

# ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

---

Том 26 №3



---

Problems in medical mycology

Vol.26 №3

**2024**

### EDITORIAL BOARD

**Chief Editor:** N.V. Vasilyeva – Honored Scientist of the Russian Federation, Ph.D., prof. (Russia)

**Deputies Chief Editor:**

K.I. Raznatovsky – M.D., prof. (Russia)

S.N. Khostelidi – M.D. (Russia)

A.E. Taraskina – Ph.D. (Russia)

**Responsible secretary:** T.S. Bogomolova – Ph.D. (Russia)

**Manager of Editorial Office:** E.S. Gukova

(elena.gukova@szgmu.ru)

### SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD

Bennett J. – M.D. (USA), Dupont B. – M.D. (France)

Gostev V.V. – M.D. (Russia)

Hurzilava O.G. – M.D., prof. (Russia)

Golubev V.I. – Ph.D. (Russia)

Kashkin K.P. – M.D., academician of RAMS, prof. (Russia)

Kolbin A.C. – M.D., prof. (Russia)

Kaftyreva L.A. – M.D., prof. (Russia)

Kotrehkova L.P. – M.D. (Russia)

Makarova M.A. – M.D. (Russia)

Mazurov V.I. – M.D., academician of RAMS, prof. (Russia)

Polachek I. – M.D. (Israel)

Samzov A.V. – M.D., prof. (Russia)

Sidorenko S.V. – Corresponding Member of the Russian

Academy of Medical Sciences, M.D., prof. (Russia)

Shadriviva O.V. – M.D. (Russia)

Shevyakov M.A. – M.D., prof. (Russia)

Shulgina M.V. – Ph.D. (Russia)

Tietz H.-J. – M.D. (Germany)

Viviani M.A. – M.D. (Italy)

Zinzerling V.A. – M.D., prof. (Russia)

Yamaguchi M. – Ph.D. (Japan)

Zhang F. – M.D.&Ph.D. (China)

# PROBLEMS IN MEDICAL MYCOLOGY

*Vol. 26, № 3, 2024*

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

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

# ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

*Том 26, № 3, 2024*

Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н.Кашкина  
© ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России

### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Главный редактор:** Н.В. Васильева – Заслуженный деятель науки Российской Федерации, д.б.н., проф. (Россия)

**Заместители главного редактора:**

К.И. Разнатовский – д.м.н., проф. (Россия)

С.Н. Хостелиди – д.м.н. (Россия)

А.Е. Тараскина – к.б.н. (Россия)

**Ответственный секретарь:** Т.С. Богомолова – к.б.н. (Россия)

**Заведующая редакцией:** Е.С. Гукова

(elena.gukova@szgmu.ru)

### НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беннетт Дж. – доктор медицины (США)

Вивиани М.А. – доктор медицины (Италия)

Голубев В.И. – д.б.н. (Россия)

Гостев В.В. – к.б.н. (Россия)

Дюпон Б. – доктор медицины (Франция)

Кашкин К.П. – д.м.н., академик РАМН, проф. (Россия)

Кафтырева Л.А. – д.м.н., проф. (Россия)

Котрехова Л.П. – к.м.н. (Россия)

Колбин А.С. – д.м.н., проф. (Россия)

Мазуров В.И. – д.м.н., акад. РАМН, проф. (Россия)

Макарова М.А. – д.м.н. (Россия)

Полачек И. – доктор медицины (Израиль)

Самцов А.В. – д.м.н., проф. (Россия)

Сидоренко С.В. – член-корреспондент РАМН, д.м.н., проф. (Россия)

Титц Х-Й. – доктор медицины (Германия)

Хурцилава О.Г. – д.м.н., проф. (Россия)

Цинзерлинг В.А. – д.м.н., проф. (Россия)

Чжан Ф. – доктор медицины (Китай)

Шадривова О.В. – к.м.н. (Россия)

Шевяков М.А. – д.м.н., проф. (Россия)

Шульгина М.В. – д.б.н. (Россия)

Ямагучи М. – доктор медицины (Япония)

**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, immunology, therapy and prophylaxis of infections, microorganisms — contaminants in laboratory, clinical and other conditions.

## СОДЕРЖАНИЕ

### ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ И ОБЗОРЫ

<i>Рябинин И.А.</i> В поисках альтернативных биомоделей для изучения инвазивного аспергиллеза .....	3
<i>Шевяков М.А., Мелехина Ю.Э., Королева Ю.Г.</i> Роль пробиотиков и постбиотиков в лечении орофарингеального кандидоза (обзор литературы) .....	11
<i>Корнишева В.Г., Мирзоян В.Л.</i> К вопросу об изоморфной реакции Кёбнера и изотопической реакции Вольфа (обзор литературы).....	17

### КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ И ДЕРМАТОВЕНЕРОЛОГИЯ

<i>Фролова Е.В., Шадривова О.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Богомолова Т.С., Игнатьева С.М., Соловьева Г.И., Секретарева О.В., Десятник Е.А., Хостелиди С.Н., Борзова Ю.В., Тараскина А.Е., Васильева Н.В.</i> Особенности экспрессии ингибиторных рецепторов на Т-лимфоцитах у онкогематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом легких, получающих полихимиотерапию .....	24
<i>Клименко К.Э., Русецкий Ю.Ю., Лебедева А.А., Авдеенко Ю.Л., Борзова Ю.В.</i> Опыт лечения COVID-ассоциированного мукормикоза околоносовых пазух: описание клинического случая .....	39
<i>Тен М., Подгайнова А.А., Черненко Д.О., Десятник Е.А., Митрофанов В.С., Игнатьева С.М., Фролова Е.В., Шурпицкая О.А., Борзова Ю.В., Хостелиди С.Н., Соболев А.В.</i> Аллергический бронхолегочный аспергиллез (описание клинического случая) .....	47
<i>Боронина Л.Г., Саматова Е.В., Мухаметшин Р.Ф., Кочнева Н.А.</i> Возможности и проблемы микробиологической верификации диагноза при инвазивных инфекциях у детей в неонатальном периоде .....	56

### КЛИНИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

<i>Иванова Е.В., Чайникова И.Н., Михайлова И.В., Бекпергенова А.В., Бондаренко Т.А., Филиппова Ю.В.</i> Фунгицидная и биопленкоингибирующая активность водных экстрактов лекарственных растений, содержащих танины .....	64
<i>Прокопьев В.В., Карабасова А.Б., Куikliна Н.В., Юрова В.А., Крафт Л.А.</i> Реципрокное влияние экзометаболитов дрожжевых микромицетов кишечника и условно-патогенных бактерий на скорость роста .....	72

## CONTENTS

### PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

<i>Ryabinin I.A.</i> In questing for alternative biomodels for researching of invasive aspergillosis .....	3
<i>Shevyakov M.A., Melekhina Y.E., Koroleva Y.G.</i> The role of probiotics and postdiotics in the treatment of oropharyngeal candidiasis (literature review) .....	11
<i>Kornisheva V.G., Mirzoyan V.L.</i> On the issue of the isomorphic Koebner reaction and the isotopic Wolf reaction (literature review) .....	17

### CLINICAL MYCOLOGY AND DERAMATOVENEREOLOGY

<i>Frolova E.V., Shadrivova O.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Bogomolova T.S., Ignatieva S.M., Solovyova G.I., Sekretareva O.V., Desyatnik E.A., Khostelidi S.N., Borzova Yu.V., Taraskina A.E., Vasilyeva N.V.</i> Features of expression of inhibitory receptors on T-lymphocytes in oncohematological patients with invasive pulmonary aspergillosis receiving polychemotherapy .....	24
<i>Klimenko K.E., Rusetsky Yu.Y., Lebedeva A.A., Avdeenko Yu.L., Borzova Yu.V.</i> Experience in the treatment of COVID-associated mucormycosis of the paranasal sinuses: description of the clinical case .....	39
<i>Ten M., Podgainova A.A., Chernenko D.O., Desyatnik E.A., Mitrofanov V.S., Ignatieva S.G., Frolova E.A., Shurpickaya O.A., Borzova Y. V., Khostelidi S.N., Sobolev A.V.</i> Allergic bronchopulmonary aspergillosis (description of the clinical case).....	47
<i>Boronina L.G., Samatova E.V., Muchametshin R.F., Kochneva N.A.</i> Possibilities and problems of microbiological verification of diagnosis in invasive infections in neonatal children .....	56

### CLINICAL AND MEDICAL MICROBIOLOGY

<i>Ivanova E.V., Chainikova I.N., Mikhailova I.V., Bekpergenova A.V., Bondarenko T.A., Filippova Yu.V.</i> Fungicidal and bio-film-inhibiting activity of aqueous extracts of medicinal plants containing tannins .....	64
<i>Prokopiev V.V., Karabasova E.B., Kuklina N.V., Yurova V.A., Kraft L.A.</i> Reciprocal influence of exometabolites of yeast micromycetes of the intestine and conditional pathogenic bacteria on the growth rate .....	72



*Для цитирования:* Рябинин И.А. В поисках альтернативных биомоделей для изучения инвазивного аспергиллеза. Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (3): 3-10. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-3-10

*For citation:* Ryabinin I.A. In questing for alternative biomodels for researching of invasive aspergillosis. Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (3): 3-10. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-3-10

## В ПОИСКАХ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ БИМОДЕЛЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИНВАЗИВНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА

**Рябинин И.А. (н.с.)\***

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

*В сообщении дискутируется вопрос о возможности использования представителей иглокожих (Echinodermata) для моделирования инвазивного и, возможно, хронического аспергиллеза in vivo. Указаны основные проблемы в изучении патогенеза аспергиллеза, которые не удалось решить при наблюдении над традиционными биомоделями. Систематизированы находки различных Aspergillus spp., включая медицински значимые виды, у представителей основных групп иглокожих, освещены особенности их взаимодействия. Большое внимание в обзоре уделено анатомо-физиологическим особенностям иглокожих, актуальным в аспекте противомикробной защиты и транспорта микробных патогенов внутри тела, что наиболее значимо для моделирования инфекционных заболеваний. В заключении на основании изложенных фактов обосновано использование эхинодерм для биомоделирования аспергиллезной инфекции, отмечена доступность этих живых объектов для отечественных ученых. Обзор-дискуссия адресован широкому кругу исследователей в сфере медицинской микробиологии, интересующихся проблемами изучения патогенеза микозов.*

**Ключевые слова:** *Aspergillus, Echinodermata, аспергиллез, биомодели, биологически активные соединения, иглокожие, морская микробиология*

## IN QUESTING FOR ALTERNATIVE BIOMODELS FOR RESEARCHING OF INVASIVE ASPERGILLOSIS

**Ryabinin I.A. (scientific researcher)**

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

*The report discusses the possibility of using representatives of echinoderms (Echinodermata) to model invasive and, possibly, chronic aspergillosis in vivo. The main problems in the study of the pathogenesis of aspergillosis, which could not be solved when observing traditional biomodels, are indicated. The findings of various Aspergillus spp., including medically significant species, in representatives of the main groups of echinoderms are systematized, and the features of their interaction are highlighted. Much attention in the review is paid to the anatomical and physiological characteristics of echinoderms, which are relevant in the aspect of anti-infective protection and transport of microbial pathogens within the body, which is most significant for modeling infectious diseases. In conclusion, based on the presented facts, the use of echinoderms for biomodeling of aspergillus infection is justified, and the availability of these living objects for domestic scientists is noted. The review-discussion is addressed to a wide range of researchers in the field of medical microbiology interested in the problems of studying the pathogenesis of mycoses.*

**Key words:** *Aspergillus, aspergillosis, biomodels, biologically active compounds, echinoderms (Echinodermata), marine microbiology*

### ВВЕДЕНИЕ

Инвазивный аспергиллез легких входит в группу глобально значимых инвазивных микозов, а его ведущий возбудитель *Aspergillus fumigatus* объявлен Всемирной организацией здравоохранения критическим грибковым патогеном. Для понимания патогенеза этого заболевания, а также доклинических испытаний новых противогрибковых препаратов разработаны различные биомодели с использованием позвоночных [1] и беспозвоночных животных, включая широко применяемые в последнее время нематоды *Caenorhabditis elegans* [2] и насекомое

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

*Galleria melonella* [3]. Благодаря использованию таких моделей в комплексе с данными, полученными от пациентов прижизненно и *post mortem*, основные акты патогенеза инвазивного аспергиллеза легких установлены достаточно подробно [4, 5], но ряд вопросов остается еще малоизученным. Так, например, до сих пор в очень слабой степени освещен патогенез развития экстрапульмональных очагов аспергиллеза при диссеминации. В ряде публикаций высказывают предположение, что при ангиоинвазии в сосуды легких из гиф аспергилла отпочковывается «конидия», которая мигрирует в системном кровотоке. Однако конидиальные головки у аспергиллов *in vivo* формируются в интенсивно аэрируемых полостях: в просвете трахеи и бронхов, параназальных синусов, в полостях распада и кавернах. В кровеносных и лимфатических сосудах конидиеносцы аспергиллов не обнаруживали. Совершенно очевидно, что мигрирующая форма аспергиллов – это совершенно особый тип клеток, который никак не связан с конидиогенезом, и традиционные биомодели инвазивного аспергиллеза не позволяют в полном объеме раскрыть биологию этой крайне актуальной формы жизни грибкового патогена. Особое значение такие мигрирующие формы приобретают в тех случаях (неоднократно описанных в литературе), когда у пациентов наблюдали изолированные экстрапульмональные очаги инвазивного аспергиллеза (поражение почки, мозга, костей), притом, что в легких никаких фокусов поражения найти не удавалось [6, 7]. Кроме того, до сих пор незначителен задел по изучению патогенеза хронического аспергиллеза легких и иных патологических состояний, связанных с длительной персистенцией аспергиллов [8] (не включая аллергические патологии). Данные обстоятельства требуют разработки новых биомоделей. С учетом современной тенденции к использованию беспозвоночных целесообразно повести подбор среди родственников хордовых, поскольку ограничения информативности уже известных моделей, вероятно, связаны с тем, что инфекцию воспроизводили на первичноротых, далеко отстоящих от хордовых в эволюционном развитии.

В литературе не удалось обнаружить публикаций о случаях микотических инфекций, обусловленных аспергиллами, или просто колонизации тел оболочников и кишечнодышащих. В то же время такие данные были неоднократно получены при исследовании иглокожих, анализу свойств которых в затронутом ракурсе посвящена данная статья-дискуссия.

## ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ИГЛОКОЖИХ И АСПЕРГИЛЛОВ

Неоднократно показано, что грибы рода *Aspergillus* входят в состав морских экосистем, обладая способностью выживать в условиях высокого гидро-

статического давления, а в ряде случаев – и при действии низких температур [9]. Среди океанических представителей этого рода широко известен *A. sydowii* – возбудитель аспергиллеза кораллов, способный также к персистенции на некоторых губках [10–12]. Однако для многих других видов *Aspergillus* spp. экологическая роль в морских экосистемах, особенности взаимодействия с океанической микробиотой, флорой и фауной находятся еще в начальном периоде изучения. Тем не менее инфицирование аспергиллами иглокожих описано во множестве публикаций.

С поверхности тела голотурии *Eupentacta fraudatrix* и дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* из российского прибрежного района Японского моря выделили штаммы *A. eburneocremaeus* (секция *Aenei*), а во внутренних органах обоих видов и целомической жидкости *A. japonicus* находили представителей хорошо известного условно-патогенного вида *A. versicolor* [13]. Вероятно, способность к персистенции аспергиллов в организме голотурий избирательная: в том же исследовании в придонном иле в месте обитания дальневосточного трепанга обнаружили *A. niger*, *A. flavus*, *A. sydowii*, *A. halophilicus*, но в испражнениях трепанга конидии этих грибов отсутствовали. Другого представителя секции *Versicolores* – *A. protuberus* – вновь выделили из экспедиционного материала с Японского моря, с аборальной стороны тела плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*. Наряду с другим грибом-симбиотом (*Penicillium sajarovii*), этот микромицет продуцирует комплекс метаболитов-поликетидов, обладающих антимикробным эффектом в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans* [14]. Эта находка оказалась не единственным случаем, когда аспергиллы из микробиоты иглокожих проявляли выраженные антагонистические свойства. Штамм *Aspergillus* sp. HDf2 из кишечника морского ежа *Anthocidaris crassispana* является продуцентом спикулиспоровой кислоты, которая обладает антистафилококковой активностью, а также ингибирует рост клеточных линий рака желудка и легких человека [15], а штамм *A. versicolor* из того же животного оказывает цитостатическое действие на клетки линии P388 (клетки лимфоидной опухоли мыши) [16].

Из морских ежей (*Toxopneustes pileolus*) выделяли и основного возбудителя инвазивного аспергиллеза – *A. fumigatus* [17].

По-видимому, в ряде случаев *Aspergillus* spp. могут входить в состав микробиоты иглокожих, не вызывая у них инфекционных заболеваний. Так, из тела красной морской звезды *Echinaster sepositus*, широко распространенного вида в Северной Атлантике и на Средиземноморье, был выделен штамм *A. puulaauensis* (секция *Versicolores*), экстракт из культуральной жидкости которого в эксперименте *in vitro* оказывает потенциально лечебный эффект на

эпидермис кожи человека. Показано антиоксидатное и стимулирующее действие в отношении клеточной пролиферации и репарации ДНК [18]. При этом авторы не сообщают о микотическом поражении экземплара *E. sepositus*.

Аспергиллы встречаются также и в микробиоте морских лилий; так, из *Himerometra robustipinna* (в оригинальном источнике – *H. magnipinna*), обычного вида для Севера Тихого Океана, получили штамм *A. ruber*, который на среде из ферментативного перевара сои образует комплекс алкалоидов, а на среде с рисовым экстрактом – смесь производных антрахинона; у ряда таких метаболитов авторы обнаружили антимикробную активность [19].

Из подобранных сообщений видно, что аспергиллы входят в состав микробиоты, а, возможно, и вызывают определенные патологические состояния у большинства групп ныне живущих иглокожих – морских звезд, морских ежей, морских лилий и голотурий. В доступных источниках не удалось найти случаев выделения аспергиллов из глубоких тканей и наружных покровов офиур. Очевидно, для освещения этого вопроса требуются дальнейшие исследования.

По-видимому, тот факт, что различные виды аспергиллов избирательно колонизируют организмы иглокожих, объясняется наличием у последних определенных факторов врожденного иммунитета, в том числе гуморального, включающего какие-либо пептидные метаболиты, соединения иной природы с избирательным противогрибковым действием. Это положение подтверждается опубликованными данными. Так, экстракты, полученные с помощью ацетона или этанола из тканей морской звезды *Astropecten spinulosus*, обладают слабой активностью в отношении *A. terreus* и практически не активны против *A. niger* и *A. flavus* [20]. Также метанольный экстракт из панциря морского ежа *Salpacia virgulata* не оказывал ингибирующего действия на рост *A. flavus*, но при этом подавлял *A. niger* [21]. В то же время из тканей *Stellaster equestris* получили экстракт, обладающий антифунгальной активностью в отношении *A. niger*. Интересно, что эффект в отношении черного аспергилла на основании оценки зон задержки роста оказался в опыте более выраженным, чем против *Candida albicans*, а для *A. clavatus* в концентрациях 250-300 мг/л даже превзошел итраконазол (в стандартном диске) [22]. Отчетливый фунгистатический эффект наблюдали у экстракта из тканей морских звезд *Asterias amurensis* в отношении роста *A. flavus* [23]. Рост сразу двух патогенов (*A. flavus* и *A. niger*) подавляет экстракт из «черного морского огурца» *Holothuria atra* [24], а коллектив филиппинских исследователей, изучивших противогрибковое действие вытяжек на основе метанола-этилацетата из нескольких видов голотурий, показал, что в сравнении с *H. atra* вдвое активнее против

*A. niger* экстракт из представителя рода *Stichopus* [25]. Белопятнистый морской огурец *Holothuria polii* выделяет метаболиты, подавляющие рост *A. fumigatus* [26].

## АНАТОМО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИГЛОКОЖИХ

Наиболее древний подтип иглокожих – *Pelmatozoa* (прикрепленные или стебельчатые), пережив в палеозое расцвет пяти своих классов, к настоящему времени почти весь вымер. Он представлен лишь одним ныне живущим классом – морские лилии (*Crinoidea*). В своем развитии морские лилии имеют личинку долиолярию, снабженную несколькими ресничными поясками и теменным холком.

Нас больше интересует другой подтип – *Eleutherozoa* (свободноживущие), которые обладают более развитыми системами органов. Все системы органов иглокожих и, особенно, подтипа свободноживущих отличаются довольно своеобразным строением, у ряда органов вовсе нет аналогов в живой природе. Личинка морских звезд имеет лишь один поясок ресничек, который впоследствии приобретает довольно исчерченный контур. Личинка ранних стадий – бипиннария, претерпев метаморфозы, превращается в брахиолярию. На анальном конце брахиолярии образуется выступ кожно-мускульного мешка, из которого затем формируются лучи. Происходит формирование «истинного тела» звезды, впоследствии собственные органы поздней брахиолярии редуцируются, развиваются органы молодой морской звезды. Это и объясняет особое строение *Eleutherozoa* и прочих иглокожих: их системы по существу не имеют отношения к таковым у кольцецов и вторичноротых, а формируются как самостоятельные. В палеозое они были представлены всего одним малочисленным вымершим классом *Ophiocistia*, но в мезозое и, особенно, в кайнозое их разнообразие возросло. На настоящий момент существует четыре класса *Eleutherozoa*: морские звезды (*Asteroidea*); офиуры, или змеехвостки (*Ophiuroidea*); морские ежи (*Echinoidea*); голотурии, или морские огурцы (*Holothuroidea*) [27]. Схема строения свободноживущих иглокожих на примере морского ежа показана на рисунке 1 (по Дженсену А.К., 1994, переработано, рисунок автора).

