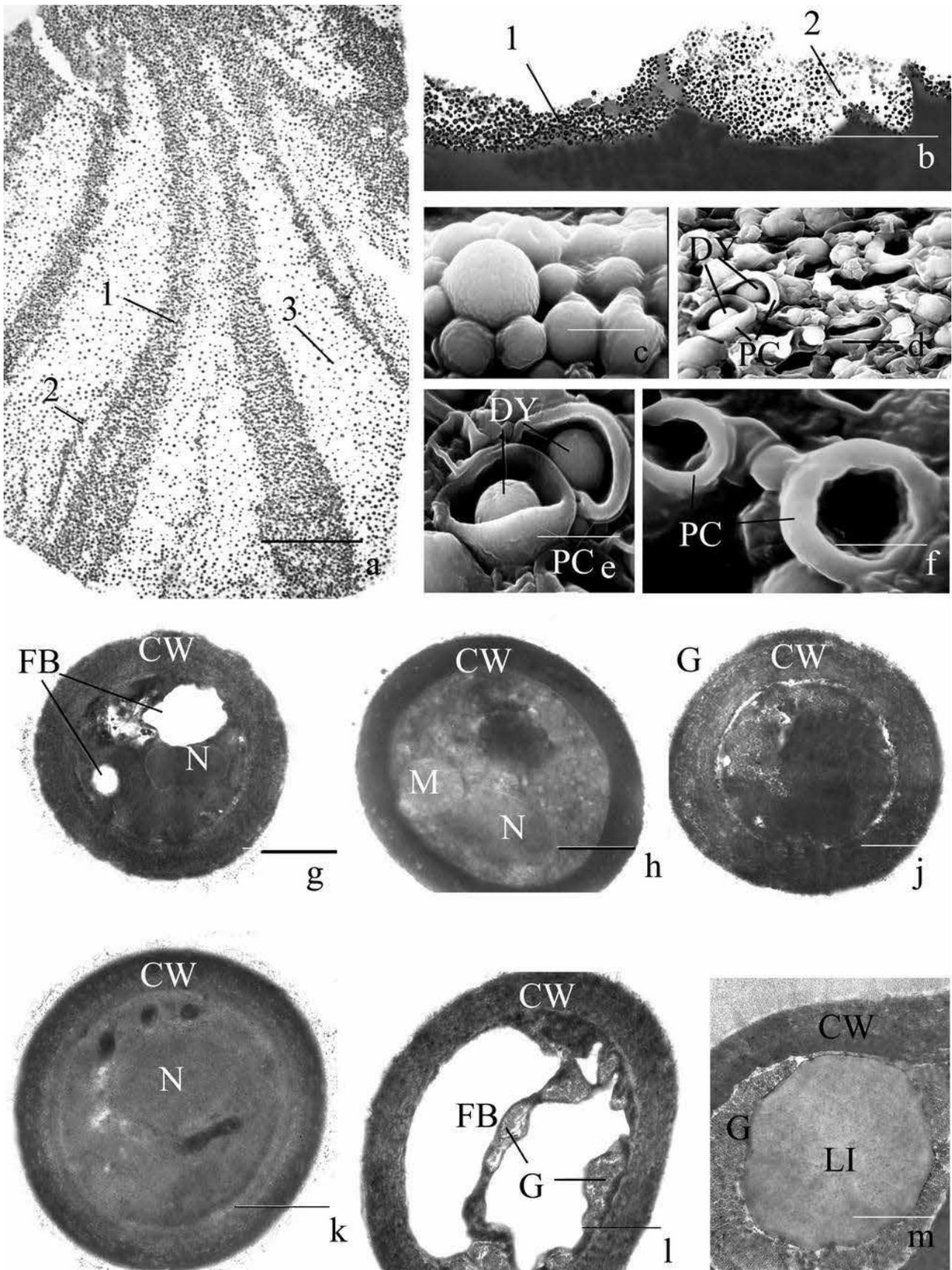


Fig. 1. Semi-thin longitudinal (a), transverse (b) sections and scanning electron micrographs of 3-old cultures of *C. neoformans*. Ultrathin sections (g-m) of desiccated yeast cells of *C. neoformans*. CW, cell wall; DY, desiccated yeast; FB, fibrous bodies; G, glycogen; LI, lipid inclusion; M, mitochondrion; N, nucleus; PC, polysaccharide capsule. The numerations (b) indicate the dark and light zones in fungal colonies. a, b, strain РКПГУ-1178; c-f, strain РКПГУ-1063; g, strain РКПГУ-719; h, strain РКПГУ-1063; j, strain РКПГУ-1165; k, strain РКПГУ-1088; l, strain РКПГУ-1178; m, strain РКПГУ-1105. Bars: a – 2 mm, b – 1 mm, c, e, f – 3 μ m, d – 6 μ m, g – m – 0,6 μ m.