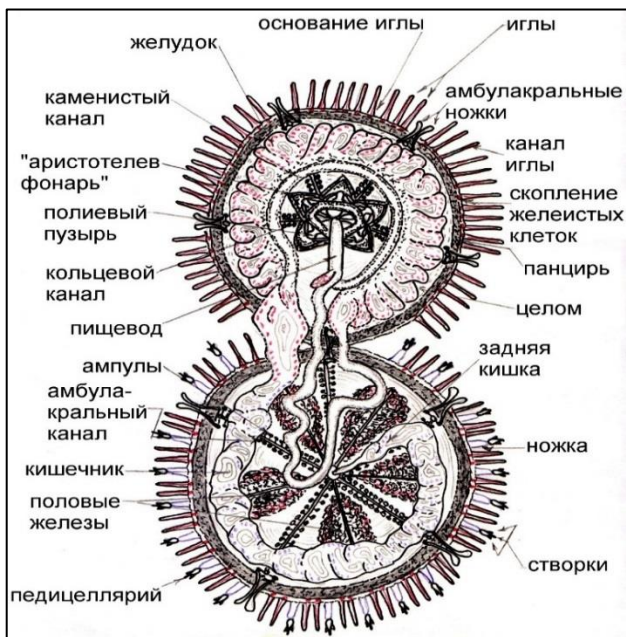


Рис. 1. Общий план строения иглокожих на примере морского ежа.

В рамках моделирования процесса диссеминации *Aspergillus* sp. в теле многоклеточного организма особое значение имеют сосудистые системы. Рассмотрим сосудистую систему иглокожих на примере морских звезд [28]. У всех иглокожих в том или ином виде существует сосудистая система. В связи со спецификой ее строения и функций можно констатировать, что она является в большей степени похожей на лимфатическую систему высших позвоночных, чем на кровеносную. Сосудистое русло не образует кругов кровообращения, а состоит из слепо замкнутых трубчатых полостей, которые образованы складками соединительной ткани стенок целома (Рис. 2, рисунок автора).

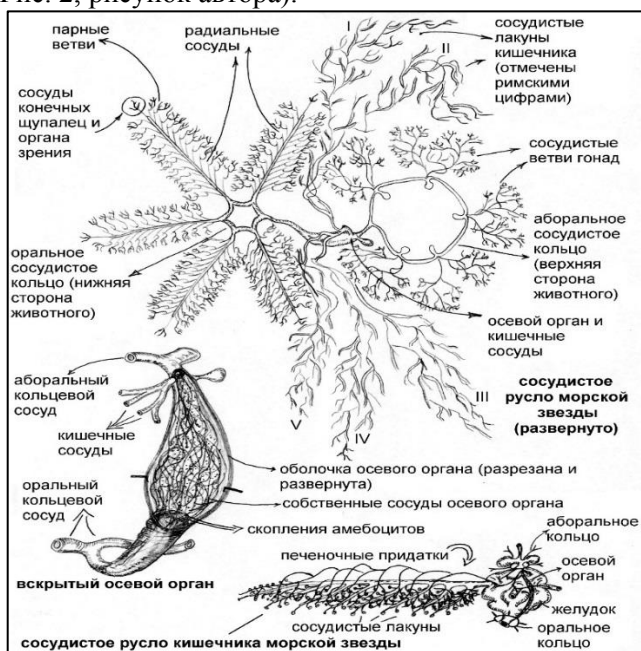


Рис. 2. Строение сосудистой системы пятилучевой морской звезды.

Жидкость сосудистой системы не способна связывать кислород, хотя у ряда представителей сосуды оплетают органы дыхания. Функции сосудистой системы заключаются в транспорте питательных веществ и амебоцитов – клеток, являющихся функциональными аналогами макрофагов.

В системе присутствует два сосудистых кольца. Оральное кольцо охватывает область передней кишки, от него отходят радиальные сосуды, которые стремятся в лучи тела. От каждого радиального сосуда отходит множество парных латеральных ветвей (число зависит от длины луча). Эта часть русла в общих чертах повторяет ход амбулакральных каналов. Сосуды этого кольца питают кожно-мышечный мешок и ампулы амбулакральных ножек. Функционально это кольцо аналогично лимфатическим путям опорно-двигательного аппарата позвоночных, но его строение не дублируется. Единственное лимфоидное образование человека, которое может претендовать на роль деривата ранних форм орального кольца – глоточное кольцо миндалин Пирогова-Вальдейера.

Это утверждение, безусловно, оспоримо, поскольку у низших хордовых подобного образования нет в наличии. Возможно, дериваты орального кольца долгое время были редуцированными (гены их закладки оставались «молчащими»). Впоследствии естественный отбор привел к дерепрессии соответствующих генов в связи с необходимостью интенсификации иммунной функции организма. С помощью сосудов так называемого осевого органа оральное кольцо сообщается с аборалярным. Функция последнего – питание половых желез. Подобное образование не встречается среди вторичноротых. Оно имеет несколько радиальных ветвлений, образующих сплетения в гонадах. Гонады залегают в области интерамбулакров (между лучами), по одной или попарно, что отражается на устройстве сосудистых сплетений [29, 30].

У иглокожих не наблюдается настоящего однонаправленного тока крови с пульсацией, известного у позвоночных. Это частично подтверждает, что сосудистое русло иглокожих имеет мало общего с кровеносной системой. Транспорт жидкости происходит при помощи пульсации перикардия (левого осевого целомического синуса). Сам перикардий (производное целома) может служить аналогом «лимфатического сердца», хотя некоторые авторы склонны считать его аналогом истинного сердца кровеносной системы. «Лимфатических сердец» нет у человека, но у более низкоорганизованных хордовых они присутствуют. На примере происхождения перикардия мы видим подтверждение тому, что сосудистая система и лимфоидные органы, вероятно, берут свое эволюционное начало из целома, однако в последующие этапы эволюции эта связь теряется. В сосудистой

стом русле наблюдается движение, более похожее на разностороннее колебание.

Но в рамках затронутой дискуссии следует особо остановиться на осевом органе, соединяющем кольца сосудов [31]. Он состоит из тонкой соединительнотканной капсулы, внутри которой находится множество сосудов, являющихся разветвлениями орального и адорального сосудистого кольца. От верхнего полюса органа отходят кишечные сосуды. Эти трубчатые отростки образуют сеть, аналогичную системе лимфодренажа у позвоночных. Аналог лимфатического русла у иглокожих является единственным средством транспорта веществ из кишечника. Пространство между собственными сосудами осевого органа изобилует амебоцитами. Осевой орган является центральным органом иммунного аппарата, поскольку функционирует как орган иммунопоэза. Любопытно, что в сосудистом русле осевого органа тот же характер расположения сосудов, что и в селезенке. Таким образом, осевой орган сочетает в себе функции красного косного мозга и селезенки высших позвоночных, его также можно назвать подобием лимфатического узла. Если взглянуть на осевой орган с другой стороны – анатомически, то, учитывая факт впадения в него кишечных сосудов, можно провести аналогию с *Cysterna chili*. На ранних этапах эволюции хордовых, где мы наблюдаем симметричное развитие правого и левого (грудного) лимфатических протоков, *ductus lymphaticus dexter et thoracicus*, вероятно, предковый осевой орган дает парные дериваты. Затем, как известно, у человека правый лимфатический проток развивается неполноценно из-за асимметрии кровеносного русла. Подводя черту под вышеописанным, можно сделать следующий вывод: в сосудистой системе иглокожих сформировано русло, которое является функциональным и отчасти анатомическим аналогом млечных сосудов кишечника позвоночных.

Кроме сосудистой системы существует и специфическое русло, в котором выявляется максимальная концентрация амебоцитов наряду с осевым органом. Это так называемая перигемальная система. Она состоит из околоротового кольца и скопления мелких каналов, покрывающих радиальные ветви оральной части сосудистого русла. Также каналы прилегают к радиальному нерву так, что он находится по отношению к перигемальной и сосудистой ветви «вентрально» (в зоологической терминологии – орально). Непосредственно сам радиальный нерв является комплексным образованием чувствительной эктоневральной и двигательной гипоневральной нервных систем, причем у различных представителей типа эти образования развиты неодинаково. По некоторым предположениям, каналы этой системы служат для питания радиальных нервов, но наиболее явная функция этой системы, вероятно, иммунная. Таким образом, перигемальная система представляет

собой одновременно и прообраз мозговых оболочек, и некую «интегративную миндалину». Выделение дериватов архетипа этой системы у позвоночных довольно сложно из-за нехватки палеонтологических данных. Эта система хорошо развита лишь у морских звезд и морских ежей, у голотурий сохраняются только ее радиальные каналы, но вот у морских лилий почти никогда не встречается. Однако именно лилии принадлежат к предковым формам прочих современных иглокожих, что и навязывает суждение о вторичном, независимом происхождении перигемальной сети. С другой стороны, современные морские лилии представляют собой только кайнозойскую генерацию класса *Crinoidea*, об анатомии палеозойских форм до нас дошли лишь сведения о скелете. Так или иначе, эта система больше претендует на статус предка окологлоточного миндального кольца Пирогова-Вальдейера ввиду выраженности своей иммунной функции.

Нельзя не упомянуть о довольно любопытной детали строения в анатомии голотурий (*Holothuroidea*). Хотя отдельные части сосудистой системы претерпевают дегенерацию в связи с переходом от радиального типа симметрии к билатеральному, у многих голотурий (исключая один отряд) появляются настоящие органы дыхания – водные легкие, но, в отличие от человека и прочих позвоночных, это производные задней кишки, а не передней. Легкие «морских огурцов» имеют собственное сосудистое русло, сообщаемое с кишечным. Учитывая функциональные особенности сосудистой системы, можно отметить, что здесь мы столкнулись с аналогами лимфатических сосудов легких позвоночных животных.

Помимо описанных структур, «лимфатические» функции (иммунотранспортные) выполняют и другие органы – целом и амбулакральная система. Это не их собственные функции, однако такая работа поддерживается двумя явлениями: (1) амебоциты являются довольно подвижными клетками, способными легко перемещаться по всему организму иглокожего; (2) электролитный состав всех жидкостных полостей иглокожих почти одинаков и сходен с морской водой.

Амбулакральная система иглокожих является уникальной системой гидростатического аппарата, с помощью которой животное способно совершать перемещение по грунту (морские звезды и ежи), парение в толще воды (офиуры, пелагические голотурии). Основная ее функция – двигательная. Это единственная система транспорта жидкости в организме, имеющая непосредственную связь с окружающей водной средой. Система сообщается с наружным окружением посредством мадрепорита – продырявленной пластинки, залегающей в одном из интерамбулакров. Мадрепорит может быть один, у ряда представителей их несколько. От мадрепоровой



пластинки отходит мадрепоровый, или каменистый, канал; он полностью обызвествлен. Каменистый канал сообщается с кольцевым каналом, охватывающим пищеварительный тракт. От кольцевого канала отходят радиальные каналы, их число соответствует числу лучей, которое у иглокожих обычно кратно пяти и составляет, соответственно, от пяти до двухсот. От каждого радиального канала отходят парные каналы, замыкающиеся на амбулакральные ножки и их ампулы. Ампула – это двухклапанный мешок, снабженный собственными мышцами, ее функции: наполнение жидкостью амбулакральной ножки и регуляция состояния присасывательного диска. Скорее всего, именно благодаря связи гидростатического аппарата с внешними водами происходит поддержание водно-солевого (электролитического) баланса организма и всех «жидкостных» систем, в том числе сосудистой и перигемальной.

Целом (вторичная полость тела) представлен широкими пространствами, выстланными мерцательным эпителием. Вблизи осевого комплекса органов он дает три синуса: левый осевой, преобразованный в перикардий; правый осевой, в котором залегает осевой орган; половой, где проходит выводной канал гонад. В целоме всегда обнаруживаются амебоциты в значительном количестве, сюда они поступают из осевого органа, проходя правый осевой синус.

Выявление систем иглокожих, имеющих явное значение лимфатической и занимающих ряд ее функций, ставит перед нами вопрос: чем вызвана такая интенсивная потребность в лимфоидных и смежных образованиях?

Иглокожие животные обладают, как правило, довольно слабой двигательной функцией. Движения морских звезд хорошо заметны только в период охоты, в покое приходится прибегать к методу кино съемки и ускоренного показа. Это обстоятельство делает их довольно легкой добычей для разного рода хищников. Иглокожие выработали в процессе эволюции ряд приспособлений защиты, которые сводятся к трем типам: 1) настоящий внутренний скелет из известковых биокристаллов, в отдельных случаях представленный панцирем (морские ежи); 2) наличие активной ядовитости и аппарата инъекции токсинов (иглы морских ежей); 3) самокалечение.

Из приведенных защитных механизмов самый любопытный в аспекте поставленного вопроса – самокалечение (автотомия). Подавляющее большинство иглокожих способны разрывать свое собственное тело при воздействии сильного раздражающего фактора. У офиур довольно легко отламываются и восстанавливаются руки, морские звезды способны восстанавливать свое тело из единственного луча (*Linckia* spp.), некоторые голотурии регенерируют все тело даже из отдельных органов. У последних отмечено выбрасывание кишечника или полный раз-

рыв тела на отдельные органы и тканевые пласты. Кроме того, на иглокожих паразитирует ряд животных из типов и классов, которые, как правило, вообще не образуют устойчивые паразитические системы. Среди них моллюски и кольчецы, способные активно внедряться в хозяина.

Естественно, при том и другом процессе происходит образование огромных раневых поверхностей, весьма доступных для контаминации микроорганизмами поверхностной водной пленки, океанического дна и придонного ила, а также ротовой полости хищника. Значительное количество видов иглокожих обитают в литоральной (прибрежной) зоне океана, часто прямо на марше (зоне, непосредственно охватываемой приливом). Это очень сложная зона в отношении состава микробиоты: здесь сходятся сообщества водной пленки, прибрежных почв и окружающей атмосферы. Если индивид, обладающий обширными раневыми поверхностями, подвергся бы активной контаминации в этой зоне (загрязнение ран), у него развилась бы раневая инфекция, склонная к генерализации. На этом несложном примере можно убедиться, сколь велика для иглокожих иммунная функция, которую в той или иной степени поддерживают в плане транспорта амебоцитов все полостные системы организма. Именно изучение иммунных реакций иглокожих натолкнули И.И. Мечникова на открытие фагоцитоза.

Особо следует отметить, что иглокожие не близки хордовым, но их предполагаемые червеобразные двусторонне-симметричные предки, возможно, обладали схожими аналогами лимфатических и иных сосудистых органов, которые получили дальнейшее эволюционное развитие. У ранних хордовых аналоги лимфатических органов редуцируются. Собственно, ранние хордовые (урохордовые, кишечнотышущие) являются «уклонением» в эволюции, и, вероятнее всего, они не были предками позвоночных.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ РАЗРАБОТКИ ИГЛОКОЖИХ ДЛЯ БИОМО- ДЕЛИРОВАНИЯ АСПЕРГИЛЛЕЗА**

Исходя из представленных фактов, следует считать установленным, что штаммы *Aspergillus* spp., в том числе медицински значимых видов, способны инфицировать представителей большинства групп иглокожих. Характер инфицирования у различных иглокожих (транзиторное носительство, персистенция, микотическое инфекционное заболевание) требует природных наблюдений и установления в эксперименте. Показано, что процесс взаимодействия эхинодерм и аспергиллов регулируется со стороны хозяина выделением неких антифунгальных метаболитов, благодаря которым колонизация аспергиллами происходит в той или иной степени видоспеци-

фично. С точки зрения анатомо-физиологической характеристики иглокожие обладают сосудистыми структурами, которые можно условно рассматривать как аналоги лимфатической системы позвоночных; кроме того, так называемый осевой орган следует считать прообразом лимфоидных образований, хотя у иглокожих существует только врожденный иммунный ответ. Указанные особенности обеспечивают базу для наблюдения над процессом взаимодействия элементов таллома, конидий и «мигрирующей формы» аспергиллов с фагоцитами (у иглокожих – амебоцитами) и за явлением диссеминации.

Для экспериментальной работы иглокожие принципиально доступны. Так, представители различных иглокожих являются объектом торговли для держателей морских аквариумов, среди них: голотурии из родов *Holoturia*, *Synapta*, *Colochirus*; морские ежи из родов *Heterocentrotus*, *Toxopneustes*, *Diadema*, *Astropyga*; морские звезды (*Fromia* spp., *Linckia* spp., *Protoraster* spp., *Astropecten* spp.) и многие другие. Некоторых иглокожих разводят для пищевых целей, в России налажено промышленное выращивание (марикультура) дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus*, а также морских ежей *Strongilocentrotus* spp. (*S. nudus*, *S. intermedius*).

Кроме того, опытное использование иглокожих в экспериментальной микологии не следует считать обособленным направлением от тенденций развития современной биомедицины. Из уже цитированных источников ясно, что ткани морских звезд, голотурий, морских ежей выделяют метаболиты с противогрибковой активностью, известно у них и антибактериальное действие, в том числе в отношении актуальных нозокомиальных патогенов [32]. Кроме того, выраженная способность к регенерации тканей привлекает многих исследователей к иглокожим для раскрытия тонких механизмов этого процесса, в том числе для возможного последующего применения полученных данных в медицинских целях [33].

Таким образом, представителей иглокожих можно рассматривать в качестве перспективных объектов для создания принципиально новых биомоделей аспергиллезной инфекции.

*Статья подготовлена в рамках работы по теме Государственного задания Минздрава России «Молекулярно-генетические и иммунологические аспекты микозов легких, вызванных грибами рода *Aspergillus*. Фокус на адаптивный иммунный ответ и механизмы иммунной толерантности» № НИОКТР 122012100294-4.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Desoubeaux G., Cray C. Animal models of aspergillosis. *Comp. Med.* 2018; 68 (2): 109-123. PMID: 29663936
2. Ahamefule C.S., Qin Q., Odiba A.S., Li S., et al. *Caenorhabditis elegans*-based *Aspergillus fumigatus* infection model for evaluating pathogenicity and drug efficacy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10: 320. doi: 10.3389/fcimb.2020.00320
3. Jemel S., Guillot J., Kallel K., Jouvion G., et al. *In vivo* efficacy of voriconazole in a *Galleria mellonella* model of invasive infection due to azole-susceptible or resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. *J. Fungi (Basel)*. 2021; 7(12): 1012. doi: 10.3390/jof7121012
4. Gu X., Hua Y.H., Zhang Y.D., Bao D.I., et al. The pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*, host defense mechanisms, and the development of AFMP4 antigen as a vaccine. *Pol. J. Microbiol.* 2021; 70 (1): 3-11. doi: 10.33073/pjm-2021-003
5. Earle K., Valero C., Conn D.P., Vere G., et al. Pathogenicity and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Virulence*. 2023; 14 (1): 2172264. doi: 10.1080/21505594.2023.2172264
6. Das S., More A.R., Iyadurai R. Bilateral renal aspergillosis in an immunocompetent host. *J. Family Med. Prim. Care*. 2017; 6 (4): 873-875. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc\_209\_17
7. Walker W.A., Pate J.W. Primary *Aspergillus* osteomyelitis of the sternum. *Ann. Thorac. Surg.* 1991; 52 (4): 868-870. doi: 10.1016/0003-4975(91)91232-k
8. Ralph B., Sheppard D.C. A Murine model for chronic *A. fumigatus* airway infections. *Methods. Mol. Biol.* 2021; 2260: 215-224. doi: 10.1007/978-1-0716-1182-1\_15
9. Зверева Л.В., Борзых О.Г. Грибы в глубоководных экосистемах Мирового Океана. *Биология моря*. 2022; 48 (3): 147-159. [Zvereva L.V., Borzyh O.G. Fungi in deep-water ecosystems of the World Ocean. *Marine Biology*. 2022; 48 (3): 147-159 (in Russ.)]. doi.org/10.1134/S1063074022030105
10. Troeger V.J., Sammarco P.W., Caruso J.H. Aspergillosis in the common sea fan *Gorgonia ventalina*: isolation of waterborne hyphae and spores. *Dis. Aquat. Organ.* 2014; 109 (3): 257-61. doi: 10.3354/dao02736
11. Soler-Hurtado M.M., Sandoval-Sierra J.V., Machordom A., Diéguez-Uribeondo J. *Aspergillus sydowii* and other potential fungal pathogens in Gorgonian Octocorals of the Ecuadorian Pacific. *PLoS One*. 2016; 11(11): e0165992. doi: 10.1371/journal.pone.0165992
12. Ein-Gil N., Ilan M., Carmeli S., et al. Presence of *Aspergillus sydowii*, a pathogen of gorgonian sea fans in the marine sponge *Spongia obscura*. *ISME J.* 2009; 3 (6): 752-755. doi: 10.1038/ismej.2009.18

13. Pivkin M.V. Filamentous fungi associated with holothurians from the sea of Japan, off the Primorye coast of Russia. *Biol. Bull.* 2000; 198 (1): 101-109. doi: 10.2307/1542808
14. Leshchenko E.V., Berdyshev D.V., Yurchenko E.A., et al. Bioactive Polyketides from the Natural Complex of the Sea Urchin-Associated Fungi *Penicillium sajarovii* KMM 4718 and *Aspergillus protuberus* KMM 4747. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24 (23): 16568. doi: 10.3390/ijms242316568
15. Wang R., Liu T.M., Shen M.H., et al. Spiculisporic acids B–D, three new  $\gamma$ -butenolide derivatives from a sea urchin-derived fungus *Aspergillus* sp. HDf2. *Molecules.* 2012; 17 (11): 13175-13182. doi: 10.3390/molecules171113175
16. Nakanishi K., Doi M., Usami Y., et al. Anthcolorins A–F, novel cytotoxic metabolites from a sea urchin-derived *Aspergillus versicolor*. *Tetrahedron.* 2013; 69 (23): 4617-4623. doi: 10.1016/j.tet.2013.04.011
17. Kitano M., Yamada T., Amagata T., et al. Novel pyridino- $\alpha$ -pyrone sesquiterpene type pileotin produced by a sea urchin-derived *Aspergillus* sp. *Tetrahedron Letters.* 2012; 53 (32): 4192-4194. doi: 10.1016/j.tetlet.2012.05.144
18. Letsiou S., Bakea A., Le Goff G., et al. *In vitro* protective effects of marine-derived *Aspergillus puulaauensis* TM124-S4 extract on H2O2-stressed primary human fibroblasts. *Toxicol. In Vitro.* 2020; 66: 104869. doi: 10.1016/j.tiv.2020.104869
19. Li Y.F., Wu X.B., Niaz S.I., et al. Effect of culture conditions on metabolites produced by the crinoid-derived fungus *Aspergillus ruber* 1017. *Nat. Prod. Res.* 2017; 31 (11): 1299-1304. doi: 10.1080/14786419.2016.1244200
20. Hassan A.H., Ibrahim H.A.H., Elshaer M.M., et al. Antimicrobial activity of the sea star (*Astropecten spinulosus*) collected from the Egyptian Mediterranean Sea, Alexandria Egyptian. *Egypt. J. Aquat. Biol. Fish.* 2020; 24 (2): 507-523. doi: 10.21608/ejabf.2020.86046
21. Shankarlal S., Prabu K., Natarajan E. Antimicrobial and antioxidant activity of purple sea urchin shell (*Salmacis virgulata* L. Agassiz and Desor 1846). *American-Eurasian Journal of Scientific Research.* 2011; 6 (3): 178-181.
22. Sumitha R., Dharshana M., Banu N., Vijayalakshmi S. *In vitro* antimicrobial evaluation of an isolated compound from sea star *Stellaster equisteris*. *Biomedical and Pharmacology Journal.* 2022; 15(2): [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00124-7](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00124-7)
23. Sharmin F., Ishizaki S., Nagashima Y. Molecular identification, micronutrient content, antifungal and hemolytic activity of starfish *Asterias amurensis* collected from Kobe coast, Japan. *African Journal of Biotechnology.* 2017; 16 (4): 163-170. doi: 10.5897/AJB2016.15776.
24. Dhinakaran D.I., Lipton A.P. Antitumor and antifungal activities of organic extracts of sea cucumber *Holothuria atra* from the southeast coast of India. *J. Ocean. Univ. China.* 2015; 14: 185-189. doi: 10.1007/s11802-015-2528-x
25. Ereguero M.G., Cordero M.A., Dalayap R., Tabugo S.R. Antifungal activity of selected sea cucumber species from Tukuran, Zamboanga del Sur, Mindanao, Philippines using modified SPOTi assay. *Biodiversitas.* 2022; 23 (11): 6049-6055. doi: 10.13057/biodiv/d231160
26. Ismail H., Lemriss S., Ben Aoun Z., et al. Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean sea cucumber, *Holothuria polii*. *Journal de Mycologie Médicale.* 2008; 18 (1): 23-26. doi.org/10.1016/j.mycmed.2008.01.002
27. *Australian Echinoderms: Biology, Ecology and Evolution.* Ed. by M. Byrne, T. O'Hara. – CSIRO PUBLISHING, 2017; 624 pp.
28. Жизнь животных. В 7 томах. Том 2. Моллюски. Иглокожие. Погонофоры. Щетинкочелюстные. Иглокожие. Полухордовые. Хордовые. Членистоногие. Ракообразные. Под. ред. Л.А. Зенкевича, 1988. [Animal life. In 7 volumes. Volume 2. Mollusks. Echinoderms. Pogonophores. The bristles are mandibular. Echinoderms. Semi-chords. Chordal. Arthropods. Crustaceans. Edited by L.A. Zenkevich, 1988. (In Russ)].
29. Piryaei F., Ghavam Mostafavi P., et al. Description on anatomy and histology of *Echinometra mathaei* (Echinoidea: Camarodonta: Echinometidae), the Persian Gulf sea urchin. *Iranian Journal of Aquatic Animal Health.* 2018; 4 (2): 1-27. doi:10.29252/IJAAH.4.2.1
30. Ziegler A., Faber C., Mueller S., Bartolomaeus T. Systematic comparison and reconstruction of sea urchin (Echinoidea) internal anatomy: a novel approach using magnetic resonance imaging. *BMC Biol.* 2008; 6: 33. doi: 10.1186/1741-7007-6-33
31. Ezhova O.V., Lavrova E.A., Malakhov V.V. Microscopic anatomy of the axial complex in the starfish *Asterias rubens* (Echinodermata, Asteroidea). *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 2013; 40: 643-653. doi: 10.1134/S1062359013080049
32. Schillaci D., Cusimano M.G., Cunsolo V., Saletti R., et al. Immune mediators of sea-cucumber *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) as source of novel antimicrobial and anti-staphylococcal biofilm agents. *AMB Express.* 2013; 3 (1): 35. doi: 10.1186/2191-0855-3-35
33. Byrne M. The Link between Autotomy and CNS Regeneration: Echinoderms as Non-Model Species for Regenerative Biology. *Bioessays.* 2020; 42 (3): e1900219. doi: 10.1002/bies.201900219

Поступила в редакцию журнала 28.06.24

Принята к печати 25.09.24

*Для цитирования:* Шевяков М.А., Мелехина Ю.Э., Королева Ю.Г. Роль пробиотиков и постбиотиков в лечении орофарингеального кандидоза (обзор литературы). Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (3): 11-16. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-11-16

*For citation:* Shevyakov M.A., Melekhina Y.E., Koroleva Y.G. The role of probiotics and postbiotics in the treatment of oropharyngeal candidiasis (literature review). Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (3): 11-16. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-11-16

## РОЛЬ ПРОБИОТИКОВ И ПОСТБИОТИКОВ В ЛЕЧЕНИИ ОРОФАРИНГЕАЛЬНОГО КАНДИДОЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

**Шевяков М.А. (профессор кафедры)\*,  
Мелехина Ю.Э. (доцент), Королева Ю.Г.  
(клин. ординатор)**

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

*Применение средств микробного происхождения для лечения и профилактики орофарингеального кандидоза остается актуальным в связи с нарастающей частотой устойчивости микромицетов к антимикотическим препаратам. В обзоре приведены данные об эффективности некоторых пробиотиков и постбиотиков в терапии орофарингеального кандидоза.*

**Ключевые слова:** орофарингеальный кандидоз, *Candida*, стоматит, пробиотики, постбиотики

## THE ROLE OF PROBIOTICS AND POSTBIOTICS IN THE TREATMENT OF OROPHARYNGEAL CANDIDIASIS (LITERATURE REVIEW)

**Shevyakov M.A. (professor of the department),  
Melekhina Y.E. (associate professor), Koroleva  
Y.G. (clinical resident)**

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

*The use of agents of microbial origin for the treatment and prevention of oropharyngeal candidiasis remains relevant due to the increasing incidence of resistance of micromycetes to antimycotic drugs. This review presents data on the efficacy of some probiotics and postbiotics in the treatment of oropharyngeal candidiasis.*

**Key words:** oropharyngeal candidiasis, *Candida*, stomatitis, probiotics, postbiotics

Орофарингеальный кандидоз (ОФК) – оппортунистическая микотическая инфекция, при которой *Candida* spp. поражают слизистую оболочку ротоглотки [1]. В этом случае кандидоз обусловлен инвазией псевдомицелия *Candida* spp. в слизистую оболочку, а при осмотре это чаще характеризуется псевдомембранозным воспалением (так называемая молочница). Поражение ротоглотки *Candida* spp. может проявляться по-разному, в зависимости от степени иммунной дисфункции и конкретной локализации поражения (язык, дёсны, губы, внутренняя поверхность щеки, глотка и др.) [2]. Наиболее характерным макроскопическим признаком, по которому можно заподозрить заболевание, является творожистый налёт на слизистой оболочке рта (Рис. 1 и 2). Если у пациента нет существенного дефекта воспаления, отмечают боль и жжение во время еды, сухость во рту, отёчность слизистых оболочек, дисфагию, возможно общее недомогание с повышением температуры до 38 °С, нарушения восприятия вкуса [3]. У пациентов с глубоким угнетением иммунитета мико-

\* Контактное лицо: Шевяков Михаил Александрович,  
e-mail: shevyakov@inbox.ru

тические поражения слизистой оболочки не сопровождаются выраженными ощущениями [4].



Рис. 1. Орофарингеальный кандидоз на фоне ингаляционной терапии будесонидом (из архива авторов).



Рис. 2. Орофарингеальный кандидоз на фоне системной терапии метилпреднизолоном (из архива авторов).

К ОФК предрасполагают различные нарушения антифунгальной резистентности локального или системного характера либо их сочетание. К локальным факторам риска развития ОФК относятся: использование зубных протезов и кортикостероидных ингаляторов; нарушение функции слюнных желез; интенсивное табакокурение; гастроэзофагеальный рефлюкс; дисбиоз ротоглотки из-за применения антибактериальных антибиотиков широкого спектра действия [5-8].

Сравнительно чаще ОФК возникает у пациентов с системными дефектами иммунитета, например: при сахарном диабете, у ВИЧ-инфицированных с числом CD4 <200 клеток/мкл, при кахексии, у лиц со

злокачественными гематологическими заболеваниями или злокачественными опухолями солидных органов, получающих цитотоксическую химиотерапию, а также иммуносупрессивные и препараты и глюкокортикоиды [9-11].

ОФК вызывается преимущественно *Candida albicans* – диморфным дрожжевым микромицетом, который является частью нормальной микробиоты кожи, желудочно-кишечного и мочеполового трактов здоровых людей. Для того, чтобы колонизировать ротоглотку, *Candida* spp. способны адгезироваться к эпителиальным клеткам слизистой оболочки полости рта. В случае заболевания грибы могут проникать в эпителиальные клетки слизистой оболочки ротоглотки рта с помощью различных механизмов: индуцированного эндоцитоза и через трансформацию в ростовые трубки (так называемый псевдомицелий) [12, 13]. ОФК может быть отправной точкой для развития инвазивных инфекций, обусловленных *Candida* spp. Последние являются значимой причиной заболеваемости и смертности у пациентов с внутрибольничными инфекциями в развитых странах. Смертность, связанная с кандидемией, составляет 15-25% у взрослых и 10-15% – у новорожденных, но может достигать в особых группах больных 47%. Терапия инвазивных инфекций, вызванных *Candida* spp., требует значительных затрат [9, 14].

Для лечения ОФК используют местнодействующие и системные антимикотические препараты трех основных групп: полиеновые (амфотерицин В, нистатин), азоловые (клотримазол, флуконазол, итраконазол, позаконазол и другие) и эхинокандины (каспофунгин, анидулофунгин, микафунгин) [9, 14]. Данные о чувствительности различных видов *Candida* к противогрибковым препаратам существенно различаются [15]. На основании анализа опубликованных результатов международных и национальных проектов последнего десятилетия, изучавших формирование резистентности *Candida* spp. к азолам, сделан вывод о снижении чувствительности *C. albicans* к азоловым антимикотикам: количество чувствительных к флуконазолу штаммов за 7-летний период наблюдения уменьшилось со 100 до 70,4%, к миконазолу – со 100 до 63%, к итраконазолу – с 96,2 до 48,2%. Значительно увеличилось количество штаммов *Candida* spp. с дозозависимой чувствительностью [16].

По данным исследований, выполненных в Российской Федерации, чувствительность клинических изолятов *C. albicans* к препаратам флуконазола составляет 41,7-79,8%. [17]. Известно, что если кандидоз вызван не-*albicans* видами *Candida*, то высока вероятность устойчивости к лечению азоловыми антимикотиками и даже эхинокандинами [15]. В то же время в ходе большого европейского многоцентрового исследования было показано, что изоляты, по-

лученные от больных инвазивным кандидозом, лишь в 47,1% случаев являются видом *C. albicans* [18].

В условиях нарастающей устойчивости грибов к антимикотикам мировое научное сообщество находится в поиске новых решений лечения кандидоза. Актуальной тенденцией стало изучение терапевтического потенциала средств микробного происхождения – постбиотиков (бактериальных лизатов), пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков.

В 2023 г Всемирная гастроэнтерологическая организация (WGO) уточнила классификацию средств микробного происхождения и ввела новый термин «постбиотик» [19]. Эксперты WGO более не рекомендуют применять термины «парапробиотики», «иммунобиотики» из-за отсутствия четких определений и возможной путаницы.

На сегодняшний день следует использовать следующую терминологию:

- пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу здоровью человека;

- пребиотики – это избирательно ферментируемый ингредиент, вызывающий специфические изменения состава и/или активности микробиоты желудочно-кишечного тракта, что положительно сказывается на здоровье человека;

- синбиотики – это смесь, содержащая живые микроорганизмы и субстрат(-ы), избирательно используемые микроорганизмами, которые приносят пользу здоровью человека; по сути это комплекс пробиотиков и пребиотиков;

- постбиотики – это препараты из неживых (убитых) микроорганизмов и/или их компонентов, приносящих пользу здоровью человека; по сути этот термин аналогичен термину «бактериальные лизаты».

Также подвергся уточнению термин «молочно-кислые бактерии». Молочно-кислые бактерии – это группа микроаэрофильных грамположительных микроорганизмов, сбраживающих углеводы с образованием молочной кислоты. Многие из них являются непатогенными и нетоксигенными микроорганизмами и используются для ферментации продуктов с целью их сохранения и употребления в пищу, а также для создания пробиотиков и постбиотиков. В группу входят роды *Lactobacillus*, *Lactocaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lactococcus* и *Streptococcus thermophiles* и другие. Многие пробиотики являются молочно-кислыми бактериями; некоторые штаммы, например, *Escherichia coli* или *Akkermansia mucinophila*, спорообразующие бактерии и сахаромицеты применяются в качестве пробиотиков, но не относятся к молочно-кислым. Лактобактерии, наряду с бифидобактериями, исторически были и являются сейчас самыми распространенными пробиотиками. В этом качестве также используются дрожжевые микроорганизмы

*Saccharomyces boulardii* и некоторые виды *E. coli* и *Bacillus*. Новым пробиотиком названа бактерия *Clostridium butyricum*, недавно одобренная в этом качестве Европейским союзом.

Молочно-кислые бактерии могут принести пользу здоровью человека. Однако эксперты WGO призывают оставить термин «пробиотик» для тех живых микроорганизмов, которые доказали позитивные терапевтические эффекты в контролируемых исследованиях на людях. Доказательством эффективности пробиотика считают полученное в рандомизированном клиническом исследовании положительное влияние, например, на желудочно-кишечный тракт или иммунную систему, определенного штамма или комбинации [19].

Сведений об эффективности и безопасности средств микробного происхождения, применяемых для лечения ОФК, недостаточно. Мы провели направленный систематический анализ литературы по этой теме с помощью баз данных MEDLINE/PubMed, EMBASE, Web of science, ClinicalTrials, Google Scholar, Elibrary.ru, Cochrane Library.

Предполагаемыми механизмами действия пробиотиков, осуществляющими терапевтический эффект в отношении ОФК, являются:

1. Антагонизм в отношении *Candida* spp., то есть конкуренция бактерий и грибов за питательные вещества, содержащиеся в определенной экологической нише, препятствие адгезии микромицетов к рецепторам эпителиоцитов, прямое взаимодействие бактериальных и грибковых клеток, блокирующее трансформацию последних в нити псевдомицелия [20]. Например, живые штаммы *Lactobacillus reuteri* вырабатывают реутерин – антимикробный агент, похожий на перекись водорода, который может активно препятствовать кандидозу полости рта путем селективного ингибирования микромицетов [21].

2. Стимуляция пробиотиками механизмов локального иммунитета и неспецифической резистентности ротоглотки за счет синтеза антимикробных пептидов, стабилизации плотных контактов многослойного плоского эпителия, синтез сигнальных молекул и антигенов, влияющих на дифференцировку Т-лимфоцитов в лимфоидных скоплениях ротоглоточного кольца [22].

По данным двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования, проведенного в группе пациентов гериатрических учреждений, на фоне приема пастилок, содержащих 2 штамма пробиотической бактерии *L. reuteri* (штамм DSM 17938 и штамм ATCC PTA 5289), дважды в день (утром и вечером), наблюдали статистически значимое снижение присутствия клеток *Candida* spp., причем эта разница была статистически значимой как при исследовании слюны, так и в содержимом зубного налета ( $p < 0,05$ ) [23].

В двойном слепом рандомизированном исследовании, где группе из 59 пациентов без клинических симптомов, использовавших зубные протезы, и с присутствием *Candida* spp. в полости рта, ежедневно наносили на небную поверхность верхнечелюстного протеза пробиотическую смесь, содержащую лиофилизированные *Lactobacillus rhamnosus* HS111, *Lactobacillus acidophilus* HS101 и *Bifidobacterium bifidum*, частота обнаружения *Candida* spp. снизилась с 100% до 16,7%. По мнению авторов, этот мультиштаммовый пробиотик был эффективен для снижения интенсивности колонизации полости рта *Candida* spp. у пожилых людей, носящих съёмные зубные протезы, и может применяться для профилактики ОФК [24].

Кроме лактобактерий, в состав пробиотических препаратов могут быть включены штаммы *Streptococcus salivarius*, которые оказывают ингибирующее действие на клетки *Candida* spp. и патогенной бактериобиоты, в том числе возбудителей пародонтоза [25, 26]. Показано, что штамм *S. salivarius* BLIS K12 продуцирует саливарицин (Salivaricin A и B), обладающий выраженной ингибирующей активностью против патогенных микроорганизмов полости рта [27].

Пробиотик на основе *S. salivarius* BLIS K12 в РФ зарегистрирован как БАД и используется в качестве профилактики и лечения ОФК и пародонтита, ассоциированного с *Candida* spp. [28, 29]. Возможно совместное применение местных форм нистатина и пробиотика, содержащего *S. salivarius*, при этом была продемонстрирована хорошая эффективность терапии ОФК [29].

В другом исследовании применение пробиотика, содержащего штаммы спорообразующих бактерий *B. subtilis* и *B. licheniformis*, курсом 7-10 дней, в составе комплексного лечения детей с хроническим кандидозом полости рта было оценено авторами как достаточно эффективное. Данная пробиотическая комбинация способствовала не только элиминации возбудителей заболевания, но и восстановлению микробиоценоза полости рта. Через 14 дней терапии элиминация *Candida* spp. с поверхности слизистой оболочки полости рта была зафиксирована в 95,1% случаев; положительный эффект в течение шести месяцев сохранялся у пролеченных пробиотиком 87,7% детей; частота рецидивов составила 9,75%. На фоне применения препарата произошло восстановление микроэкологии полости рта за счет уменьшения частоты выявления условно-патогенных бактерий и микромицетов *Candida* spp., а также восстановление уровня резидентных штаммов *S. salivarius* [30].

Ряд авторов считает перспективным применение для лечения ОФК пробиотиков, содержащих *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 и *Streptococcus thermophilus* [31, 32].

Постбиотики, в отличие от пробиотиков, не содержат живых микробных клеток. Их терапевтический потенциал в основном рассчитан на стимуляцию локального иммунитета слизистых оболочек по функциональным связям антиген-презентирующих (дендритных) клеток с наивными лимфоцитами и врожденными лимфоидными клетками локальных лимфоидных скоплений. Для создания конкретных постбиотиков пытаются использовать разные штаммы бактерий – конкурентов микромицетов. Например, убитые штаммы *Enterococcus faecalis* показали способность угнетать рост и адгезию *C. albicans* к эпителиоцитам мышей, возможно, за счет прямого связывания с мембранными рецепторами грибов [33].

Одним из часто назначаемых для терапии воспалительных поражений слизистой оболочки полости рта постбиотиков является поливалентный антигенный комплекс, в состав которого входят бактериальные лизаты *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentatum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Fusiformis fusiformis*, *Candida albicans*. Вышеуказанные микроорганизмы наиболее часто вызывают инфекционные процессы в полости рта и глотке. В отчете исследователей этого лекарственного средства указано, что его основными механизмами действия являются: усиление фагоцитарной активности за счет качественного и количественного улучшения фагоцитоза; повышение содержания в слюне лизоцима; стимуляция и увеличение числа иммунокомпетентных клеток, ответственных за выработку антител; стимуляция и увеличение количества секреторных иммуноглобулинов IgA; замедление окислительного метаболизма полиморфно-ядерных клеток [34]. В других работах подтверждено свойство данного постбиотика достоверно увеличивать содержание лизоцима и иммуноглобулинов класса А в слюне пролеченных пациентов [35].