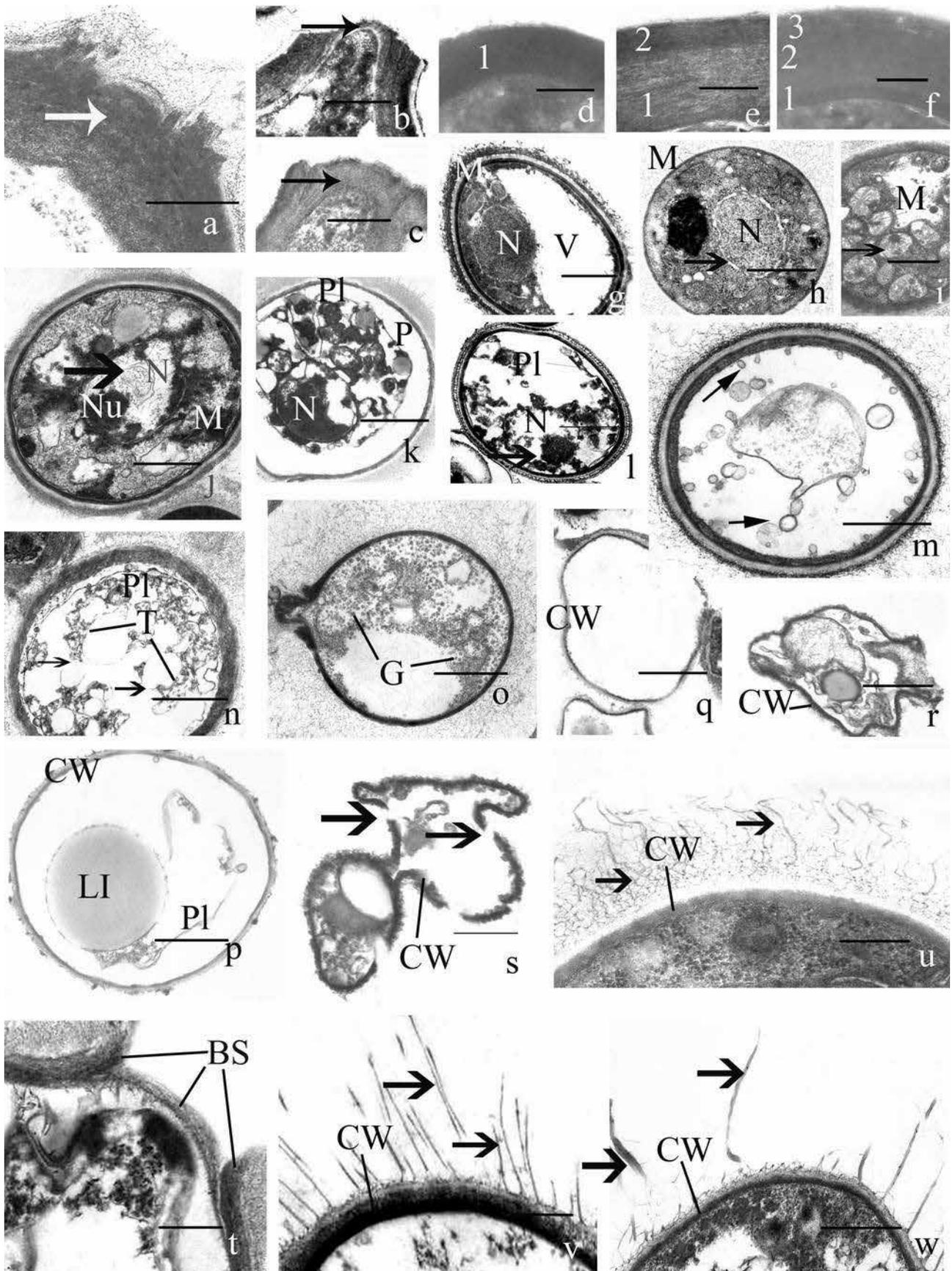


Fig. 3. Ultrastructure of bud scar (a-c), cell walls (d-f) of mature desiccated yeast cells and ultrastructure of senescent cells of *C. neoformans* (g-w). CW, cell wall; G, glycogen; LI, lipid inclusion; M, mitochondrion; N, nucleus; Nu, nucleolus; BS, bud scar; P, periplasmic space; PI, plasma membrane; T, tonoplast. The numerations (d-f) indicate the cell wall layers. a, d, n, strain РКПГУ-1080; b, e, strain РКПГУ-1165; c, f, strain РКПГУ-1067; g, strain РКПГУ-719; h, o, strain РКПГУ-881; i, k, strain РКПГУ-1091; l, m, strain РКПГУ-1105; q, r, u, strain РКПГУ-1180; p, s, t, strain РКПГУ 1176; v, strain РКПГУ-1063; w, strain РКПГУ-1093. Bars: a, d-f – 0,2 µm; b, c – 0,5 µm; g-i, l, n-f, s – 1 µm; j, k, m – 1,5 µm; t, u, v, w – 0,5 µm.

more contrast and irregular in shape. Disappearance of nucleolus takes places after the complete lysis of chromatin (Fig. 3 l). Periplasmic space was more wide, lighter and irregular (Fig. 3 k).

The grouped mitochondrial orientation disappeared. In the content of senescent mitochondria often the large dark irregular in shape zones was revealed (Fig. 3 i, arrow). Contents of mitochondrial cristae and between the outer and inner membranes became lighter (Fig. 3 j). Then cristae undergo swelling, reduced in size and number. In some mitochondria matrix clarify locally, while in other, they disappeared completely. Then cristae also disappeared. These changes were accompanied by mitochondrial swelling, whose form became irregular. After the complete cristae destruction and internal envelope membranes, these organelles transformed into small, irregular shaped vacuoles (Fig. 3 j).

Tonoplast of large and small vacuoles later broke (Fig. 3 n, arrows), which resulted in the release of hydrolytic enzymes in the cytoplasm and subsequent autolysis of the cell. Despite the fact that in senescent cells the first changes were observed in the structure of the nucleus and mitochondria, however, they, together with plasma membrane (Fig. 3 l) and storage substances (Fig. 3 o, p) long time identified in cells without cytosol.