Этот же постбиотик показал эффективность при терапии острого герпетического стоматита у 80 детей в возрасте от 1 до 4,5 лет. Наряду с противовирусной терапией пациентам назначали постбиотик по 6-8 драже на протяжении 5-7 дней при легком течении заболевания, 8-10 дней – при средней тяжести, 15 дней – при тяжелом течении. Постбиотик уменьшал такие клинические симптомы, как боль и кровоточивость десен, кроме того, наблюдали положительную динамику показателей лизоцима и секреторного IgA в слюне [35]. В другом клиническом исследовании данный постбиотик применили у 88 больных с различными заболеваниями полости рта. Клинический эффект проявлялся на 3-4 день приема препарата в виде уменьшения воспалительных яв-

ний и болезненности слизистой оболочки полости рта. Клиническое выздоровление наступило у 24% пациентов, значительное улучшение и улучшение – у 71%, наилучшие результаты получены при стоматитах. Повторные курсы терапии постбиотиком при хронических заболеваниях (рецидивирующем ОФК, гингивитах) удлиняли сроки ремиссии и уменьшали число рецидивов [36].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимо подчеркнуть, что у средств микробного происхождения (пробиотиков, синбиотиков, постбиотиков), безусловно, имеется потенциал для оптимизации лечения и профилактики ОФК. Это тем

более важно в условиях сегодняшнего дня, когда мы наблюдаем тревожную тенденцию увеличения числа случаев кандидоза, обусловленного *Candida spp.*, резистентных к собственно антифунгальным средствам. В отличие от синтетических антифунгальных препаратов средства микробного происхождения гораздо безопаснее, подходят для неограниченно длительного применения. Иммуномодуляционный потенциал современных пробиотиков и постбиотиков делает их важными средствами в профилактике рецидивов кандидоза слизистых оболочек пищеварительного тракта.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Vila T., Sultan A.S., Montelongo-Jauregui D., Jabra-Rizk M.A. Oral candidiasis: a disease of opportunity. *J Fungi* (Basel). 2020; 6 (1): 15. doi: 10.3390/jof6010015
2. Gow N.A., Brown A.J., Odds F.C. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 2002; 5: 366-371. doi: 10.1016/s1369-5274(02)00338-7
3. Свистушкин В.М. Орофарингеальный кандидоз: диагностика и лечение. *Клиническая фармакология и терапия.* 2010, 19 (4): 67-72. [Svistushkin V. Oropharyngeal candidiasis: diagnosis and treatment. *Clinical pharmacology and therapy.* 2010, 19 (4): 67-72. (In Russ)].
4. Swidergall M. & Filler S.G. Oropharyngeal candidiasis: fungal invasion and epithelial cell responses. *PLOS Pathogens.* 2017; 13 (1). doi:10.1371/journal.ppat.1006056
5. Ненашева Н.М. Безопасность ингаляционных кортикостероидов в терапии бронхиальной астмы. *Пульмонология* 2014; 3: 113-120. [Nenasheva N.M. Safety of inhaled corticosteroids in the therapy of bronchial asthma. *Pulmonologiya.* 2014; 3: 113-120. (In Russ.)]. doi.org/10.18093/0869-0189-2014-0-3-113-120
6. Buhl R. Local oropharyngeal side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. *Allergy.* 2006; 61 (5): 518-26. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01090.x
7. Дворецкий Л.И., Сергеева Е.В. Место глюкокортикоидов в лечении больных ХОБЛ. *Российский Медицинский Журнал.* 2008; 7: 466. [Dvoretzky L.I., Sergeeva E.V. The place of glucocorticoids in the treatment of COPD patients. *Russian Medical Journal.* 2008; 7: 466. (In Russ)].
8. Sobieraj D., White C., Coleman C. Benefits and risks of adjunctive inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: A meta-analysis. *Clinical Therapeutics.* 2008; 30 (8): 1416-1425. doi:10.1016/j.clinthera.2008.08
9. ECCMID-ESHAM New guidelines on gastrointestinal candidiasis. 2024: 116-117.
10. Данилова Е.Ю., Шабашова Н.В., Фролова Е.В. и др. Иммунопатогенез орофарингеального кандидоза у больных гемобластозами. *Проблемы медицинской микологии.* 2021; 23 (3): 38-45. [Danilova J.Y., Shabashova N.V., Frolova E.V., et al. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in patients with hemoblastosis. *Problems in Medical Mycology.* 2021; 23 (3): 38-45. (In Russ)]. doi:10.24412/1999-6780-2021-3-38-45
11. Шевяков М.А., Парамонова О.В., Котрехова Л.П. и др. Рецидивирующий кандидоз ротоглотки и пищевода у пациента с иммунной дисфункцией после тимусэктомии. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2022; 8: 190-194. [Shevyakov M.A., Paramonova O.V., Kotrekhova L.P., et al. Recurrent candidiasis of the oropharynx and esophagus in a patient with immune dysfunction after thymusectomy. *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 2022; 8: 190-194. (In Russ.)]. doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-204-8-190-194
12. Trautwein-Weidner K., Gladiator A., Nur S., et al. IL-17-mediated antifungal defense in the oral mucosa is independent of neutrophils. *Mucosal Immunol.* 2015; 8: 221-231. doi: 10.1038/mi.2014
13. Liu Y., Shetty A.C., Schwartz J.A., et al. New signaling pathways govern the host response to *C. albicans* infection in various niches. *Genome Res.* 2015; 25: 679-689. doi: 10.1101/gr.187427.114
14. Pappas P.G., Rotstein C.M., Betts R.F., et al. Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 45 (7): 883-93. doi: 10.1086/520980
15. Васильева Н.В., Тараскина А.Е., Богомолова Т.С. и др. Формирование резистентности к азолам клинического изолята *Candida auris* – возбудителя кандидемии. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2020; 9 (2): 70-76. [Vasilyeva N.V., Taraskina A.E., Bogomolova T.S., et al. The development of resistance to azoles of the clinical isolate *Candida auris* - the causative agent of candidaemia. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training.* 2020; 9 (2): 70-6. (in Russ.)]. doi: 10.33029/2305-3496-2020-9-2-70-76



16. Желтикова Т.М. Мониторинг резистентности клинических штаммов дрожжей рода *Candida* к флуконазолу. Мед. совет. 2017; 2: 70-74. [Zheltikova T.M. Monitoring the resistance of clinical strains of *Candida* yeast to fluconazole (a brief literature review). Medical Council. 2017; 2: 70-74. (In Russ.)]. doi.org/10.21518/2079-701X-2017-2-70-74
17. Новикова В.В., Зубов П.В., Старцева О.С. Сравнительный анализ чувствительности клинических изолятов *Candida albicans* к препаратам флуконазола. Врач. 2017; 5: 29-32. [Novikova V.V., Zubov P.V., Startseva O.S. Comparative analysis of the fluconazole susceptibility of clinical isolates of *Candida albicans*. The Doctor. 2017; 5: 29-32. (In Russ.)].
18. Arendrup M.C., Arikian-Akdagli S., Jørgensen K.M., et al. European candidaemia is characterised by notable differential epidemiology and susceptibility pattern: Results from the ECMM *Candida* III study. J. Infect. 2023; 87 (5): 428-437. doi: 10.1016/j.jinf.2023.08.001
19. World Gastroenterology Organisation. WGO Global Guideline Probiotics and prebiotics. 2023:P53.
20. Passariello A., Agricole P., Malferteiner P. A critical appraisal of probiotics (as drugs or food supplements) in gastrointestinal diseases. Curr. Med. Res. Opin. 2014; 30 (6): 1055-1064. doi: 10.1185/03007995.2014.898138
21. Spinler J.K., Taweechoatipatr M., Rognerud C.L., et al. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. Anaerobe. 2008; 14 (3): 166-71. doi: 10.1016/j.anaerobe.2008.02.001
22. Li D., Li Q., Liu C., et al. Efficacy and safety of probiotics in the treatment of *Candida*-associated stomatitis. Mycoses. 2014; 57 (3): 141-6. doi: 10.1111/myc.12116
23. Kraft-Bodi E., Jørgensen M.R., Keller M.K., et al. Effect of probiotic bacteria on oral *Candida* in frail elderly. J. Dent. Res. 2015; 94 (9 Suppl): 181S-6S. doi: 10.1177/0022034515595950
24. Ishikawa K.H., Mayer M.P.A., Miyazima T.Y., et al. A multispecies probiotic reduces oral *Candida* colonization in denture wearers. J. Prosthodont. 2015; 24 (3): 194-9. doi: 10.1111/jopr.12198
25. Wescombe P.A., Hale J.D., Heng N.C., Tagg J.R. Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. Future Microbiol. 2012; 7 (12): 1355-71. doi: 10.2217/fmb.12.113
26. Zupancic K., Kriksic V., Kovacevic I., Kovacevic D. Influence of oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on ear and oral cavity health in humans: systematic review. Probiotics Antimicrob. Proteins. 2017; 9 (2): 102-110. doi: 10.1007/s12602-017-9261-2
27. Chaffanel F., Charron-Bourgoin F., Soligot C., et al. Surface proteins involved in the adhesion of *Streptococcus salivarius* to human intestinal epithelial cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018; 102: 2851-2865. doi.org/10.1007/s00253-018-8794
28. Ishijima S.A., Hayama K., Burton J.P., et al. Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the *in vitro* growth of *Candida albicans* and its protective effect in an oral candidiasis model. Appl. Environ. Microbiol. 2012; 78 (7): 2190-9. doi: 10.1128/AEM.07055-11
29. Hu L., Mao Q., Zhou P., et al. Effects of *Streptococcus salivarius* K12 with nystatin on oral candidiasis. Oral Dis. 2019; 25 (6): 1573-1580. doi: 10.1111/odi.13142
30. Алиева Е.В., Джафаров Э.М., Матвиенко Э.Р., Матюта М.А. Перспективы применения пробиотиков при лечении воспалительных заболеваний пародонта. Вестник молодого ученого. 2021; 10 (3): 145-146. [Aliieva E.V., Dzhafarov E.M., Matvienko E.R., Matyuta M.A. Prospects for the use of probiotics in the treatment of inflammatory periodontal diseases. Bulletin of the young scientist. 2021; 10 (3): 145-146. (In Russ.)].
31. Savichuk N.O. Probiotic therapy of chronic oral candidiasis in children. Sovremennaya Pediatriya. 2014; 2 (58): 32-34. doi 10.15574/SP.2014.58.32
32. Azad A., Ranjbaran A., Zareshahrbadi Z., et al. Protective effects of the probiotic bacterium *Streptococcus thermophilus* on *Candida albicans* morphogenesis and a murine model of oral candidiasis. Iran J. Med. Sci. 2021; 46 (3): 207-217. doi: 10.30476/ijms.2020.82080.0
33. Ishijima S.A., Hayama K., Ninomiya K., et al. Protection of mice from oral candidiasis by heat-killed *Enterococcus faecalis*, possibly through its direct binding to *Candida albicans*. Med. Mycol. J. 2014; 55 (1): E9-E19. doi: 10.3314/mmj.55.e9
34. Сергеев Ю.В., Караулов А.В. Иммунокорректирующая терапия при инфекционных поражениях полости рта. Лечащий врач. 2000; 2. [Sergeev Yu.V., Karaulov A.V. Immunocorrective therapy for infectious lesions of the oral cavity. The attending physician. 2000; 2. (In Russ.)].
35. Jeanniard G. Imudon. Therapeutique Actuelle. Jan. 1993.
36. Ippolitov Y.A., Garkavets S.A., Rusanova T.A., et al. Local immune disbalance correction of the oral cavity as a part of chronic catarrhal gingivitis complex treatment in children. 2017; 6 (2). doi: 10.15275/rusomj.2017.0209

Поступила в редакцию журнала 03.08.24

Принята к печати 07.10.24

*Для цитирования:* Корнишева В.Г., Мирзоян В.Л. К вопросу об изоморфной реакции Кёбнера и изотопической реакции Вольфа (обзор литературы). Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (3): 17-23. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-17-23

*For citation:* Kornisheva V.G., Mirzoyan V.L. On the issue of the isomorphic Koebner reaction and the isotopic Wolf reaction (literature review). Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (3): 17-23. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-17-23

## К ВОПРОСУ ОБ ИЗОМОРФНОЙ РЕАКЦИИ КЁБНЕРА И ИЗОТОПИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ВОЛЬФА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

**Корнишева В.Г. (профессор кафедры)\*,  
Мирзоян В.Л. (доцент)**

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

*В обзоре литературы представлены сведения об этиологии и патогенезе кожных феноменов: изоморфной реакции Кёбнера и изотопической реакции Вольфа. Для феномена Кёбнера характерно появление после травмы новых псориазических высыпаний на здоровых участках кожи. Термин «изотопический ответ» был предложен Wolf R. и соавторами в 1995 г. и означает развитие нового дерматоза на месте первичного, уже регрессировавшего и не имеющего прямого отношения к первому. Не существует четкого критерия, позволяющего отличить изотопическую ответ от реакции Кёбнера.*

**Ключевые слова:** изоморфная реакция Кёбнера, изотопическая реакция Вольфа

## ON THE ISSUE OF THE ISOMORPHIC KOEBSNER REACTION AND THE ISOTOPIC WOLF REACTION (LITERATURE REVIEW)

**Kornisheva V.G. (professor of the department),  
Mirzoyan V.L. (associate professor)**

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

*The literature review provides information on the etiology and pathogenesis of skin phenomena: the isomorphic Koebner reaction and the isotopic Wolf reaction. The Koebner phenomenon is characterized by the appearance of new psoriatic rashes on healthy areas of the skin after its injury. The term "isotopic response" was proposed by R. Wolf and co-authors in 1995 and means the development of a new dermatosis at the site of the primary one, which has already regressed and has no direct relation to the first. There is no clear criterion for distinguishing the isotopic response from the Koebner reaction.*

**Key words:** isomorphic Koebner reaction, isotopic Wolf reaction

Кожные заболевания могут реагировать (или не реагировать) на самые разнообразные повреждения кожи или даже на другие существующие дерматозы. Названы и классифицированы такие явления, как феномен или изоморфная реакция Кёбнера, изотопическая реакция Вольфа, феномен Ренбёка, отсутствие изотопической реакции Вольфа или изотопическая неотзывчивость Вольфа [1, 2]. Эти явления являются продуктом описательной клинической дерматологии и иллюстрируют наличие или, наоборот, отсутствие кожных высыпаний на месте травмы, татуировки, введения вакцины, облучения.

Из истории дерматовенерологии известно о понятии экспрессии «locus minoris resistentiae» (или участка с пониженной резистентностью), которое ввел Lipschütz В. для описания тропизма вторичных сифилитических поражений на татуировках [3]. Этот термин, редко используемый в современных дерматологических публикациях, предлагает общую физиопатогенетическую основу феноменов Кёбнера

\* Контактное лицо: Корнишева Вера Гавриловна,  
e-mail: v.g.kornisheva@gmail.com

и Вольфа: в бывшем участке воспаления кожи сохраняется это событие «в памяти» посредством очаговых микрососудистых и воспалительных модификаций, которые предрасполагают его к развитию нового поражения [2]. В 2009 г. Ruocco V. с коллегами предложили объединяющую концепцию, включающую «locus minoris resistentiae» под названием «участок с ослабленным иммунитетом» для объяснения патогенеза поражений [4].

Феномен Кёбнера (реакция Кёбнера, Köbner phenomenon, Koebner phenomenon, Koebner response), или изоморфная реакция (изоморфная реакция Кёбнера, изоморфная провоцирующая реакция, isomorphic response) (от греч. *isos* – равный, одинаковый, соразмерный; *morphe* – форма, вид) (РК) – это известнейший дерматологический симптом, включающий появление на неизменной коже новых морфологических элементов сыпи после травматизации, наблюдающийся в прогрессирующей (острой) стадии ряда кожных заболеваний (псориаз, красный плоский лишай, витилиго и др.) [5, 6]. У пациента с псориазом, у которого отмечается кёбнеризация, возникают новые поражения вдоль участков повреждения кожи. Феномен Кёбнера может развиваться в любой анатомической области, в том числе в классических областях псориазического поражения и в областях, которые обычно щадятся, например, на лице. «Строгое» прочтение РК приводит к определению его по воспроизведению очагов, идентичных ранее существовавшему дерматозу («изоморфная», та же форма). При этом свежие очаги высыпаний, возникающие на непораженной коже после раздражения при воспроизведении РК, гистопатологически и клинически аналогичны поражениям основного дерматоза больного. Самый первый случай изоморфной реакции, зафиксированный Г. Кёбнером, был отмечен у укушенного лошадью пациента с псориазом. Свежие псориазические высыпания возникли в проекции следов от зубов лошади [5]. Выявление феномена Кёбнера в определенной мере подстегнуло исследователей изучать патогенез псориазических высыпаний в клинической практике и в экспериментальных условиях.

Согласно наблюдениям, от момента травмы до возникновения спровоцированных ею кожных высыпаний дерматоза в среднем проходит от 10 до 20 суток, но этот период может варьировать от нескольких дней до 2 лет [7]. Такой широкий диапазон предполагает различную чувствительность к развитию феномена Кёбнера, который может быть уникальной характеристикой кожи пациента или основного процесса заболевания.

По статистике, изоморфная реакция Кёбнера наиболее часто проявляется при псориазе, при этом, по разным данным, составляет от 25 до 75% от всех клинических случаев в прогрессирующей стадии псориаза. Поэтому в дерматологической практике

появились формулировки: *psoriasis provocata* (спровоцированный псориаз), *psoriasis traumatica* (травматический псориаз), *psoriasis factitia* (искусственный псориаз) [8, 9]. Феномен Кёбнера также был описан при других дерматозах (в т.ч. как проявление дебюта патологии) или заболеваниях с кожными проявлениями, включая витилиго, красный плоский лишай, вирусные бородавки, контагиозный моллюск, буллезный пемфигоид, герпетический дерматоз Дюринга, склеродермию, липоидный некробиоз, васкулит, ревматоидный артрит, диффузные заболевания соединительной ткани, генодерматозы, опухоли и др. [7, 10].

В качестве триггерных факторов развития высыпаний посредством активации изоморфной реакции могут выступать самые разнообразные повреждающие воздействия на кожу – как внешние (экзогенные), так и внутренние (эндогенные) [5, 8, 11-13]. К внешним относят физические факторы: температурные воздействия (ожоги, отморожения), давление, трение (в т.ч. трение или давление одеждой, обувью, при бритье, сосание пальца и т.п.), излучение (ультрафиолетовое, рентгеновское, лазерное), хирургические разрезы, послеоперационные швы, пункции иглой, протезирование, баночную терапию, применение жидкого азота, электрокардиограммы, травмы от маникюра/педикюра, стрии, укусы животных и насекомых, зуд. Также триггерами могут быть факторы химической природы (кислоты, щелочи, любого рода химически раздражающие кожу средства), аллергические реакции (кожные скарификационные пробы, лоскутные кожные алерготесты, проба Манту [14], реакции фоточувствительности, вакцинация (против туберкулеза – БЦЖ, гриппа и др.), татуировки, воздействия уходовых средств (спрея для волос, краски для волос и т.д.), нанесение на кожу лекарственных наружных препаратов (например, спиртового раствора йода и др.), сезонные условия (зима, весна, лето, осень). Также могут иметь значение стрессы, метаболические нарушения, острые и хронические интоксикации, инфекции и др. как эндогенные триггерные факторы.

На сегодняшний день механизмы патогенеза феномена Кёбнера еще полностью не изучены. Научные исследования подтверждают, что травма эпидермиса имеет решающее значение в развитии изоморфной реакции, но одной этой причины недостаточно для возникновения новых псориазических поражений (данные исследований феномена Кёбнера при других дерматозах ограничены).

Выявлена особая патогенетическая значимость ряда патологических факторов (иммунологических, генетических, микроциркуляторных, эндокринных, ферментных, неврологических, факторов роста и т.д.), среди которых особенно выделяют нарушения иммунологических механизмов (как врожденного, так и приобретенного звеньев иммунитета у генети-

чески предрасположенных лиц), изменения дермальных капилляров. Феномен Кёбнера играет решающую роль в возникновении новых (вторичных) псориазических поражений в здоровых областях тела после травмы за счет избыточного образования VEGF, присутствия  $\alpha 2 \beta 1$  интегрин в супра-базальных слоях эпидермиса, повышенной экспрессии псориазина и кебнеризина в эпидермисе, преобладания CD4+ клеток над CD8+ Т-клетками, повышения уровня CXCL8 и CCL20 (хемокинов), снижения уровня полицистина 1, AСKR2 и ионотропных NMDAR [6, 15-17].

Таким образом, изоморфная реакция Кёбнера является иммуноопосредованной, с участием цитокинов и аутоантигенов или специфичных для заболевания реакций, таких как реакции, опосредованные Т-клетками, сопровождающиеся пролиферацией кератиноцитов и ангиогенезом при псориазе [2]. Некоторые исследователи полагают, что для индукции реакции Кёбнера должен быть задействован сосочковый слой дермы, предполагая, что необходимы повреждение эпидермальных клеток и дермальное воспаление [7].

Феномен Кёбнера требует дифференциации от обратного феномена Кёбнера, который представляет собой исчезновение поражений кожи после травмы поверх существующих повреждений. Euge R.W., Krueger G.G. (1982) при изучении реакции на стандартное повреждение пораженной и непораженной кожи у двадцати четырех человек с псориазом обнаружили, что у 25% пациентов наблюдалась положительная реакция Кёбнера, а у 67% – положительная «обратная» реакция Кёбнера (исчезновение псориаза после повреждения кожи). Если псориаз возникал в одной области повреждения, то во всех поврежденных областях развивался псориаз – феномен «все или ничего». Если псориаз исчезал на травмированном участке, то на непораженных участках псориаз не возникал. Таким образом, «обратная» изоморфная реакция Кёбнера и реакция Кёбнера являются взаимоисключающими. По данным авторов, активность заболевания не предсказывала появления положительной реакции Кёбнера, но положительная реакция Кёбнера предсказывала последующую активность заболевания [18]. Известно также, что кольцевидные гранулемы могут исчезнуть после биопсии кожи [19]. Эти явления иногда включают регрессию поражений, не затронутых непосредственно травмой, например, регрессию поражений витилиго, расположенных на расстоянии от аутологичного кожного трансплантата, настолько, что был предложен термин «дистанционный обратный феномен Кёбнера» [20]. Обратный ответ Кёбнера – это отсутствие или исчезновение поражений на отдельных участках кожи. Некоторые авторы расширяют определение этого обратного феномена Кёбнера до отсутствия дерматоза на травмированном участке [21]. Для это-

го специфического явления Bernhard J.D. и коллегами в 1982 г. был предложен термин «изоморфное отсутствие реакции Кёбнера» [22]. Имеются сообщения об обратном феномене Кёбнера при лейкоцитокластическом васкулите [23] и линейном лишее [24].

Феномен Кёбнера может быть важным критерием при установлении клинического диагноза дерматоза (особенно псориаза, красного плоского лишая и т.д.), а также определения стадии активности дерматоза [25].

Boyd A.S., Neldner K.H. (1990) классифицировали клинические состояния с зарегистрированной кебнеризацией на 4 категории: 1) истинная кебнеризация, характерная для псориаза, витилиго, красного плоского лишая и др.; 2) псевдокебнеризация; 3) случайная травматическая локализация поражений; 4) слабые или сомнительные процессы, вызванные травмой [7]. При дифференциальной диагностике важно отличать феномен Кёбнера от псевдофеномена Кёбнера, при котором инфекционные агенты (например, вирусы) вызывают распространение мноморфных поражений по ранее непораженной коже [7]. Феномен псевдо-Кёбнера возникает при таких заболеваниях, как контактный моллюск и инфекционные бородавки, вызванные вирусом папилломы человека.

Феномен Кёбнера не следует путать с патергией – термином, применяемым для описания случаев, когда незначительная травма может вызвать поражение кожи [26]. Поражения, развивающиеся в результате патергии, обычно представляют собой неспецифические папулы или пустулы, которые могут перерасти в кожные язвы. Патергия, обычно встречающаяся при таких состояниях, как гангренозная пиодермия, болезнь Бехчета, синдром Свита, также используется в качестве клинического диагностического теста. В месте, где была выявлена положительная патергия, при гистопатологии часто обнаруживается моноцитарный инфильтрат [26]. Напротив, поражения, возникающие в результате феномена Кёбнера, отражают основное кожное заболевание пациента, такое как псориаз или витилиго.

По степени тяжести изоморфную реакцию можно разделить на 4 состояния: отсутствие, abortивное (поражения исчезают спонтанно примерно через 2 недели), минимальное (очаговые поражения вокруг области травмы) и максимальное (широко распространенные поражения) [26].

Кебнеризация может существенно повлиять на пациентов с псориазом, поскольку любое повреждение их кожи, включая татуировки и инъекции, способно вызвать обострение заболевания [1]. В одном исследовании показано, что у многих опрошенных пациентов псориаз развивался в течение нескольких недель после нанесения татуировки [27]. У меньшинства больных псориазом был ограничен местом

татуировки, но у большей части после нанесения наблюдали его генерализованную форму [27]. Поскольку феномен Кёбнера не является уникальным болезненным процессом, а скорее активацией основного кожного заболевания, лечение поражений, возникающих в результате кёбнеризации, зависит от терапии основного заболевания. При витилиго площадь пораженной поверхности тела значительно больше при наличии кёбнеризации [10], которая коррелирует с более высокой активностью заболевания в течение последующих 12 месяцев. Более низкий ответ на лечение также отмечали у пациентов с витилиго, у которых наблюдалась кёбнеризация. Таким образом, у больных витилиго кёбнеризация может служить клиническим индикатором активности заболевания и предиктором ответа на терапию [10].

Следует отличать истинный феномен Кёбнера от изотопической реакции Вольфа. Изотопическая реакция Вольфа (ИРВ) – такое название дали в 1995 г. Wolf R. и соавторы феномену развития нового кожного заболевания непосредственно на месте другого, уже регрессировавшего дерматоза [1, 2]. Важными условиями, отвечающими феномену Вольфа, были названы внешне здоровая кожа в промежутке между первым и вторым кожным процессом и отсутствие экзогенных воздействий на очаг (механической травмы, ионизирующего излучения, химических веществ и т.д.). Понятие «Wolf's isotopic response» было включено в «Иллюстрированный словарь дерматологических эпонимов Стедмана» [1]. В 2017 г. Wolf R. с коллегами расширили этот критерий изотопической реакции кожи и утверждали, что рубцы, пигментные изменения и другие тонкие изменения, возникающие во вторичном дерматозе в результате первого, также должны быть включены. Интервал между первичным кожным заболеванием и возникновением ИРВ варьирует от нескольких недель до нескольких лет [5]. Наиболее распространенными дерматозами, предрасполагающим к возникновению изотопической реакции, являются вирусные инфекции (herpes zoster, herpes simplex, ветряная оспа) [2]. Вирусы простого герпеса (ВПГ-1/ВПГ-2) и вирус ветряной оспы (ВВО) имеют несколько общих характеристик: являются эпидермонеуротропными; вызывают кожные высыпания, сопровождающиеся сенсорными симптомами (зуд, боль); повреждают периферические сенсорные нервные волокна и кожные нервные окончания; препятствуют высвобождению нейромедиаторов, что может изменить местные механизмы иммунного контроля. По этой причине инфицированные герпесом участки могут стать предпочтительным местом для последующего возникновения кожных заболеваний (инфекций, опухолей и дисиммунных реакций). В некоторых случаях происходит противоположность ИРВ: диффузные дерматозы или высыпания не поражают участки,

ранее инфицированные герпесом (постгерпетическая изотопическая нечувствительность Вольфа) [28].

В 2009 г. Руссо V. и соавторами проведены экспериментальные исследования с применением пластыря у семи пациентов, sensibilizированных к никелю и перенесших в последние годы опоясывающий лишай. Исследования выполняли симметрично на пораженных дерматомах и на непораженных контрлатеральных дерматомах. Получены неодинаковые иммунные реакции. Иммунный ответ дерматома, пораженного в прошлом опоясывающим герпесом, отличался от реакции такового соответствующего контрлатерального дерматома. Это подтверждает существование иммунной дисрегуляции в участках кожи, инфицированных герпесом [4, 29]. После этих вирусных инфекций наиболее часто встречаются такие вторичные кожные заболевания, как кольцевидная гранулема, саркоидоз (гранулематозная реакция) [30, 31]. Затем следуют злокачественные новообразования, лейкоэмические инфильтраты, дисиммунные реакции, инфекции (бактериальные, вирусные), микозы. Клинически кожные высыпания имеют различные формы (эозинофильный дерматит [32], лихеноидные дерматозы [33, 34], склерозирующий лишай [5], келоиды [35], псориаз [36], буллезный пемфигоид [37], микроспория [38]), которые также проявляются как изотопические реакции.

Патогенез ИРВ после опоясывающего герпеса остается неясным; потенциальные механизмы включают вирус-индуцированные, сосудистые или иммунологические нарушения, а также нейроцентрическую гипотезу (которая, возможно, является наиболее широко принятой). Инфекция ВВО вызывает изменения антигенности кератиноцитов, которые могут служить мишенями для донорских эффекторных клеток [29]. Согласно другим гипотезам, вирусная инфекция способна увеличивать экспрессию антигенов лейкоцитов человека (HLA)-II и молекул адгезии на кератиноцитах или антитела против вирусных антигенов могут перекрестно реагировать с молекулами HLA хозяина [29]. Вирус ветряной оспы может изменять нормальный иммунный ответ хозяина, а именно: соотношение CD4+/CD8 +Т-лимфоцитов, активность цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных клеток-киллеров [29].

Плотность эпидермальных нервных окончаний снижена на участках, ранее инфицированных ВВО, по сравнению с нормальной кожей. Повреждение нервов вызывает высвобождение нейропептидов, что приводит к иммунной дисфункции и изменяет иммунный контроль в пораженном дерматоме. Нейроиммунная дестабилизация в инфицированном ВВО месте может быть опосредована постоянным воздействием вирусной ДНК [39].

Резидентные Т-клетки памяти CD8+ могут участвовать в патогенезе развития лихеноидных ре-

акций при постгерпетических поражениях ИРВ [40]. Реакция трансплантата против хозяина (РТПХ) является частым осложнением аллогенной трансплантации костного мозга и гемопоэтических клеток, но она редко проявляется как изотопическая реакция Вольфа [29]. Ху W. и соавторы сообщили о пациенте, у которого развилась хроническая лихеноидная реакция, подобная РТПХ, в области дерматомов, ранее пораженных инфекцией вируса ветряной оспы. Спустя 19 месяцев у пациента произошла реактивация РТПХ в месте инъекции вакцины от гриппа. Хроническая РТПХ, вызванная ИРВ после инфекции herpes zoster, которая проявляется в виде лихеноидо-подобных высыпаний, может свидетельствовать, что CD8+ Т-лимфоциты в основном повышаются после ВВО-инфекции. Таким образом, соотношение CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов может быть связано с типом поражения кожи, однако конкретные механизмы требуют дальнейшего изучения [29].

Изотопическую реакцию Вольфа следует дифференцировать с обострением опоясывающего лишая. При появлении эритематозных высыпаний, папул и пузырьков необходимо проводить дифференциальный диагноз с персистирующим опоясывающим герпесом (определение ВВО-IgM, IgG в сыворотке крови, полимеразная цепная реакция (ПЦР) материала из очага поражения для выявления ВВО).

Wolf R. с коллегами описали феномен «изотопической неотзывчивости», который характеризует отсутствие высыпаний на месте другого, не связанного с ним и уже зажившего кожного заболевания. Термин «отсутствие изотопической реакции» известен как постгерпетическое отсутствие изотопической реакции Вольфа, которое определяется как отсутствие высыпаний (дисиммунных реакций, распространения опухолей) на месте другого, не связанного с ними и уже зажившего дерматоза (вируса ветряной оспы/вируса простого герпеса). Большое количество доказательств свидетельствует о том, что кожа, нервная система и иммунитет тесно связаны между собой цитокинами и нейропептидами (нейроиммунокутанная система) [41]. В 2010 г. Тенеа D. описала отсутствие поражения в зоне вируса опоясывающего герпеса при синдроме Стивенса-Джонсона, вызванном карбамазепином, и предположила, что вирус увеличивает цитокиновый профиль Th1 с гиперэкспрессией фактора некроза опухоли- $\alpha$ , интерферона- $\gamma$ , интерлейкина-2 и ограничивает презентацию вирусных пептидов основным комплексом гистосовместимости класса I, II [42]. Большинство

авторов считают, что отсутствие реакции обусловлено уменьшением количества клеток Лангерганса и дисрегуляцией иммунного ответа (из-за меньшей презентации антигена) [41]. Каким образом уменьшенное количество дермальных клеток Лангерганса и денервация ответственны за отсутствие реакции на ранее зажившем участке опоясывающего герпеса, подлежит дальнейшему изучению.

В зарубежной медицинской литературе часто описывают изотопическую реакцию Вольфа, однако в отечественных публикациях имеется только единичное упоминание об этом феномене [1, 2]. Отечественные дерматологи не выделяют ИРВ. Многие авторы рассматривали опоясывающий лишай, вызывающий зостериформный псориаз или красный плоский лишай, как феномен Кёбнера [2, 42], так как во всем мире до 1995 г. развитие псориаза в дерматоме излеченного опоясывающего герпеса считали феноменом Кёбнера. В настоящее время некоторые дерматологи не согласны с выделением ИРВ [2, 28]. Термин «изотопический ответ» введен Wolf R. для описания появления нового кожного заболевания на месте другого, не связанного и уже излеченного дерматоза, появляющегося «на внешне непораженной и здоровой коже». Первоначально этот термин в основном относился к опоясывающему герпесу. Впоследствии стали использовать термин «изотопический ответ» для описания появления высыпаний после других триггерных факторов. Так называемую «видимо здоровую кожу» на месте бывшего опоясывающего лишая, разрешившегося кожного лейшманиоза или после многоформной эритемы нельзя рассматривать как примеры «непораженной и здоровой кожи». Нет четкого критерия, отличающего ИРВ от феномена Кёбнера [28]. Предыдущий опоясывающий лишай нельзя считать «уже зажившим заболеванием», потому что этот дерматом является «иммуноослабленным участком кожи» [43] или «locus minoris resistentiae». Таким образом не существует четкого критерия, позволяющего отличить изотопический ответ от реакции Кёбнера [28]. Можно ли считать самостоятельным феноменом изотопический ответ Вольфа или его следует рассматривать как категорию реакции Кёбнера, не является столь принципиальным вопросом. Куда важнее правильно понимать и находить объяснение тому, что происходит с нашими пациентами [1]. Дальнейшие научные исследования позволят ответить на вопрос – является ли ИРВ исторической ошибкой или это самостоятельный феномен?

## ЛИТЕРАТУРА

1. Боровиков Ю.Е., Букин Ю.К. Изотопический ответ Вольфа. Вестн. дерматол венерол. 2012; 88 (3): 71-76. [Borovikov Y.E., Bukin Y.K. Wolf's isotopic response. Vestnik dermatologii i venerologii. 2012; 88 (3):71-76. (In Russ)]. doi.org/10.25208/vdv687
2. Kluger N. Phénomènes de Köbner, Renbök, Wolf et Cie. . . est-il temps de simplifier? Annales de Dermatologie et de Vénérologie 2018; 145(5). doi.org/10.1016/j.annder.2018.02.006

3. Lipschütz B. Présentation d'un cas de lésions syphilitiques localisées sur un tatouage. Verhandlungen der Wiener dermatologischen Gesellschaft, 22 November 1905. Arch. Dermatol. Syphilis (Wien). 1906; 78: 381.
4. Ruocco V., Brunetti G., Pusa R.V., Ruocco E. The immunocompromised district: a unifying concept for lymphoedematous, herpes-infected and otherwise damaged sites. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2009; 23 (12): 1364-73. doi: 10.1111/j.1468-3083.2009.03345.x
5. Адашкевич В.П. Специфические клинические симптомы и феномены в дерматологии. Дерматология 2014; 1: 52-8. [Adaskevich V.P. Specific clinical symptoms and phenomena in dermatology. Dermatology 2014; 1: 52-8. (In Russ)].
6. Дворянкова Е.В., Балабекова Ф.Г., Дениева М.И., Корсунская И.М. Новое о феномене Кебнера. Лекции для врачей. 2017; 20-21. [Dvoryankova E.V., Balabekova F.G., Denieva M.I., Korsunskaya I.M. New information about the Kebner phenomenon. Lectures for doctors. 2017; 20-21. (In Russ)].
7. Boyd A.S., Neldner K.H. The isomorphic response of Koebner. Int. J. Dermatol. 1990; 9 (6): 401-10. doi: 10.1111/j.1365-4362.1990.tb03821.x
8. Карнов В.В., Исламов В.Г., Елистратова И.В. О феномене и болезни Кебнера. Клиническая дерматология и венерология. 2010; 8 (6): 125-130. [Karpov V.V., Islamov V.G., Elistratova I.V. About the Koebner phenomenon and disease. Russian Journal of Clinical Dermatology and Venereology. 2010;8 (6): 125 - 130. (In Russ.)].
9. Шорикова А.И., Сорокина К.Н., Шубина А.С. Феномен Кебнера при псориазическом поражении кожи, индуцированный тату. Статья в сборнике трудов VI Международной (76 Всероссийской) научно-практ. конференции «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения». Екатеринбург: УГМУ, 2021; 1: 1147-1150. [Shorikova A.I., Sorokina K.N., Shubina A.S. Koebner's phenomenon in psoriatic skin lesions, induced by tattoo. The article is in the proceedings of the VI International (76th All-Russian) scientific and practical conference "Topical issues of modern medical science and healthcare". Yekaterinburg: UMMC, 2021; 1: 1147-1150. (In Russ)].
10. Khurram H., Al Ghamdi K.M., Bedaiwi K.M., Al Balahi N.M. Multivariate analysis of factors associated with the Koebner phenomenon in vitiligo: an observational study of 381 patients. Annals of dermatology. 2017; 29 (3): 302-306. doi: 10.5021/ad.2017.29.3.302
11. Тальникова Е.Е., Шерстнева В.Н., Утц С.Р. Феномен изоморфной провоцирующей реакции при ограниченной склеродермии. Саратовский научно-медицинский журнал. 2015; 11 (3): 454-457. [Talnikova E.E., Sherstneva V.N., Utz S.R. Phenomenon of isomorphic provoking responses in cases of limited scleroderma (review). Saratov Journal of Medical Scientific Research 2015; 11 (3): 454-457. (In Russ)].
12. Yu R.X., Hui Y. and Li C.R. Koebner phenomenon induced by cupping therapy in a psoriasis patient. Dermatol. Online J. 2013; 19 (6): 18575. PMID: 24011324
13. Khanna D., Singal A. and Gupta R. Onset of psoriasis triggered by Mantoux test. Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol. 2014; 80 (5):451-454. doi: 10.4103/0378-6323.140309
14. Моррисон А.В., Епифанова А.Ю., Иванов С.Д., Кауц Э.А. Феномен изоморфной реакции у пациента, страдающего красным плоским лишаем (клинический случай). Саратовский научно-медицинский журнал. 2020; 16 (3): 859-861. [Morrison A.V., Epifanova A.Yu., Ivanov S.D., Kauts E.A. Phenomenon of isomorphic reaction in a patient suffering from lichen ruber planus (a clinical case). Saratov Journal of Medical Scientific Research 2020; 16 (3): 859-861. (In Russ)].
15. Malakou L.S., Gargalionis A.N., Piperi C., et al. Molecular mechanisms of mechanotransduction in psoriasis. Ann. Transl. Med. 2018; 6 (12): 245. doi: 10.21037/atm.2018.04.09
16. Raychaudhuri S.P., Jiang W.Y., Raychaudhuri S.K. Revisiting the Koebner phenomenon: role of NGF and its receptor system in the pathogenesis of psoriasis. Am. J. Pathol. 2008; 172 (4): 961-71. doi: 10.2353/ajpath.2008.070710
17. Yong-Zhi Ji, Shi-Rui Liu. Koebner phenomenon leading to the formation of new psoriatic lesions: evidences and mechanisms. Biosci. Rep. 2019; 39 (12): BSR20193266. doi: 10.1042/BSR20193266
18. Eyre R.W., Krueger G.G. Response to injury of skin involved and uninvolved with psoriasis, and its relation to disease activity: Koebner and 'reverse' Koebner reactions. Br. J. Dermatol. 1982; 106 (2): 153-9. doi: 10.1111/j.1365-2133.1982.tb00924.x
19. Naveen K.N., Pai V.V., Athanikar S.B., et al. Remote reverse Koebner phenomenon in generalized granuloma annulare. Indian Dermatol Online J 2014; 5 (2): 219-221. doi: 10.4103/2229-5178.131137
20. Malakar S., Dhar S. Spontaneous repigmentation of vitiligo patches distant from the autologous skin graft sites: a remote reverse Koebner's phenomenon? Dermatology. 1998; 197 (3): 274. doi: 10.1159/000018013
21. Kannangara A.P., Yosipovitch G., Fleischer A.B. Jr. Proposed classification for Koebner, Wolf isotopic, Renbok, Koebner nonreaction, isotopic nonreaction and other related phenomen. Dermatol. Online J. 2014; 20 (11):13030/qt96s656b. PMID: 25419762
22. Bernhard J.D., Haynes H.A. Nonrashes. Part I: The Koebner nonreaction. Cutis. 1982; 29 (2): 158-64. PMID: 6460595
23. Chen C.A., Mikailov A., Faulkner-Jones B., Wu P.A. Leukocytoclastic vasculitis sparing a tattoo with halo effect. JAAD Case Rep. 2015; 1 (5): 269-71. doi: 10.1016/j.jcdr.2015.06.002

24. *Dańczak-Pazdrowska A., Pawlaczyk-Gabriel K., Bowszyc-Dmochowska M., et al.* Reverse Kóbnér response in lichen striatus: the first case described in the literature. *Advances in Dermatology and Allergology*. 2018; 35 (4): 434-435. doi.org/10.5114/ada.2018.75840
25. *Корешкова К.М., Хисматуллина З.Р.* Роль травматического фактора и изоморфной реакции в ранней диагностике псориазического артрита. *Альманах клинической медицины*. 2022; 50 (7): 420-427. [Koreschkova K.M., Khismatullina Z.R. The role of the traumatic factor and isomorphic reaction in the early diagnosis of psoriatic arthritis. *Almanac of Clinical Medicine*. 2022; 50 (7): 420-427. (In Russ)]. doi: 10.18786/2072-0505-2022-50-030
26. *Ahad T., Agius E.* The Koebner phenomenon. *British Journal of Hospital Medicine*. 2015; 76 (11): 170-2. doi: 10.12968/hmed.2015.76.11.C170
27. *Kluger N.* Tattooing and psoriasis: demographics, motivations and attitudes, complications, and impact on body image in a series of 90 Finnish patients. *Acta Dermatovenereol. Alp. Pannonica Adriat.* 2017; 26 (2): 29-32. doi: 10.15570/actaapa.2017.9
28. *Happle R., Kluger N.* Koebner's sheep in Wolf's clothing: does the isotopic response exist as a distinct phenomenon? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2018; 32 (4): 542-543. doi: 10.1111/jdv.14664
29. *Xu W., Yu C., Le Y., Zhang J.* Wolf's isotopic response after herpes zoster infection in chronic lichen sclerosus-like graft versus host disease: case report and literature review. *Clin. Cosmet. Investig Dermatol.* 2022; 15: 2153-2157. doi: 10.2147/CCID.S387014
30. *Melgar E., Henry J., Valois A., et al.* Granulome de Lever extra-facial sur cicatrice de zona: une réaction isotopique de Wolf. *Ann. Dermatol. Venereol.* 2018; 145 (5): 354-358. doi.org/10.1016/j.annder.2018.02.013
31. *Yoon J.H., Jang Y.J., Park E.J., et al.* A Case of herpes zoster granulomatous dermatitis: report of Wolf's isotopic response. *Ann. Dermatol.* 2021; 33 (2): 186-189. doi: 10.5021/ad.2021.33.2.186
32. *Yang Y., Wang T.* Wolf's isotopic response of eosinophilic dermatitis after herpes zoster infection: case reports and literature review. *Clin. Cosmet. Investig Dermatol.* 2022; 15:211-216. doi: 10.2147/CCID.S343496
33. *Tziotzios C., Lee J.Y.W., Brier T., et al.* Lichen planus and lichenoid dermatoses: clinical overview and molecular basis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2018; 79: 789-804. doi:10.1016/j.jaad.2018.02.010
34. *Glinos G., Hooper M., Morey G.E. & Seminario-Vidal L.* Zosteriform lichen planus as a manifestation of Wolf's isotopic response. *SKIN The Journal of Cutaneous Medicine*. 2021; 5 (5): 546-550. doi.org/10.25251/skin.5.5.15
35. *Wang J., Shen H.* Keloids after herpes zoster: report of Wolf's isotopic phenomenon and literature review. *Clin. Cosmet. Investig Dermatol.* 2023; 16: 2129-2133. doi: 10.2147/CCID.S421534
36. *Neema S., Das A., Singh N.S.* Psoriasis over healed herpes zoster: Wolf's isotopic response. *Indian J. Dermatol.* 2017; 62 (5): 542-544. doi: 10.4103/ij.d.IJD\_661\_16
37. *Gurel M.S., Savas S., Bilgin F., et al.* Zosteriform pemphigoid after zoster: Wolf's isotopic response. *Int. Wound J.* 2016; 13 (1): 141-2. doi: 10.1111/iwj.12423
38. *Suzuki R., Numata T., Hiruma J., et al.* Wolf's isotopic response after tinea corporis caused by *Microsporum canis*. *J. Dermatol.* 2023; 50 (5):e159-e161. doi: 10.1111/1346-8138.16685
39. *Wang T., Zhang M., Zhang Y., et al.* Wolf's isotopic response after herpes zoster infection: a study of 24 new cases and literature review. *Acta Derm. Venereol.* 2019; 99: 953-959. doi:10.2340/00015555-3269
40. *Ise M., Tanese K., Adachi T., et al.* Postherpetic Wolf's isotopic response: possible contribution of resident memory T cells to the pathogenesis of lichenoid reaction. *Br. J. Dermatol.* 2015; 173: 1331-1334. doi:10.1111/bjd.13968
41. *Sinha S., Verma G., Sharma P.K., Ahuja A.* Wolf's isotopic nonresponse in healed herpes zoster in erythroderma. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2018; 84 (2): 217-220. doi: 10.4103/ij.dvl.IJDVL\_1170\_16
42. *Tenea D.* Carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome sparing the skin previously affected by herpes zoster infection in a patient with systemic lupus erythematosus: A reverse isotopic phenomenon. *Case Rep. Dermatol.* 2010; 2 (2): 140-145. doi: 10.1159/000319628
43. *Sagi L., Trau H.* The Koebner phenomenon. *Clin. Dermatol.* 2011; 29 (2): 231-6. doi: 10.1016/j.clindermatol.2010.09.014
44. *Ruocco V., Ruocco E, Piccolo V et al.* The immunocompromised district in dermatology: A unifying pathogenic view of the regional immune dysregulation. *Clin. Dermatol.* 2014; 32 (5): 569-76. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.04.004