Cisterns of endoplasmic reticulum became more irregular and disintegrated into numerous vesicular elements. Membranes of peroxisomes became more undulate; in its matrix local light zones were revealed. Soon the peroxisome membrane broke and its contents appeared in the cytoplasm.

In some cells, granules of glycogen reduced in number and subsequently undergo hydrolysis. In these parts of cytosol became obvious in the light area, as a rule, imitating the form of glycogen's rosettes. In other cells glycogen was detected in the later stages of senescence – in cells without cytosol and organelles (Fig. 3 o).

Lipids inclusions, fibrosinous bodies, polyphosphate granules in vacuoles, cytosol and mitochondria decreased in number and size. Lipid inclusions were often observed in completely dead cells (Fig. 3 p).

Plasma membrane remained in the cell until the complete destruction of its contents (Fig. 3 p) and obtained irregular shape (Fig. 3 n), gradual reduced in length and moved to the central part of the cell (Fig. 3 k), where broke up into fragments (Fig. 3 l), which undergo subsequent vesiculation. Exactly after its destruction the process of cell death comes to the end.

Typically for the cell wall thinning (Fig. 3 o, p, q, r) and contrast reducing led to the fact that it lost its form and became irregular (Fig. 3 r, s). These changes began and took place simultaneously with changes in the internal contents of the cells. In the walls of cells, practically without content appear local gaps (Fig. 3 s, arrows), leading to its break-up into multiple fragments. The cell walls of kept for long time typical for its size and structure (Fig. 3 t).

Destructive changes in ultrastructure of polysaccharide capsules occurred synchronously with those taking place in the structure of the cell wall. At that the microfibrills (Fig. 3 u, v, w, arrows) of polysaccharide capsules became rare, short, poorly contrasting, strongly deformed and eventually completely revealed the cell wall.

DISCUSSION

It is known that the infectious propagules for many human fungal pathogens to be spores, but some author [4] hypothesized that in case with *C. neoformans* it may be desiccated yeast cells also. Another numerous studies [5; Neilson J.B., et al. // Infect. Immun. – 1977. – Vol. 17; Casadevall A., Perfect J. *Cryptococcus neoformans*, 1998; et al.] reveal that small, desiccated, encapsulated *C. neoformans* yeast could be recovered from soil. In some work specific role of spores in the pathogenesis of this fungi was not addressed [Sukroongreung S., et al. // Med. Mycol. – 1998. – Vol. 36; Zimmer B.L., et al. // Mycopathologia. – 1984. – Vol. 85]. Ruiz A.R. et al. [Ruiz A., et al. // Infect. Immun. – 1981. – Vol. 31] reported that 7.5% of the viable airborne the *C. neoformans* cells in aerosolized pigeon droppings were from 1.1 to 3.3 μm in diameter, what intimate with our data about diameter of desiccated yeast of this fungal species. At the same time, as it was known [3; Ruiz A., et al. // Infect. Immun. – 1981. – Vol. 31], the size of the mature *C. neoformans* yeast cells was bigger and range from 4 to 20 μm .

According to our unpublished data [6], some of the studied strains of *C. neoformans* are capable to develop desiccate yeast cells in the lungs and brain of murine after 7 days of experiments. In our opinion they can be initiated the secondary infectious process in host tissue and ability of strains quickly form large number of «generative population» in vitro and in vivo can be considered as one of the factors of its potential virulence.

We expect that *C. neoformans* «fan-like» cellular in vitro pattern of morphogenesis may be typical for another species of yeast. The whole described subcellular aspects of *C. neoformans* senescence was very similar to the case presented for discomycetes [Kamaletdinova F.I., Vasilyev A.E. Cytology of discomycetes, 1982], basidiomycetes [3], species from genus *Aspergillus* [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994] and *Trichophyton* [2], what be evidence of some conservatism in this final stage of fungal morphogenesis.

RESUME

1. The described cellular pattern of in vitro *C. neoformans* morphogenesis we term as «fan-like». In the lower part of colonies new strips composed from developing yeast cells were formed during colony grows.

2. A characteristic ultrastructural feature of senescing *C. neoformans* cells was the fact that in some in vitro growing cells first destructive processes affect the nucleus, in other – mitochondria, and in third – nucleus and mitochondria. Subsequent changes to the structure of the cells were quite similar.

3. The completely developed desiccated yeast cells in vitro have a smooth surface and range the size from 2,60 to 3,67 μm depending on the strain numeration. They have ultrastructure of dormant cells and possess with thick cell walls and dark cytosol.

REFERENCES

1. Stepanova A.A., Sinitzkaya I.A. Ultrastructural aspects of cells senescence of some *Aspergillus* species // Проблемы медицинской микологии. – 2009. – Т. 11, №4. – P. 24-29.
2. Savitskaya T.I., Stepanova A.A., Sinitzkaya I.A., Krasnova E.V. Ultrastructural aspects of senescence of the vegetative mycelium cells of some *Trichophyton* species // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Vol. 13, №2. – P. 106.
3. Vasilyeva N.V. The pathogenic factors of *Cryptococcus neoformans* and its role in pathogenesis of cryptococcosis: Dissert. of Ph.D. – St. Petersburg, 2005. – 340 p.
4. Velagapudi R., Hsueh Y-P, Geunee-Boyer S., et al. Spores as infection propagules of *Cryptococcus neoformans* // Infect. Immun. – 2009. – Vol. 77. – P. 4345-4355.
5. Giles S.S., Taylor R.T., Dagenais R.T., et al. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* // Infect. Immun. – 2009. – Vol. 77. – P. 3491-3500.
6. Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Yamaguchi M., et al. Ultrastructural patterns of the interactions between the murine lung macrophages and the yeast cells of the *Cryptococcus neoformans* with different virulence // In press.

Поступила в редакцию журнала 07.11.2016

Рецензент: Н.П. Елинов



ВЗАИМООТНОШЕНИЯ CANDIDA С ЭНТЕРОКОККАМИ НА УРОВНЕ ВАГИНАЛЬНОГО БИОТОПА

**Александрова Н.А. (аспирант кафедры)*,
Заславская М.И. (профессор кафедры)**

Нижегородская государственная медицинская академия
(кафедра микробиологии и иммунологии), Нижний
Новгород, Россия

© Александрова Н.А., Заславская М.И., 2016

Выявлена обратная корреляция между количеством *Candida* и энтерококков в вагинальном содержимом у женщин. Зависимость между титрами *Candida* и лактобактерий в том же биотопе не обнаружена. Было установлено, что продукты метаболизма энтерококков подавляют колонизацию *Candida albicans* в вагинальной полости у крыс с вагинальным кандидозом.