Поступила в редакцию журнала 02.08.24

Принята к печати 25.09.24





*Для цитирования:* Фролова Е.В., Шадривова О.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Богомолова Т.С., Игнатъева С.М., Соловьева Г.И., Секретарева О.В., Десятик Е.А., Хостелиди С.Н., Борзова Ю.В., Тараскина А.Е., Васильева Н.В. Особенности экспрессии ингибиторных рецепторов на Т-лимфоцитах у онкогематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом легких, получающих полихимиотерапию. Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (3): 24-38. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-24-38

*For citation:* Frolova E.V., Shadrivova O.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Bogomolova T.S., Ignatieva S.M., Solovyova G.I., Sekretareva O.V., Desyatik E.A., Khostelidi S.N., Borzova Yu.V., Taraskina A.E., Vasilyeva N.V. Features of expression of inhibitory receptors on T-lymphocytes in oncohematological patients with invasive pulmonary aspergillosis receiving polychemotherapy. Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (3):24-38. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-24-38

## **ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ИНГИБИТОРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА Т-ЛИМФОЦИТАХ У ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ С ИНВАЗИВНЫМ АСПЕРГИЛЛЕЗОМ ЛЕГКИХ, ПОЛУЧАЮЩИХ ПОЛИХИМИОТЕРАПИЮ**

**Фролова Е.В. (зав. лаб.)\*, Шадривова О.В. (доцент), Учеваткина А.Е. (с.н.с.), Филиппова Л.В. (с.н.с., доцент), Богомолова Т.С. (зав. лаб.), Игнатъева С.М. (в.н.с.), Соловьева Г.И. (в.н.с.), Секретарева О.В. (н.с.), Десятик Е.А. (врач-миколог), Хостелиди С.Н. (доцент), Борзова Ю.В. (зав. клиникой, доцент), Тараскина А.Е. (зав. лаб.), Васильева Н.В. (директор НИИ, зав. кафедрой)**

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

*Инвазивный аспергиллез (ИА) – жизнеугрожающее инфекционное осложнение у онкогематологических пациентов, получающих полихимиотерапию. Считается, что нарушение иммунной защиты способствует неблагоприятному течению грибковой инфекции. В связи с этим существует потребность в разработке стратегий восстановления иммунитета для усиления эффективности стандартной антимикотической терапии.*

*Целью исследования была оценка количества Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные рецепторы Tim-3 и Lag-3, у онкогематологических больных в зависимости от этиологии инфекционного процесса и исхода заболевания. В исследование включили 30 пациентов, из которых у 10 был установлен диагноз «вероятный» ИА, у 20 – «возможный» ИА, и 30 человек, у которых ИА был исключен в*

*ходе обследования. Контрольная группа состояла из 25 практически здоровых лиц. Период наблюдения – 6 месяцев. Диагноз ИА устанавливали в соответствии с критериями EORTC/MSG (2020). Субпопуляционный состав лимфоцитов крови определяли методом проточной цитометрии. Среди CD4<sup>+</sup>Т-хелперов и CD8<sup>+</sup>Т-цитотоксических лимфоцитов выделяли «наивные» клетки (Naïve), клетки центральной памяти (СМ), эффектор-ной памяти (ЕМ) и терминально-дифференцированные (TEMRA). В свою очередь на каждой из этих субпопуляций оценивали экспрессию ингибиторных рецепторов Tim-3 и LAG-3. Количество Tim-3 положительных клеток в субпопуляции CD4<sup>+</sup>Т-клеток и цитотоксических CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов у пациентов с ИА достоверно превышало показатели условно здоровых лиц. Отличием больных ИА от пациентов без грибковой инфекции было значимо более высокое число CD8<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>Т-клеток. При оценке CD4<sup>+</sup>Lag-3<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Lag-3<sup>+</sup>Т-клеток выявили возрастание их доли в периферической крови у всех онкогематологических больных по сравнению с контрольными значениями, но достоверных различий получено не было. Относительное число Naïve, ЕМ и TEMRA с ингибирующими рецепторами TIM-3<sup>+</sup> среди CD4<sup>+</sup>Т-клеток и CD8<sup>+</sup>Т-клеток было значимо выше у всех онкогематологических пациентов по отношению к показателям контрольной группы. Отличием у больных ИА было более высокое число ЕМ CD4<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>Т-клеток и ЕМ и TEMRA CD8<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>Т-клеток относительно показателей группы сравнения. Установлено, что у пациентов с благоприятным течением ИА после завершения антимикотической терапии значимо снизилось число CD4<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>Т-клеток и CD8<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>Т-клеток, чего не наблюдали у лиц с неблагоприятным исходом грибковой инфекции.*

*В совокупности полученные результаты указывают на сходный профиль дифференцировки Т-лимфоцитов, экспрессирующих ингибиторные рецепторы, у онкогематологических больных на фоне развития инфекционного процесса. Особенностью пациентов с ИА были более выраженные признаки истощения эффекторных и терминально-дифференцированных Т-клеток памяти, что может быть связано с высокими показателями смертности в этой группе лиц. Результаты этого исследования станут основой для дальнейшего анализа Т-клеток с ингибиторными рецепторами и их потенциальной роли в иммунотерапии грибковых инфекций.*

**Ключевые слова:** инвазивный аспергиллез легких, онкогематологические пациенты, Т-клетки, ингибиторные рецепторы Tim-3, Lag-3

\* Контактное лицо: Фролова Екатерина Васильевна, e-mail: ekaterina.frolova@szgmu.ru

## FEATURES OF EXPRESSION OF INHIBITORY RECEPTORS ON T-LYMPHOCYTES IN ONCOHEMATOLOGICAL PATIENTS WITH INVASIVE PULMONARY ASPERGILLOSIS RECEIVING POLYCHEMOTHERAPY

**Frolova E.V. (head of the laboratory), Shadrivova O.V. (associate professor), Uchevatkina A.E. (senior scientific researcher), Filippova L.V. (senior scientific researcher, associate professor), Bogomolova T.S. (head of the laboratory), Ignatieva S.M. (leading scientific researcher), Solovyova G.I. (leading scientific researcher), Sekretareva O.V. (scientific researcher), Desyatik E.A. (mycologist), Khostelidi S.N. (associate professor), Borzova Yu.V. (head of the clinic, associate professor), Taraskina A.E. (head of the laboratory), Vasilyeva N.V. (director of the Institute, head of the department)**

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Kashkin Research Institute of Medical Mycology; Department of Medical Microbiology; Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology), St. Petersburg, Russia

*Invasive aspergillosis (IA) is a life-threatening infectious complication in oncohematological patients receiving polychemotherapy. It is believed that impaired immune defense contributes to the unfavorable course of fungal infection. In this regard, there is a need to develop strategies for restoring immunity to enhance the effectiveness of standard antifungal therapy. The aim of the study was to assess the number of T cells expressing inhibitory receptors Tim-3 and Lag-3 in oncohematological patients depending on the etiology of the infectious process and the outcome of the disease. The study included 30 patients, of whom 10 were diagnosed with "probable", 20 with "possible" IA and 30 patients in whom IA was excluded during the examination. The control group consisted of 25 practically healthy individuals. The observation period was 6 months. The diagnosis of IA was established in accordance with the EORTC/MSG criteria (2020). The subpopulation composition of blood lymphocytes was determined by flow cytometry. Among CD4<sup>+</sup> T-helpers and CD8<sup>+</sup> T-cytotoxic lymphocytes, "naive" cells (Naïve), central memory (CM), effector memory (EM) and terminally differentiated (TEMRA) cells were distinguished. In turn, the expression of inhibitory receptors Tim-3 and LAG-3 was assessed on each of these subpopulations. The number of Tim-3 positive cells in the subpopulation of CD4<sup>+</sup> T cells and cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with IA significantly exceeded the values in*

*conditionally healthy individuals. The difference between patients with IA and patients without fungal infection was a significantly higher number of CD8<sup>+</sup> Tim-3<sup>+</sup> T cells. Evaluation of CD4<sup>+</sup> Lag-3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Lag-3<sup>+</sup> T cells revealed an increase in the proportion of these cells in the peripheral blood of all oncohematological patients compared with the control values, but no reliable differences were obtained. The relative number of Naive, EM and TEMRA with inhibitory receptors TIM-3<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells was significantly higher in all oncohematological patients in relation to the control group. The difference between patients with IA was a higher number of EM CD4<sup>+</sup> Tim-3<sup>+</sup> T cells and EM and TEMRA CD8<sup>+</sup> Tim-3<sup>+</sup> T cells in relation to the indicators of the comparison group. It was found that in patients with a favorable course of IA after the completion of antifungal therapy, the number of CD4<sup>+</sup> Tim-3<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> Tim-3<sup>+</sup> T cells significantly decreased, which was not observed in patients with an unfavorable outcome of fungal infection.*

*Taken together, obtained results indicate a similar differentiation profile of T lymphocytes expressing inhibitory receptors in oncohematological patients against the background of the infectious process. A feature of patients with IA was more pronounced signs of depletion of effector and terminally differentiated memory T cells, which may be associated with high mortality rates in this group of patients. The results of this study will form the basis for further analysis of T cells with inhibitory receptors and their potential role in immunotherapy of fungal infections.*

**Key words.** invasive pulmonary aspergillosis, oncohematological patients, T cells, inhibitory receptors Tim-3, Lag-3

## ВВЕДЕНИЕ

Инвазивный аспергиллез (ИА) является наиболее распространенной инвазивной плесневой инфекцией [1]. Известно, что *Aspergillus* spp. поражают в основном пациентов с ослабленным иммунитетом на фоне гематологических, аутоиммунных и онкологических заболеваний, а также реципиентов трансплантатов солидных органов или лиц в критическом состоянии, включая тяжелое течение респираторных вирусных инфекций [2, 3]. Ежегодно более 2 млн. человек страдают ИА, при этом общая годовая смертность может достигать 85,2% [4]. В недавно опубликованном Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) перечне приоритетных грибковых патогенов указано, что инвазивные микозы представляют глобальную проблему общественного здравоохранения, а *Aspergillus fumigatus* включен в группу критически важных возбудителей, требующих первоочередного внимания [5]. В настоящее время для лечения ИА используют три класса противогрибковых препаратов, а именно: азолы (вориконазол, позаконазол, изавуконазол), полиены (липосомальный амфотерицин-В (LAmB), липидный комплекс амфотерицина-В) и эхинокандины (каспофунгин, анидулафунгин, микафунгин) [6]. Однако остается проблематичным выбор индивидуализированной стратегии терапии ввиду различий пациентов по

продолжительности воздействия факторов риска, гетерогенности фоновых заболеваний и степени иммуносупрессии [7]. Кроме того, в последнее время появляется все больше публикаций о росте количества штаммов *Aspergillus* spp., устойчивых к азолам [8, 9]. В частности, по данным многоцентрового исследования, проведенного в Японии, 12,7% изученных изолятов *A. fumigatus* являются азол-резистентными [10]. Возникновение резистентности к азолам, межлекарственные взаимодействия и токсичность вносят существенные ограничения при лечении инвазивных микозов [11, 12].

Тот факт, что смертность от инвазивных грибковых инфекций остается неприемлемо высокой, несмотря на использование противогрибковых препаратов, означает, что нарушение иммунной защиты способствует неблагоприятному течению грибковой инфекции [13, 14]. Таким образом, разработка стратегий восстановления иммунных функций остается важной задачей в терапии инвазивных микозов [15, 16]. Известно, что грибы рода *Aspergillus*, попадая в дыхательные пути, первоначально контактируют с клетками врожденного иммунного ответа, представленного макрофагами, нейтрофилами, естественными киллерами и дендритными клетками (ДК) [13, 14]. В норме ДК презентуют антиген наивным Т-лимфоцитам, инициируют дифференцировку Т-хелперов (Th) 1 типа и Th17, обеспечивающих усиление активности фагоцитирующих клеток и естественных киллеров, тем самым формируя защитный иммунный ответ. Установлено, что цитотоксические Т-лимфоциты совместно с естественными киллерами препятствуют прорастанию конидий *A. fumigatus* в легких. Однако длительное присутствие микромицетов в дыхательных путях на фоне иммуносупрессии обуславливает чрезмерную активацию Th2 и регуляторных Т-клеток (Treg), нарушение микробицидной активности фагоцитов, ингибирование Th1/Th17, что приводит к прогрессированию заболевания [17]. Таким образом, поскольку клетки адаптивного иммунного ответа играют решающую роль в защите от грибкового патогена, в последнее время интенсивно разрабатывалась клеточная иммунная терапия для восстановления и усиления противогрибкового иммунитета, включая адаптивный перенос антиген-стимулированных Т-клеток и введение Т-клеток с химерными антигенными рецепторами (CAR) [18, 19]. Однако клеточная иммунная терапия является дорогостоящей, трудоемкой, логистически сложной, и ее использование связано со значительными нормативными препятствиями [16]. Трудности для клинического применения клеточной иммунной терапии возобновили интерес к стратегиям усиления адаптивного иммунитета посредством фармакологической блокады чек-пойнт молекул – иммунных контрольных точек (ИКТ), что успешно используется при лечении онкологических заболеваний [20] и

изучается у пациентов с различными инфекционными заболеваниями [21, 22], в том числе у больных инвазивными микозами [23].

Известно, что активация Т-лимфоцитов антиген-презентирующими клетками строго контролируется балансом стимулирующих и ингибирующих сигнальных молекул. К категории сигнальных молекул относятся ингибиторные рецепторы и их лиганды, объединенные термином «ингибиторные чек-пойнт молекулы», которые опосредуют различные иммуносупрессорные механизмы и играют важную роль в ограничении иммунного ответа и формировании толерантности к аутоантигенам, а также подавляют противоопухолевый и противои инфекционный иммунный ответ [24]. Наиболее изученными ингибиторными рецепторами на Т-клетках являются молекулы CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4, цитотоксический Т-лимфоцит ассоциированный антиген 4), PD-1 (programmed cell death protein-1, белок запрограммированной клеточной гибели-1), TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Т-клеточный иммуноглобулин и муцин-домен-3) и LAG-3 (Ген активации лимфоцитов -3). Запуск сигнальных путей при взаимодействии указанных рецепторов с соответствующими лигандами (CD80/86, PD-L1, Gal-9) приводит как к подавлению функций эффекторных Т-клеток и смещению баланса в сторону Th2, так и к усилению активности Treg. Предполагается, что повышенная экспрессия ингибирующих рецепторов связана с нарушением активности клеток (Т-клеточное «истощение»), которое характеризуется прогрессирующим снижением функциональной активности Т-лимфоцитов при переходе эффекторных Т-клеток в клетки памяти [25]. Эффективность использования блокаторов ИКТ как дополнительного иммунотерапевтического подхода изучена у пациентов с ВИЧ-инфекцией, с вирусными гепатитами В и С, прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатией и бактериальным сепсисом [21, 22]. Однако исследования особенностей экспрессии чек-пойнт молекул на иммунных клетках при взаимодействии с грибковыми патогенами и возможности применения блокаторов ИКТ в лечении инвазивных микозов в комбинации с противогрибковыми средствами немногочисленны [23]. В частности, у пациентов с кандидозным сепсисом выявили коэкспрессию ингибиторных рецепторов PD-1, LAG-3 и TIM-3 на мононуклеарных клетках периферической крови (РВМС). Блокада PD-1 моноклональными антителами *in vitro* усиливала эффекторные ответы Т-хелперов, индуцированные *Candida albicans*, особенно выработку Th1 интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [26]. Секвенирование одноклеточной РНК после стимуляции РВМС здоровых доноров антигенами *C. albicans* подтвердило совместную индукцию оси PD-1, CTLA-4, LAG-3 и других ингибиторных молекул на Th, цитотоксических Т-лимфоцитах

(Tсут) и мононуклеарных фагоцитах [27]. Т-клетки пациентов с активным паракокцидиомикозом характеризовались повышенной экспрессией CTLA-4 и снижением пролиферативной способности в ответ на стимуляцию фитогемагглютинином. Блокада CTLA-4, опосредованная моноклональными антителами, усиливала ответ IFN- $\gamma$  *ex-vivo* РВМС больных паракокцидиомикозом [28].

Немногочисленные данные *in vitro* и экспериментальные исследования на животных также подтверждают роль активации ИКТ при контакте с *A. fumigatus*. Установлено, что  $\alpha$ -(1,3)-глюкан клеточной стенки *A. fumigatus* стимулировал экспрессию PD-L1 на дендритных клетках человека, что в свою очередь способствовало поляризации наивных Т-клеток в сторону Treg при одновременном подавлении активности Th1-ответов. Опосредованная антителами блокада PD-L1 *in vitro* приводила к значительному ингибированию Treg-клеток при одновременном усилении продукции IFN- $\gamma$  Th1. Эти данные позволяют предположить, что  $\alpha$ -(1,3)-глюкан посредством экспрессии PD-L1 на ДК поддерживает баланс между Treg и провоспалительными Th1 [29]. Vu С.Т.В. с соавторами показали, что введение противогрибкового препарата совместно с моноклональными антителами, блокирующими PD-1, экспериментальным животным с постсептическим аспергиллезом, в отличие от монотерапии только амфотерицином В, восстановило активность истощенных ДК и Т-лимфоцитов за счет повышения экспрессии CD86 и продукции IFN- $\gamma$ , а также снижения секреции IL-10, что впоследствии привело к улучшению исхода грибковой инфекции [30]. В другом исследовании проведена оценка эффективности блокады PD-1 на мышинной модели инвазивного легочного аспергиллеза. Обнаружено, что по сравнению с инфицированными контрольными мышами, животные, которым вводили моноклональные антитела против PD-1, показали лучшую выживаемость, повышенное содержание лейкоцитов, провоспалительных цитокинов и хемокинов в легочной ткани и снижение грибковой нагрузки. Комбинированное лечение анти-PD-1 и каспофунгином привело к значительному улучшению выживаемости по сравнению с монотерапией только каспофунгином или анти-PD-1, что указывает на синергический эффект между ингибитором PD-1 и противогрибковым средством [31]. Схожие результаты были получены при использовании блокаторов ИКТ у экспериментальных животных с инвазивным мукормикозом [32]. Также на настоящий момент представлены единичные сведения о полной или частичной эффективности терапии анти-PD-1 в сочетании с IFN- $\gamma$  при мукормикозе [33, 34] и ИА [35] у пациентов, не отвечающих на стандартное противогрибковое лечение. В совокупности эти исследования дают убедительные доказательства того, что существует связь между усиленной экс-

прессией чек-поинт молекул и признаками нарушения противогрибкового иммунитета. Это может свидетельствовать о важности изучения особенностей экспрессии ингибиторных рецепторов на иммунных клетках пациентов с ИА как для прогнозирования течения грибкового заболевания, так и в качестве терапевтических мишеней в медицинской микологии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включили взрослых гематологических больных. Основную группу составили 30 пациентов с ИА, группу сравнения – 30 человек с клиническими и радиологическими признаками поражения легких, у которых ИА был исключен в ходе обследования. Период наблюдения – 6 месяцев. В контрольную группу вошли 25 практически здоровых людей. Для диагностики инвазивного аспергиллеза использовали клинические и лабораторные критерии EORTC/MSG, 2020 (European Confederation of Medical Mycology/Mycoses Study Group) [36]. Все участники подписали добровольное информированное согласие на проведение исследования в соответствии с Хельсинкской декларацией. Пациентам выполняли компьютерную томографию органов грудной клетки (КТ ОГК) в режиме высокого разрешения, фибробронхоскопию с забором бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ). Лабораторная диагностика ИА включала микроскопическое, культуральное и серологическое исследования. Из образцов БАЛ готовили препараты в просветляющей жидкости (10% раствор КОН в 10% водном растворе глицерина) с добавлением флуоресцирующего маркера (калькофлюор белый). Окрашенный препарат просматривали в люминесцентном микроскопе, отмечали наличие септированных нитей мицелия, ветвящихся под углом 45°. Галактоманнан в БАЛ определяли иммуноферментным методом с помощью специфической диагностической тест-системы «PLATELIA® Aspergillus» («БИО–RAD Laboratories», США). Наличие галактоманнана оценивали путем сравнения оптической плотности исследуемого материала и контрольного образца, содержащего 1 нг/мл галактоманнана. Диагностически значимым считали индекс выше «1,0».