Ключевые слова: вагинальный кандидоз, *Candida*, лактобациллы, энтерококки

INTERRELATION OF CANDIDA WITH ENTEROCOCCI IN VAGINAL BIOTOPE

**Alexandrova N.A. (postgraduate student of the
chair), Zaslavskaya M.I. (professor of the chair)**

Nizhny Novgorod State Medical Academy (Chair of
microbiology and immunology), Nizhny Novgorod, Russia

© Alexandrova N.A., Zaslavskaya M.I., 2016

An inverse correlation between the number of *Candida* and enterococci in the vaginal content of women has been revealed. The correlation between the titers of *Candida* and lactobacilli in the same biotope was not detected. It was found that the products of metabolism of enterococci inhibit colonization of *Candida albicans* in the vaginal cavity of rats with vaginal candidosis.

Key words: *Candida*, enterococci, lactobacilli, vaginal candidosis

ВВЕДЕНИЕ

Среди оппортунистических микозов, вызываемых грибами рода *Candida*, постоянно отмечают высокий уровень вагинального кандидоза у женщин детородного возраста [1, 2]. Известно, что на присутствие *Candida* на слизистых оболочках может оказывать влияние качественный и количественный состав микробиоты [3]. По данным научной литературы, доминирующими представителями вагинальной микробиоты являются лактобациллы, способные подавлять рост оппортунистических патогенов [4]. К вторичным представителям микробиоты влагалища относят представителей родов *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Ureaplasma*, семейства *Enterobacteriaceae* и пр. [2, 5], однако их вклад в обеспечение колонизационной резистентности слизистой оболочки влагалища менее изучен. Известно, что энтерококки, являющиеся представителями нормальной вагинальной микробиоты и способные выделять бактериоцины, подавляющие рост различных микроорганизмов, используют в производстве пробиотических препаратов [6]. Эта способность энтерококков активно противостоять

другим микроорганизмам в биоценозе послужила стимулом для исследования взаимоотношения *Candida* с бактериями рода *Enterococcus* на уровне вагинального биотопа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали вагинальное содержимое у женщин (18-35 лет), проходящих амбулаторное обследование на базе гинекологического отделения ООО «Клиника современных технологий «Садко»». Полученный материал засеивали на плотные среды Сабуро и «энтерококк агар» по методу Дригальского (0,1 мл и 0,05 мл вагинального содержимого соответственно), а также на жидкую среду MRS (deMan, Rogosa and Sharpe), куда вносили в пробирку по 0,5 мл из разведений (10^{-3} и 10^{-5}) нативного (10^{-1}) материала. Посевы инкубировали (37 °C, 48 ч), после чего подсчитывали количество выросших колоний *Candida* и энтерококков. Вычисляли количество КОЕ в 1 мл нативного материала по формуле: $x = a \times 10^{n+1}$, где x – количество микроорганизмов в 1 мл нативного материала, a – количество выросших колоний, n – степень разведения. Для определения титра (степень обсемененности) лактобацилл в вагинальном содержимом оценивали наличие роста бактерий в пробирках с MRS с различным разведением нативного материала (10^{-3} и 10^{-5}), для чего из осадка бульонных культур готовили мазки, которые окрашивали по методу Грама. В статистическом корреляционном анализе участвовали лишь те образцы вагинального содержимого, которые соответствовали критериям: 1) наличие *Candida*; 2) наличие энтерококков; 3) наличие *Candida* и энтерококков. Видовую идентификацию микромицетов проводили на HiChrome агаре (Индия), энтерококков – с помощью наборов для биохимической идентификации Эн-коккус тест (Erba Lachema, Чехия) согласно инструкции фирмы-производителя.

Моделировали вагинальный кандидоз на белых беспородных крысах-самках (30 особей). Чистую культуру *C. albicans* штамм 601 получали на агаре Сабуро (37 °C, 24 ч). В работе использовали чистую культуру *E. faecium* L-3 (штамм предоставлен ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург), выращенную на мясо-пептонном агаре (МПА) (37 °C, 24 ч), и супернатант бульонной культуры (среда ТСБ / триптонно-соевый бульон; 37 °C, 24 ч) того же штамма. В вагинальную полость крыс вводили 0,2 мл суспензии *Candida* (10^9 кл/мл) [7].

Через 2 суток после заражения крыс грибами животным вводили в вагинальную полость 0,1 мл очищенного центрифугированием супернатанта бульонной культуры *E. faecium* L-3 (группа животных № 1) или суспензию живых энтерококков (10^9 кл/мл) (группа животных № 2). Внутривагинальное введение энтерококков осуществляли ежедневно на протяжении 7 дней. В контрольной группе животных (группа №3) для интравагинального введения применяли стерильный бульон ТСБ. Каждые 2 суток выполняли забор содержимого вагины тампоном в пробирку с 1 мл стерильного ЗФР. Материал ресуспендировали, затем 0,1 мл суспензии засеивали на агар Сабуро. Посевы инкубировали (37 °C, 24 ч) и производили подсчет выросших колоний *C. albicans* на чашках Петри.

Взаимосвязь параметров оценивали методом корреляционного анализа, определяя коэффициент ран-

* Контактное лицо: Александрова Наталья Александровна, e-mail: natalyuskova@rambler.ru

говой корреляции Спирмена (r_s). Силу корреляционной связи выявляли по значению r_s : ниже 0,3 считали слабой, от 0,3 до 0,7 – средней и от 0,7 до 1,0 – сильной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Был проведен микробиологический анализ содержимого влагалища, полученного от 552 женщин детородного возраста с дисбиозом влагалища различной этиологии. Для исследования были отобраны 399 вагинальных образцов, в которых выявляли *Candida* spp. и/или энтерококки. В клиническом материале от 205 женщин (51%) были обнаружены *Candida* spp. в разных титрах: 108 образцов имели концентрацию до 10^4 КОЕ/мл, 72 – свыше 10^4 и до 10^5 КОЕ/мл, 25 – свыше 10^5 КОЕ/мл. При этом из 95% образцов была выделена *C. albicans*. Энтерококки выявили у 235 женщин (59%): в 50 случаях – в пределах нормы (до 10^3 КОЕ/мл), в 128 – от 10^3 КОЕ/мл до 10^5 КОЕ/мл, в 57 – свыше 10^5 КОЕ/мл.

При анализе вагинального содержимого отмечали, что в отсутствие энтерококков, в 52% случаев количество *Candida* spp. было до 10^4 КОЕ/мл, а в 48% – превышало это значение (из них в 7% – выше 10^6 КОЕ/мл) (табл. 1).

Таблица 1

Средний процент встречаемости *Candida* в вагинальном содержимом у женщин при различных титрах энтерококков

титр <i>Enterococcus</i> spp.	титр <i>Candida</i>			
	отсутствие <i>Candida</i>	до 10^4 КОЕ/мл	$10^4 - 10^5$ КОЕ/мл	10^6 КОЕ/мл и выше
отсутствие энтерококков	-	52%	41%	7%
до 10^3 КОЕ/мл (норма)	79%	13%	8%	-
свыше 10^3 КОЕ/мл	89%	6%	5%	-

При наличии в вагинальном содержимом энтерококков в норме (до 10^3 КОЕ/мл) у 79% женщин микромицеты отсутствовали, у 13% – не превышали 10^4 КОЕ/мл и только у 8% – были $>10^4$ КОЕ/мл и до 10^6 КОЕ/мл.

При повышении количества энтерококков свыше 10^3 КОЕ/мл у 89% пациенток грибы отсутствовали, что было несколько выше, чем при нормальной концентрации энтерококков в том же биотопе, у 6% – концентрация *Candida* не превышала 10^4 и у 5% – была выше 10^4 КОЕ/мл.

Обратная зависимость между количеством микромицетов и энтерококков в вагинальном содержимом показана на рисунке 1. Видно, что при повышении титра энтерококков количество *Candida* стремилось к нулю.

Был проведен корреляционный анализ полученных данных для выборок с распределением, отличным от нормального, методом Спирмена. Коэффициент корреляции по Спирмену (r_s) составил -0,66, что говорит об обратной зависимости и средней силе корреляционной связи между популяциями энтерококков и *Candida*.

Таким образом, полученные результаты служат показателем антагонистических взаимоотношений между энтерококками и грибами, что проявляется в подавлении размножения последних на фоне нормальной или повышенной концентрации энтерококков во влагалище у женщин детородного возраста.