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови было выполнено методом цитофлуориметрического анализа на проточном цитометре «Navios™» («Beckman Coulter», США). Подготовку образцов периферической крови и настройку цитометра проводили в соответствии с Национальными рекомендациями [37]. Определяли относительное и абсолютное число Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) с использованием CD45 (PC5/5, клон J33), CD3 (APC, клон UCHT1), CD4 (FITC, клон 13B8.2), CD8 (ECD, клон

SFC121Thy2D3<sup>5,6,22,23</sup>), («Beckman Coulter», США). Вторым этапом цитометрического исследования было определение субпопуляций Т-клеток памяти, а также оценка экспрессии ингибиторных рецепторов Tim-3 и Lag-3 на этих клетках и в общих пулах Т-хелперов (Th) и Т-цитотоксических лимфоцитов (Tcyt). Окраску выполняли антителами против CD3 (APC, клон ОКТ3), CD4 (PE/Сyanine7, клон ОКТ4), CD45RA (PerCP/Сyanine5.5, клон HI100), CD197 (CCR7) (PE/Dazzle 594, клон G043H7), CD366 (Tim-3) (PE, клон F38-2E2) и CD223 (LAG-3) (Alexa Fluor, клон 11C3C65) («Biolegend», США) в режимах лизирования эритроцитов с применением VersaLyse, Fixative Solution IOTest 3 («Beckman Coulter», США) и отмывки фосфатно-солевым буфером («ЭКО сервис», Россия). Субпопуляцию Tcyt определяли по фенотипу CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>, что соответствовало относительному числу CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, полученному при цито-

метрическом анализе общего пула лимфоцитов. Субпопуляция «наивных» (Naive) Т-лимфоцитов обладала фенотипом CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>++</sup>, клетки с фенотипами CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> и CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> соответствовали Т-лимфоцитам центральной и эффекторной памяти, а терминально-дифференцированные Т-лимфоциты определялись как CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>. Для выявления среди Th и Tcyt «наивных» (Th Naive, Tcyt Naive), клеток центральной памяти (Th CM, Tcyt CM) и эффекторной памяти (Th EM, Tcyt EM), а также терминально-дифференцированных (Th TEMRA и Tcyt TEMRA) использовали этапное гейтирование (Рис. 1). Затем каждая из этих субпопуляций была разделена по способности экспрессии Tim-3 и LAG-3.

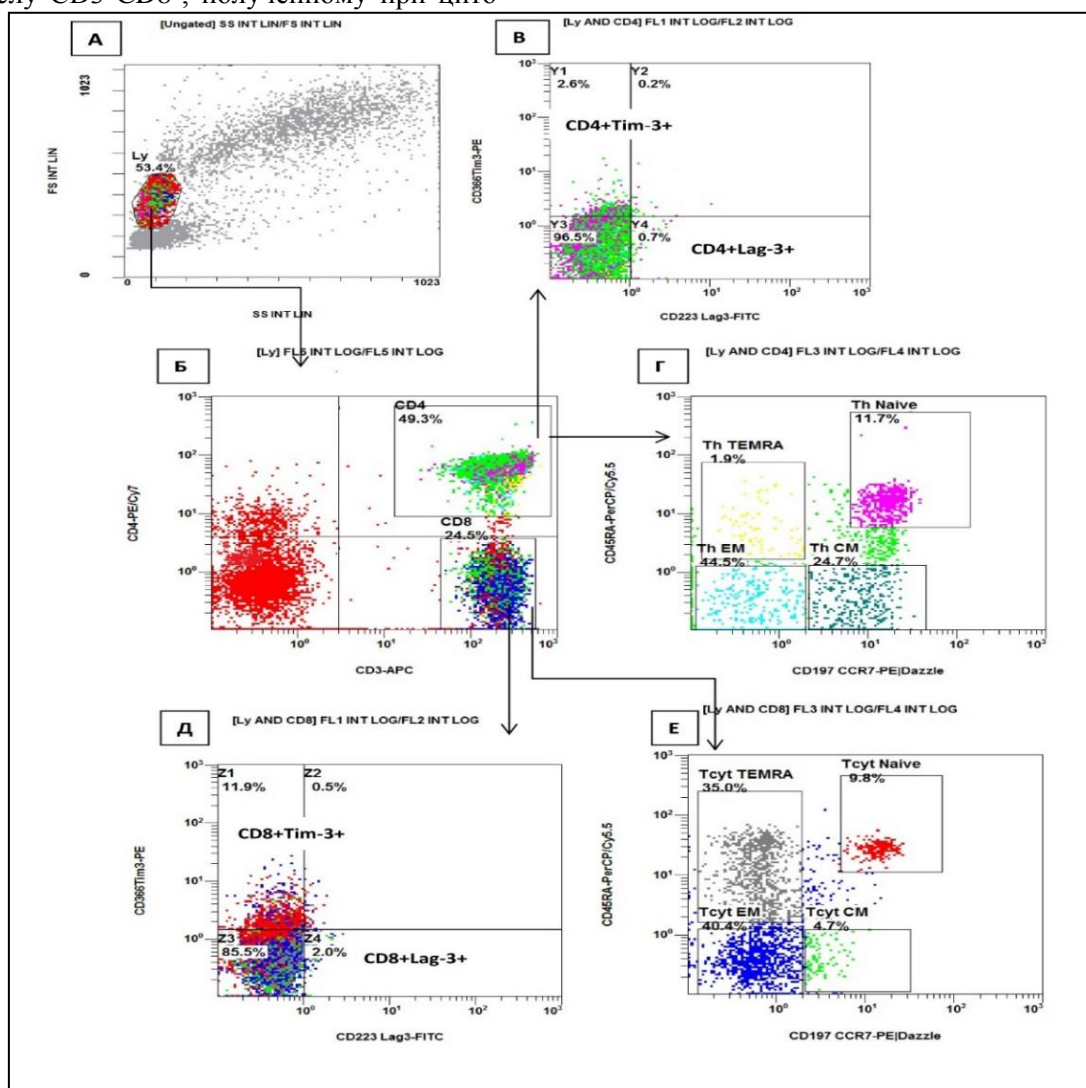


Рис. 1. Основные этапы гейтирования Th (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и Tcyt лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) периферической крови для оценки экспрессии Tim-3 и Lag-3 и выявления среди этих популяций наивных (Naive), клеток центральной памяти (CM), эффекторной памяти (EM) и терминально-дифференцированных (TEMRA) по коэкспрессии CD45RA и CCR7.

Примечание: Гистограмма **А** – выделение общего пула лимфоцитов с помощью прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния; **Б** – разделение Т-лимфоцитов на субпопуляции Th и Tcyt; **В** – экспрессия Tim-3 и Lag-3 на Th; **Г** – относительное Naive, CM, EM и TEMRA среди Th. **Д** – экспрессия Tim-3 и Lag-3 на Tcyt; **Е** – относительное содержание Naive, CM, EM и TEMRA среди Tcyt.

Полученные в процессе исследования данные обрабатывали с помощью программной системы «STATISTICA 13» («StatSoft», США). Нормальность распределения количественных данных проверяли с использованием критерия Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Изучаемые характеристики представляли медианами, нижним и верхним квартилями (Me (Q<sub>0,25</sub>;Q<sub>0,75</sub>)). Для оценки различий между независимыми выборками применяли непараметрический критерий Манна-Уитни, зависимыми выборками – критерий Вилкоксона. Выявление корреляционных взаимосвязей между двумя количественными параметрами осуществляли непараметрическим методом ранговой корреляции по Спирмену с вычислением коэффициента ранговой корреляции (r). Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Основную группу составили 30 пациентов, из которых у 10 установлен диагноз «вероятный» ИА, у 20 – «возможный» ИА (EORTC/MSG, 2020); лиц мужского пола – 14, женского – 16, медиана возраста – 59 лет. В группу сравнения включили 30 больных (15 мужчин и 15 женщин, медиана – 57 лет) с клиническими и радиологическими признаками поражения легких, у которых ИА исключили в ходе обследования. Период наблюдения – от 1 до 6 месяцев. В контрольную группу вошли 25 практически здоровых людей (медиана возраста – 41 год).

Лабораторная диагностика ИА состояла из микологического и серологического исследования. Тест на галактоманнан в БАЛ был положительным у 33% больных ИА. При микроскопии и посеве БАЛ *A. fumigatus* выявили в 16% случаев.

Основными фоновыми онкогематологическими заболеваниями у пациентов всех групп был острый миелоидный лейкоз (59% и 30% соответственно) и лимфомы (19% и 30% соответственно) (табл. 1).

Таблица 1

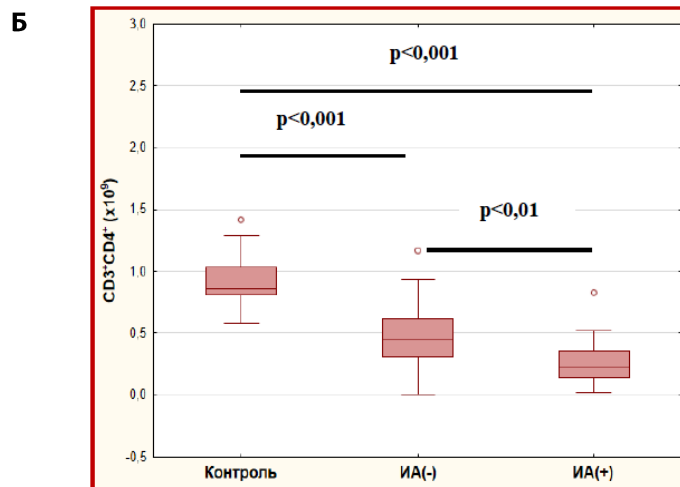
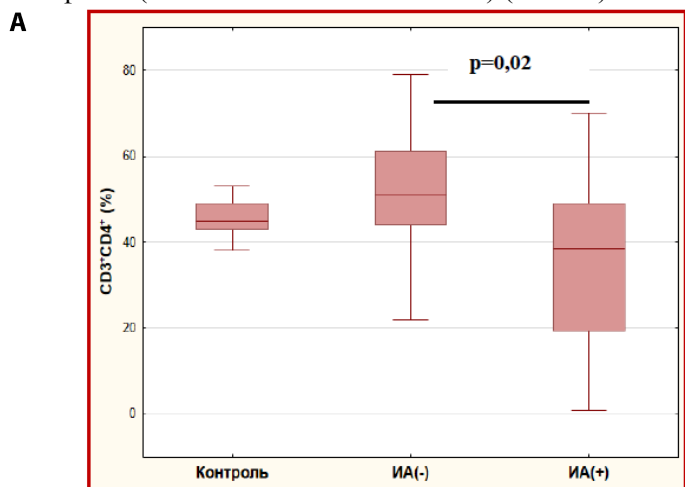
Фоновые заболевания у онкогематологических пациентов

Нозологическая форма	ИА + n=30	ИА - n=30
Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ)	13 (59%)	10 (30%)
Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ)	2 (9,1%)	4 (19%)
Лимфомы	4 (19%)	10 (30%)
Хронический миелолейкоз (ХМЛ)	1 (4,5 %)	3 (10 %)
Множественная миелома (ММ)	1 (4,5 %)	1 (4,5 %)
Другие виды острого лейкоза	1(4,5%)	2 (9 %)

С момента постановки диагноза ИА пациенты получали антимикотическую терапию: вориконазол, каспофунгин, позаконазол, итраконазол, липидные формы амфотерицина В (АмВ) и деоксихолат АмВ. Общая выживаемость в течение 3-х месяцев составила 67%.

Иммунологическое исследование выполнено в течение 4-8 дней после первых признаков инфекционного процесса. Установлено достоверное уменьшение абсолютного числа CD4<sup>+</sup>T-клеток у гематологических больных обеих групп по отношению к показателям контрольной группы. У пациентов с ИА процентное и абсолютное число CD4<sup>+</sup>T-хелперов достоверно отличалось от показателей группы сравнения (p=0,02; p<0,01 соответственно) (Рис. 2 А, Б).

Выявлено усиление дифференцировки Т-лимфоцитов в цитотоксические CD8<sup>+</sup>T-лимфоциты у больных ИА: процентное содержание данной субпопуляции было достоверно выше по отношению к показателям группы контроля (p=0,02) (Рис. 2 В). Абсолютное число цитотоксических CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов было снижено по отношению к показателям условно здоровых лиц в обеих группах пациентов (p<0,01; p<0,01 соответственно) (Рис. 2 Г).



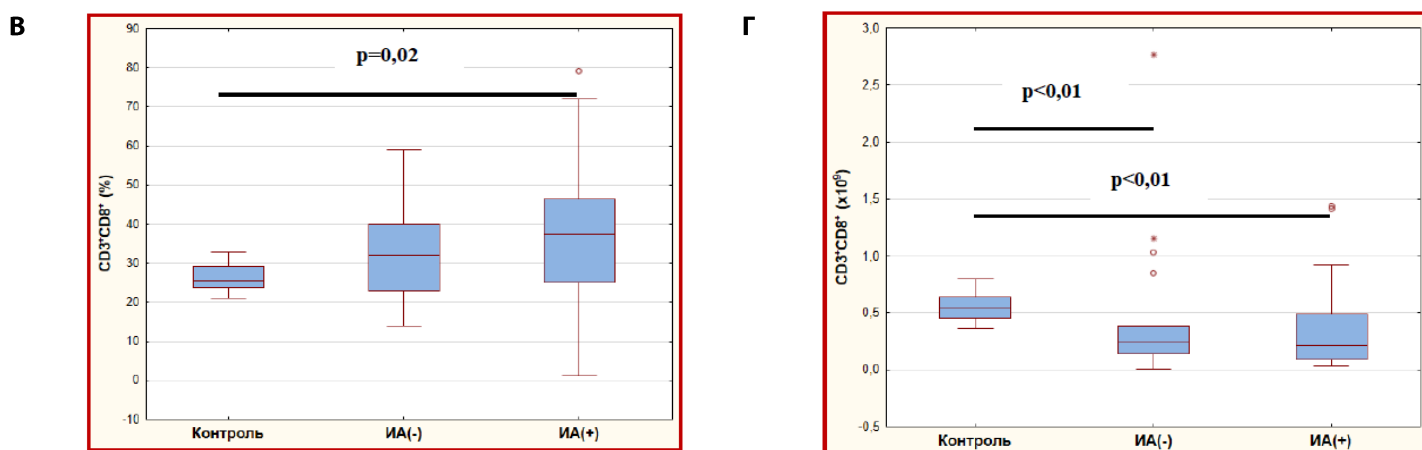


Рис. 2. Содержание Т-хелперов (А, Б) и Т-цитотоксических лимфоцитов (В, Г) у онкогематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом, Me(Q0,25-Q0,75).

В дальнейшем оценивали основные стадии созревания субпопуляций Т-лимфоцитов на основании установленных маркеров дифференцировки CD45RA и CCR7 [38]. Это позволило выделить «наивные» клетки с фенотипом CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>, Т-лимфоциты центральной и эффекторной памяти (СМ и ЕМ с фенотипами CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> и CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> соответственно), а также «терминально-дифференцированные» Т-клетки (TEMRA, фенотип CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>). Установлено достоверное снижение «наивных» CD4<sup>+</sup>Т-клеток (p<0,001; p<0,001 соответственно) на фоне повышения ЕМ CD4<sup>+</sup>Т-клеток

(p<0,001; p<0,001 соответственно) и TEMRA CD4<sup>+</sup>Т-клеток (p<0,001; p<0,001 соответственно) у больных ИА и группы сравнения по отношению к показателям контрольной группы. Аналогичным образом у всех пациентов выявлено значимое снижение «наивных» CD8<sup>+</sup>Т-клеток (p<0,001; p<0,001 соответственно) и СМ (p=0,010; p=0,002 соответственно) на фоне повышения ЕМ CD8<sup>+</sup>Т-клеток (p<0,001; p<0,001 соответственно) и TEMRA CD8<sup>+</sup>Т-клеток (p=0,004; p=0,001 соответственно) по отношению к показателям контрольной группы (табл. 2).

Таблица 2

Распределение Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов онкогематологических пациентов по популяциям, выявленным на основании анализа коэкспрессии CD45RA, CCR7, Me (Q<sub>0,25</sub> - Q<sub>0,75</sub>)

Популяции	Содержание клеток			Достоверно значимые различия, p
	Группы			
	1 Контрольная (n=25)	2 Сравнения (n=30)	3 ИА (n=30)	
CD4 <sup>+</sup> Т-хелперы naive (CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>++</sup> ), %	40,00 (33,85 – 55,55)	18,85 (7,00 – 32,25)	13,60 (6,25 – 24,20)	p <sub>1-2</sub> < 0,001 p <sub>1-3</sub> < 0,001
CD4 <sup>+</sup> Т-хелперы СМ (CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup> ), %	32,05 (27,35 – 41,45)	29,35 (20,00 – 41,40)	31,65 (21,29 – 43,75)	
CD4 <sup>+</sup> Т-хелперы ЕМ (CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> ), %	2,55 (1,65 – 5,60)	31,40 (15,00 – 45,60)	35,40 (25,75 – 44,25)	p <sub>1-2</sub> < 0,001 p <sub>1-3</sub> < 0,001
CD4 <sup>+</sup> Т-хелперы TEMRA (CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup> ), %	0,45 (0,10 – 0,70)	1,90 (0,95 – 3,80)	1,35 (0,60 – 2,55)	p <sub>1-2</sub> < 0,001 p <sub>1-3</sub> < 0,001
CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты naive (CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>++</sup> ), %	32,70 (23,30 – 42,45)	9,10 (1,75 – 28,50)	6,20 (1,20 – 17,20)	p <sub>1-2</sub> < 0,001 p <sub>1-3</sub> < 0,001
CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты СМ (CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup> ), %	12,85 (4,35 – 17,90)	4,40 (2,30 – 6,90)	2,40 (1,30 – 5,70)	p <sub>1-2</sub> = 0,010 p <sub>1-3</sub> = 0,002
CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты ЕМ (CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> ), %	5,10 (3,25 – 10,10)	27,15 (16,90 – 41,15)	34,60 (21,60 – 45,70)	p <sub>1-2</sub> < 0,001 p <sub>1-3</sub> < 0,001
CD8 <sup>+</sup> Т-лимф. TEMRA (CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup> ), %	13,35 (6,55 – 34,20)	30,80 (25,25 – 45,60)	37,60 (23,30 – 51,60)	p <sub>1-2</sub> = 0,004 p <sub>1-3</sub> = 0,001

Таким образом, в периферической крови пациентов обеих групп доминировали ЕМ и TEMRA CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> подмножества клеток памяти.

Известно, что ингибиторные рецепторы играют критическую роль в истощении Т-клеток при хронических инфекциях [21, 22]. Считается, что исход

грибковой инфекции является следствием баланса между активацией и ингибированием Т-клеток [23]. Исходя из этого, мы провели сравнительный анализ количества Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих ингибиторных рецепторов Tim-3<sup>+</sup> и Lag-3<sup>+</sup> у онкогематологических

больных на фоне развития инфекционного процесса. Процентное содержание Tim-3<sup>+</sup> клеток в субпопуляции CD4<sup>+</sup>T-клеток и цитотоксических CD8<sup>+</sup>T-клеток было достоверно выше у пациентов с ИА по отношению к показателям условно здоровых лиц (p<0,01; p<0,001 соответственно) (Рис. 3 А, Б). У лиц с грибковой инфекцией среди Т-хелперов число клеток, экспрессирующих Tim-3<sup>+</sup>, превышало аналогичный показатель группы сравнения в 1,1 раза, в то время как количество CD8<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>T-клеток было в 1,5 раза

выше и значимо отличалось от данных пациентов, у которых аспергиллезная инфекция была исключена в ходе обследования (p=0,02). При оценке CD4<sup>+</sup>Lag-3<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Lag-3<sup>+</sup>T-клеток выявили тенденцию к возрастанию доли этих клеток в циркуляции у гематологических больных обеих групп по сравнению с контрольными значениями, но достоверных различий получено не было (Рис. 3 В, Г).

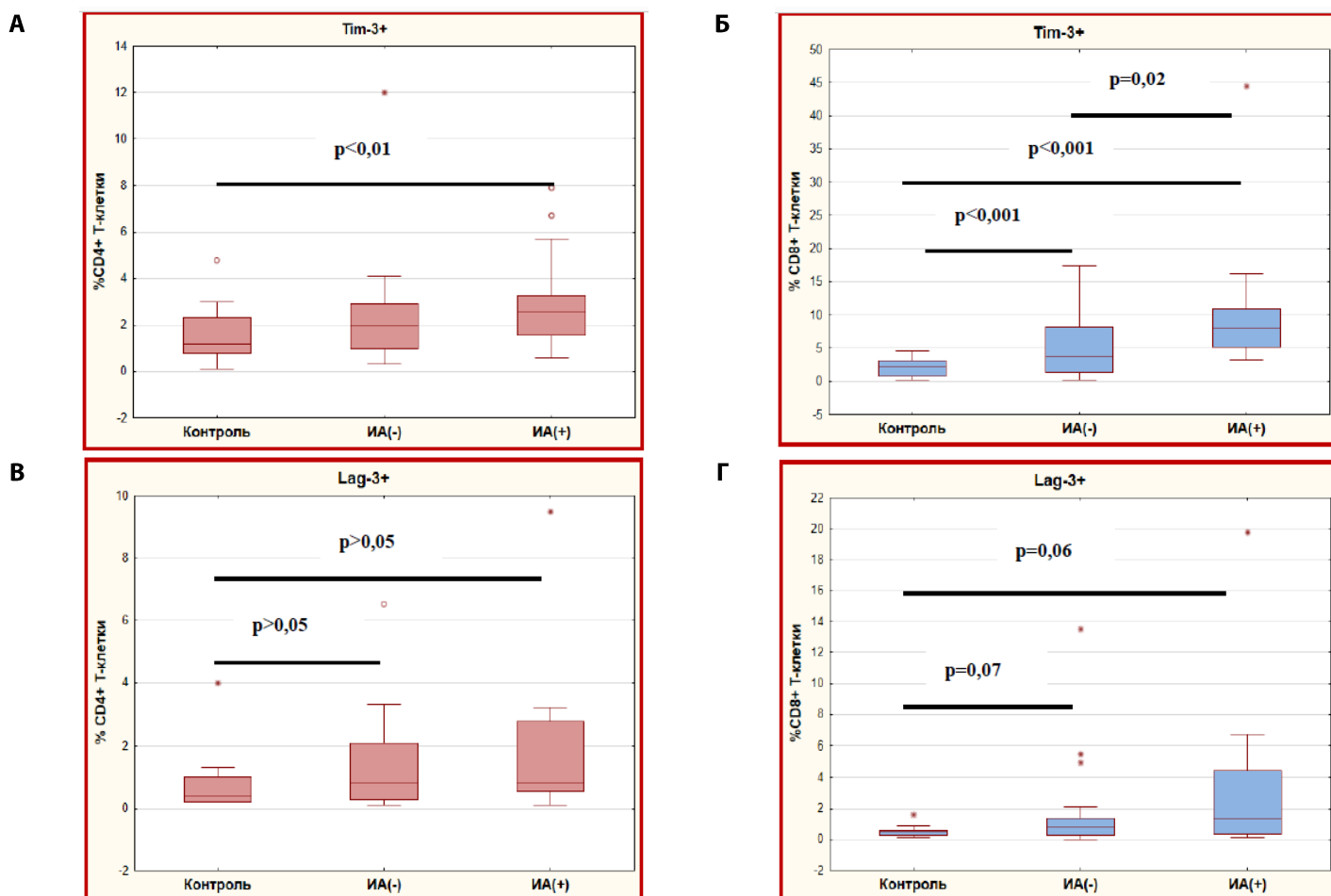


Рис. 3. Содержание Tim-3<sup>+</sup>, Lag-3<sup>+</sup> Т-хелперов (А, В) и Tim-3<sup>+</sup>, Lag-3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>Т-клеток (Б, Г) у онкогематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом, Me(Q0,25-Q0,75).