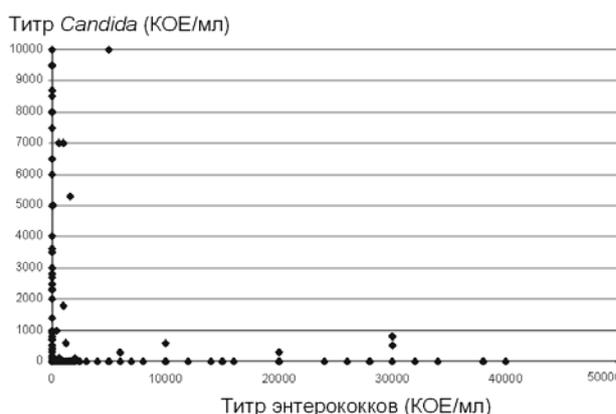


Рис. 1. Зависимость титра *Candida* от содержания энтерококков в вагинальном содержимом у женщин.

Мы также провели дополнительные исследования взаимоотношений *Candida* и энтерококков с лактобактериями, поскольку последние являются доминирующей микробиотой влагалища [5, 8]. Известно, что количество лактобактерий во влагалище здоровых женщин лабильно и изменяется под влиянием различных факторов. Так, на титр лактобацилл оказывают влияние гормональный статус женщины, день менструального цикла, климатические условия проживания, уровень личной гигиены, спектр условно-патогенной биоты во влагалище и пр. [9].

У пациенток определяли титр лактобацилл в вагинальном содержимом. За норму считали количество не ниже 10^5 КОЕ/мл [10]. Наблюдали отсутствие какой-либо корреляции между концентрациями (титрами) *Candida* и лактобактерий в вагинальном содержимом: $r_s = 0,16$ (Рис. 2).

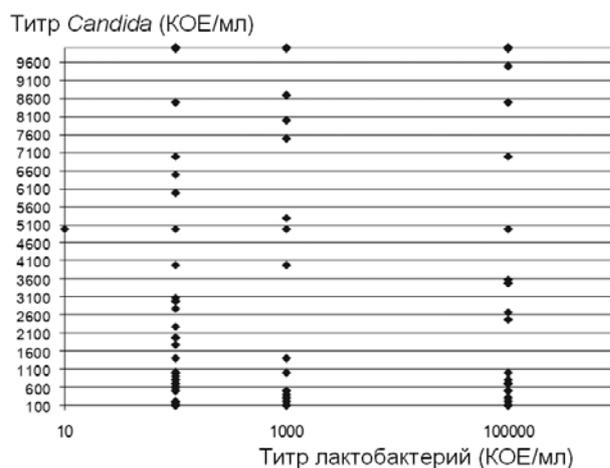


Рис. 2. Зависимость титра *Candida* от содержания лактобацилл в вагинальном содержимом у женщин.

При статистической обработке результатов было установлено, что лактобактерии и *Candida* не проявляют выраженного антагонизма на уровне вагинального биотопа и способны сосуществовать в различных титрах. Это хорошо согласуется с данными других авторов, которые указывают, что при рецидивирующем вульвовагинальном кандидозе у женщин сохраняется общее число лактобацилл [4].

Таким образом, нашими исследованиями продемонстрировано, что из двух исследованных групп бактерий – представителей вагинального биотопа только энтерококки способны регулировать количество

Candida в вагинальном содержимом. Для проверки этого предположения был проведен ряд экспериментов на белых беспородных крысах-самках с вагинальным кандидозом. На фоне введения в вагинальную полость крыс метаболитов энтерококков (группа 1) или взвеси энтерококков (группа 2) наблюдали снижение количества *Candida* по сравнению с контрольной группой 3, в которой вместо энтерококков использовали стерильный ТСБ (Рис. 3).

При этом в группе 1 (введение продуктов метаболизма энтерококков) отмечали заметную тенденцию снижения концентрации *Candida* в вагинальной полости у крыс. В итоге на 7-е сутки титр микромицетов в вагинальном содержимом не превышал $2,6 \cdot 10^2$ КОЕ/мл. В группе 2 (введение суспензии живых энтерококков) также выявили снижение концентрации грибов, но данный эффект наступал позже, чем в группе 1, и был менее стабильным. В контрольной группе, в большинстве случаев, титр *C. albicans* в вагинальном содержимом не снижался и на 7-е сутки превышал $1,0 \cdot 10^3$ КОЕ/мл (Рис. 3).

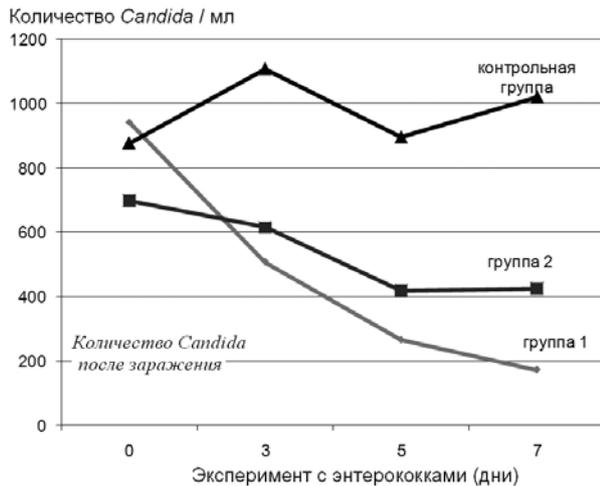


Рис. 3. Концентрация *Candida* в вагинальном содержимом у крыс на фоне интравагинального введения метаболитов энтерококков (группа 1), взвеси энтерококков в ТСБ (группа 2) или стерильного ТСБ (контрольная группа).

Таким образом, наиболее выраженный антикандидозный эффект наблюдали при введении в вагинальную полость крыс с кандидозом концентрата метаболитов энтерококков, а не суспензии живых бактерий. Это могло быть связано с тем, что энтерококки были вынуждены вступать в антагонистические отношения с микромицетами, что тормозило рост бактерий и, соответственно, продукцию ими биологически активных антифунгальных субстанций. Согласно полученным результатам можно утверждать, что именно растворимые продукты метаболизма энтерококков определяют, в большей степени, антикандидозную активность *Enterococcus* spp.

ВЫВОДЫ

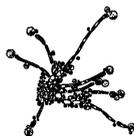
1. Было выявлено, что *Candida* и энтерококки являются антагонистами в вагинальной полости у женщин детородного возраста, при этом повышение титра энтерококков сопровождается снижением титра грибов.
2. Лактобактерии не оказывают существенного влияния на присутствие и концентрацию *Candida* в вагинальной полости у женщин детородного возраста в вагинальном биотопе.
3. Продукты метаболизма энтерококков способствуют снижению уровня колонизации вагинальной полости *C. albicans* в экспериментальных моделях на крысах, что приводит к ускорению элиминации микромицетов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Буданов П.В., Стрижакова М.А. Новое в терапии нарушений микроценоза влагалища // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2006. – Т.5, №1. – С. 104-108.
2. Попова А.Л., Дворянских С.А., Яговкина Н.В. Современные аспекты лечения и профилактики вульвовагинального кандидоза (обзор литературы) // Вятский медицинский вестник. – 2013. – №4. – С. 31-36.
3. Занько С.Н. Вагинальный кандидоз // Охрана материнства и детства – 2006. – № 1-7. – С. 64-71.
4. Крупейченко В.В., Барановская Е.И. Микрофлора влагалища у беременных, больных вульвовагинальным кандидозом // Охрана материнства и детства – 2009. – №2. – С. 93-95.
5. Цизина Е.А., Ильина Н.А. Нормоценоз влагалища и его влияние на здоровье женщин // Молодой ученый. – 2011. – Т.2, №8. – С. 152-156.
6. Бондаренко В.М., Суворов А.Н. Симбиотические энтерококки и проблема энтерококковой оппортунистической инфекции. – М., 2007. – С. 30.
7. Ускова Н.А., Махрова Т.В., Суворов А.Н., Заславская М.И. Влияние *Enterococcus faecium* на развитие экспериментального кандидоза у крыс // Проблемы мед. микологии. – 2012. – Т.14, №2. – С. 131-132.
8. Бондаренко К.Р., Озолина Л.А., Бондаренко В.М., Шницко В.О. Особенности влагалищной микроэкосистемы в период гестации (обзор литературы) // Вестник РГМУ – 2014. – №4. – С. 6-11.
9. Мусаева З.М. Микробиоценоз влагалища и его коррекция // Проблемы женского здоровья. – 2008. – Т. 3, №3. – С. 43-53.
10. Прилепская В.Н., Байрамова Г.Р., Анкирская А.С. ФГУ Вагинальная микробиоценоз влагалища в норме и при патологии // Гинекология. – 2009. – Т. 11, №3. – С. 9-11.

Поступила в редакцию журнала 20.09.2016

Рецензенты: С.М. Игнатъева, И.А. Босак



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 19.12.2016. Формат 60×90 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 7. Тираж 999 экз.