Мы также оценили процентное содержание Т-клеток с ингибирующими рецепторами, находящихся на различных стадиях созревания. У всех пациентов, включенных в исследование, установлено повышение числа «наивных» (Naïve), эффекторных клеток памяти (EM) и терминально-дифференцированных клеток памяти (TEMRA), экспрессирующих ингибирующие рецепторы TIM-3<sup>+</sup> среди CD4<sup>+</sup>T-клеток, по отношению к показателям

контрольной группы (Рис. 4 А, В, Г). Отличием больных ИА было более высокое число EM CD4<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>T-клеток по отношению к показателям группы сравнения (p=0,03) (Рис. 4 В). Не было получено достоверных различий в содержании CM CD4<sup>+</sup> TIM-3<sup>+</sup>T-клеток при сравнении показателей онкогематологических пациентов обеих групп и условно здоровых лиц (Рис. 4 Б).



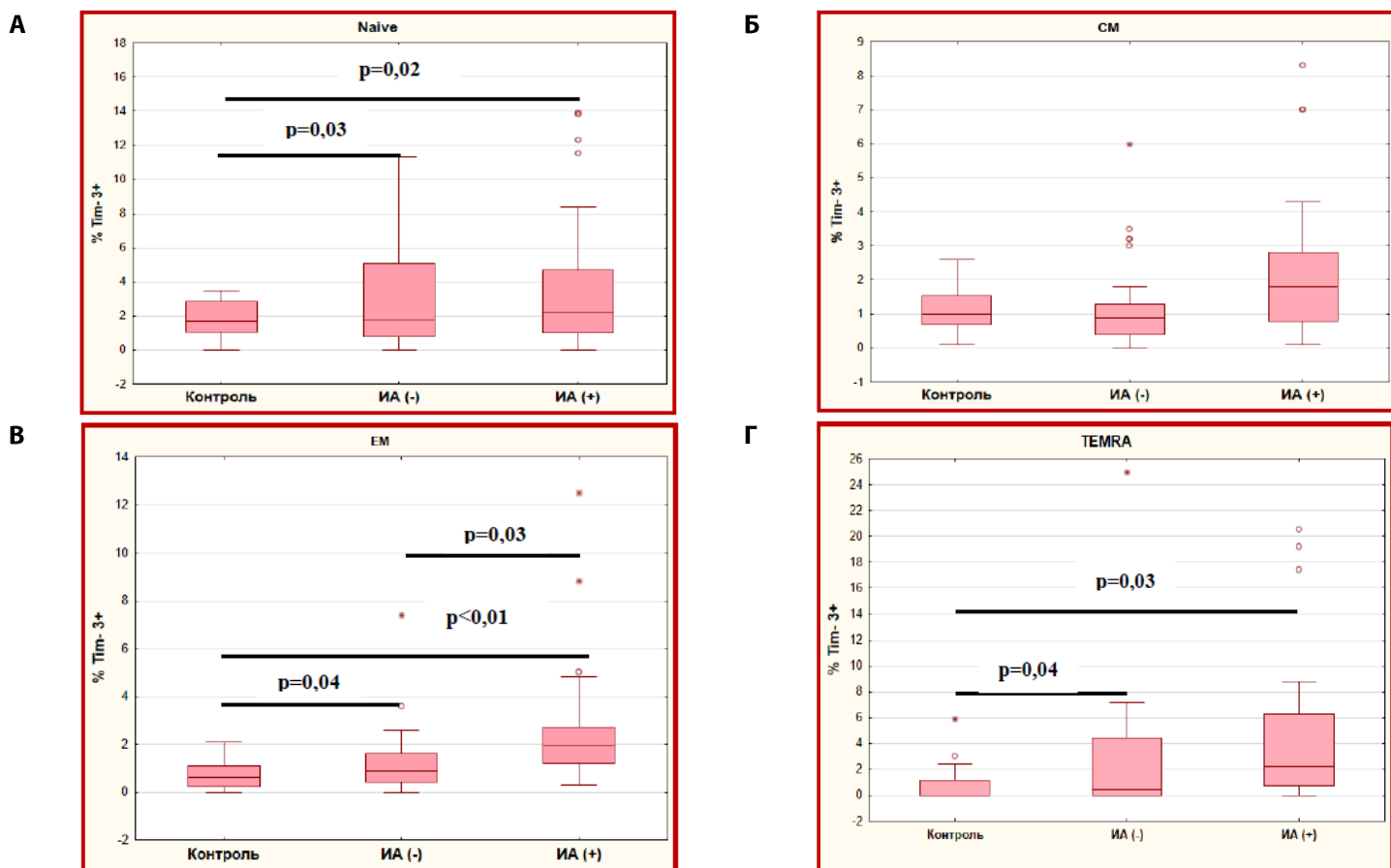
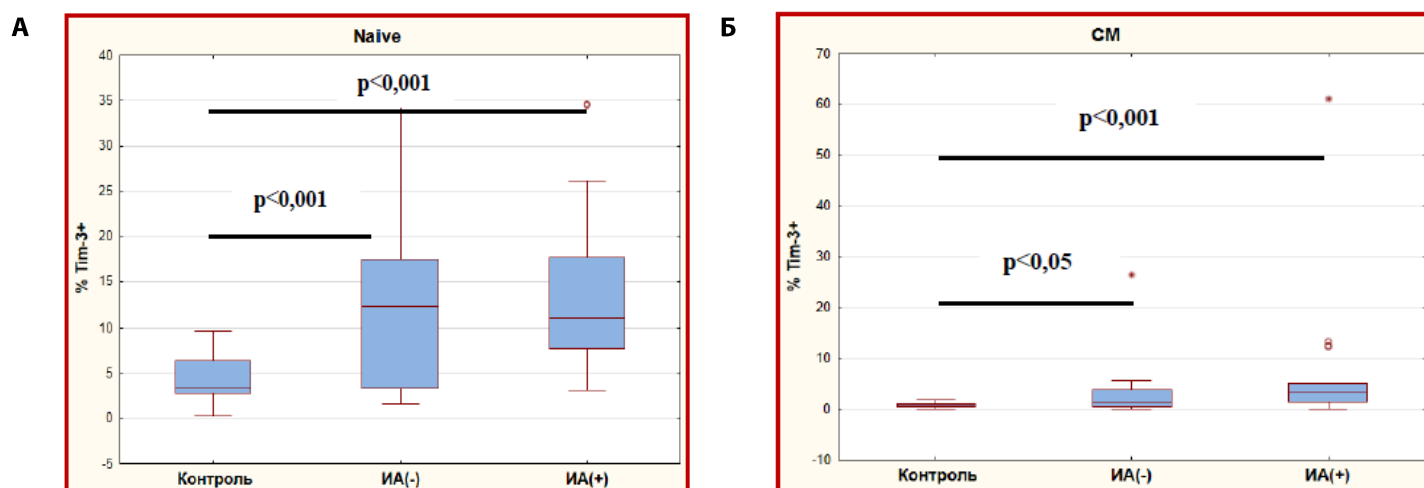


Рис. 4. Содержание CD4+Tim-3+Т-клеток на разных стадиях созревания у онкогематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом, Me(Q0,25-Q0,75).

Выявлено достоверное увеличение экспрессии TIM-3<sup>+</sup> на всех стадиях дифференцировки CD8<sup>+</sup>Т-клеток у онкогематологических больных с признаками инфекционного заболевания по сравнению с группой условно здоровых лиц (Рис. 5 А, Б, В, Г). Для пациентов с грибковой инфекцией также было характерно значимое увеличение числа EM и TEMRA CD8<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>Т-клеток по отношению к показателям группы сравнения (Рис. 5 В, Г). Отмечена тенденция к повышению количества Lag-3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Т-

клеток и Lag-3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-клеток у лиц обеих групп относительно показателей условно здоровых людей на разных стадиях дифференцировки, но достоверных различий получено не было. Положительная корреляционная связь между CD4<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>Lag-3<sup>+</sup> ( $r=0,60$ ,  $p<0,05$ ), CD8<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Lag-3<sup>+</sup> ( $r=0,32$ ,  $p<0,05$ ) указывает на синергичную роль исследованных ингибиторных рецепторов в течении инфекционных осложнений у онкогематологических больных.



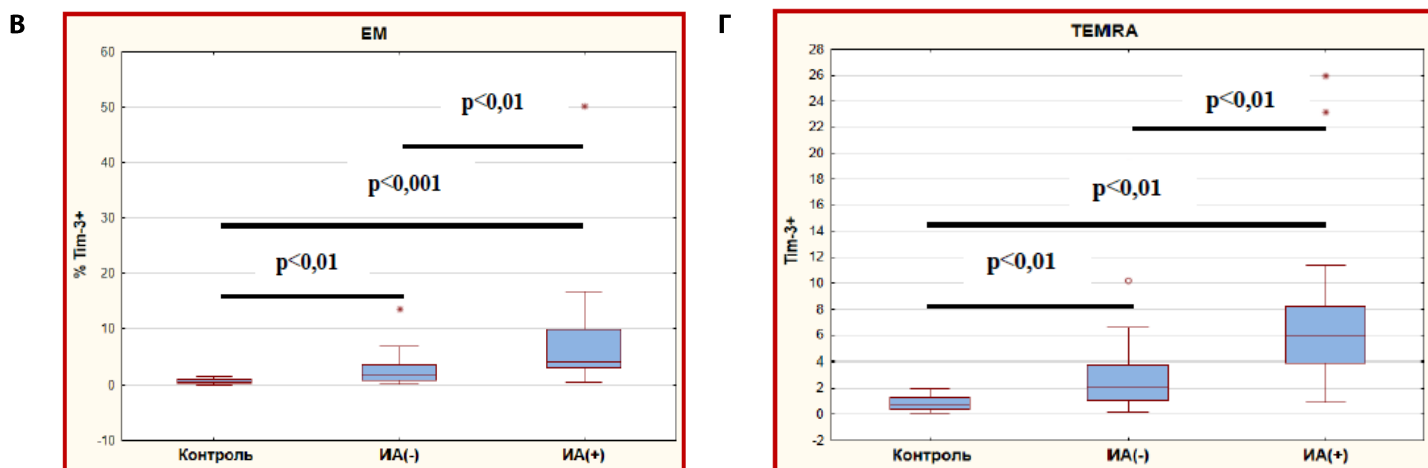


Рис. 5. Содержание CD8+Tim-3+ Т-клеток на разных стадиях созревания у онкогематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом, Me(Q0,25-Q0,75).

Для подтверждения клинического значения Т-лимфоцитов с ингибиторными рецепторами в патогенезе аспергиллезной инфекции провели мониторинг показателей у 10 пациентов с благоприятным течением ИА (благоприятный исход или отсутствие рецидивов в течение 6 месяцев) и у 8 человек с неблагоприятным исходом. При анализе кинетики числа клеток с ингибиторными рецепторами установле-

но, что у лиц с благоприятным течением ИА к моменту достижения ремиссии и завершения антимикотической терапии значительно снизилось число клеток с истощенным фенотипом – CD4<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>Т-клеток и CD8<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>Т-клеток (Рис. 6 А, В), чего не наблюдали у больных с неблагоприятным течением инфекции (Рис. 6 Б, Г).

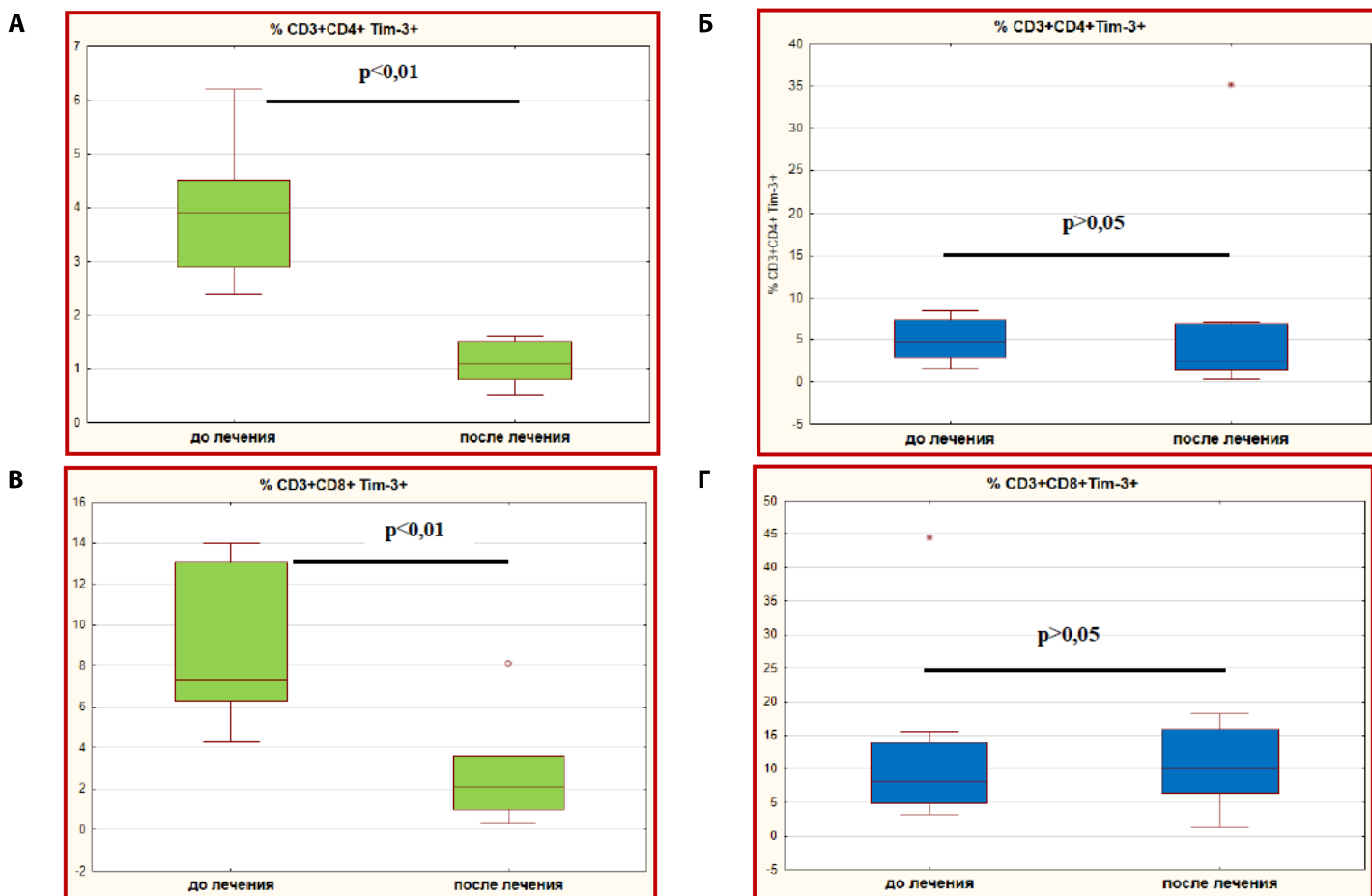


Рис. 6. Динамика CD4+TIM-3+ и CD8+TIM-3+ у онкогематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом в зависимости от исхода заболевания, (А, В – благоприятный исход, Б, Г – неблагоприятный исход), Me (Q0,25-Q0,75).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Оппортунистические инфекции, вызванные плесневыми грибами, включая инвазивный аспергиллез легких, наиболее часто развиваются у лиц с ослабленным иммунитетом [2]. Высокая смертность пациентов с ИА ставит вопрос о применении стратегий, направленных на восстановление иммунитета хозяина, для усиления эффективности противогрибковых препаратов [15, 16]. Использование ингибиторов иммунных контрольных точек является иммунотерапевтической стратегией, которая уже доказала свою ценность в современной онкологии и завоевывает все больший интерес для применения в области инфекционных заболеваний [21, 22]. Ингибиторные рецепторы являются общепризнанными регуляторами иммунных клеток, которые в условиях хронической антигенной стимуляции, например, при онкологических заболеваниях или персистирующих инфекциях, предотвращают чрезмерную активацию Т-клеток, что может привести к повреждению собственных тканей организма-хозяина. Был сделан вывод, что ингибиторные рецепторы необходимы для поддержания гомеостаза и ограничения аутоиммунитета, также они могут принимать участие в подавлении клиренса патогенов и противоопухолевого иммунитета [24]. Наиболее полно изучена возможность использования блокады ингибиторных рецепторов PD-1, представленных на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках, в иммунотерапии рака. Однако положительное лечебное действие зачастую сопровождается нежелательными иммуноопосредованными явлениями. Поэтому все большее внимание уделяется изучению ингибиторных рецепторов TIM-3 и LAG-3, играющих значимую роль во взаимодействии ДК и Th [24]. Показано, что человеческие CD4<sup>+</sup>Т-клетки секретировали повышенные уровни IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-2 и IL-6, но не IL-10, IL-4 и TNF- $\alpha$ , при стимуляции анти-CD3/анти-CD28 в присутствии моноклональных антител, блокирующих TIM-3. Данный эффект не был обусловлен нарушением пролиферации или гибелью клеток, а скорее был связан с подавлением индукции цитокинов на уровне транскрипции. Авторы сделали вывод, что Tim-3 является отрицательным регулятором Th1 и Th17 [39]. Помимо экспрессии на Т-клетках, Tim-3 идентифицирован на Treg и на клетках врожденного иммунитета (ДК, НК, моноциты) [24]. LAG-3, структурный гомолог CD4, индуцируется при активации Т-клеток, и его экспрессия поддерживается в условиях устойчивой антигенной стимуляции, например, при хронических инфекциях или онкологических заболеваниях. Установлено, что экспрессия LAG-3 на В-клетках, НК, плазматических ДК, но в большинстве публикаций показано, что данный ингибиторный рецептор играет значимую роль в подавлении функциональной активности Т-клеток [24]. Несмотря на интенсивные исследова-

ния значения ингибиторных рецепторов при различных инфекционных заболеваниях, данные об особенностях экспрессии TIM-3 и LAG-3 на иммунных клетках экспериментальных животных, зараженных микромицетами, и у больных инвазивными микозами ограничены [23]. Таким образом, оправдано изучение этих мишеней для иммунотерапии на доклинических моделях и у лиц с грибковыми инфекциями.

В нашем исследовании у всех онкогематологических пациентов с признаками инфекционного процесса установлено уменьшение абсолютного числа CD4<sup>+</sup>Т-клеток и цитотоксических CD8<sup>+</sup>Т-клеток по отношению к показателям контрольной группы. Обращает на себя внимание выраженное изменение дифференцировки Т-лимфоцитов у больных ИА – снижение относительного числа Т-хелперов на фоне достоверного увеличения цитотоксических CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов. Также отличием пациентов с ИА было значимое снижение абсолютного числа CD4<sup>+</sup>Т-хелперов по сравнению с показателями лиц без грибковой инфекции, что согласуется с ранее полученными нами данными [40, 41]. Известно, что CD4<sup>+</sup>Т-хелперы включают в себя различные клеточные клоны, в том числе Th1 и Th17, которые являются центральными клетками, контролирующими клетки врожденного иммунного ответа, и цитотоксическими Т-лимфоцитами 1 типа (Tc1), тем самым препятствуя инвазии микромицетов в легочную ткань [13, 14]. Однако определение числа и функциональной активности различных типов Th на фоне иммуносупрессии у онкогематологических больных представляет определенные сложности из-за немногочисленности клеток в циркуляции. По данным зарубежных авторов, определение содержания IL-17 может иметь диагностическое значение у онкогематологических пациентов с ИА, но связано с проблемами использования иммуноферментных наборов разных производителей или дорогостоящих молекулярно-генетических методов [42, 43]. Таким образом, поскольку Tim-3 является маркером Th1, Th17 и Tc1, а LAG-3 контролирует активность Т-лимфоцитов, то определение числа Т-лимфоцитов, экспрессирующих данные ингибиторные рецепторы, может дать представление о состоянии функциональной активности клеток. Установлено, что у больных ИА число Tim-3<sup>+</sup>клеток в субпопуляции CD4<sup>+</sup>Т-клеток и цитотоксических CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов достоверно превышало показатели условно здоровых лиц. Повышенное количество CD8<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>Т-клеток было отличием иммунного профиля пациентов с грибковой инфекцией. Установлено возрастание доли Lag-3<sup>+</sup> положительных клеток среди Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови у всех онкогематологических больных на фоне инфекционного процесса, но достоверных различий по отношению к

контрольным значениям получено не было. Тем не менее положительная корреляционная связь между клетками, несущими различные ингибиторные рецепторы, косвенно подтверждает их значение в исходе микотической инфекции. Однако оценка доли Т-клеток, коэкспрессирующих Tim-3<sup>+</sup> и Lag-3<sup>+</sup>, на фоне существенного снижения у онкогематологических пациентов в циркуляции CD4<sup>+</sup>Т-клеток и CD8<sup>+</sup>Т-клеток была затруднительной. Поэтому в дальнейшем исследования были сосредоточены на Tim-3<sup>+</sup> положительных клетках.

Считается, что каждое подмножество Т-клеток памяти имеет уникальные функции. Антиген-специфические зрелые эффекторные Т-клетки памяти находятся в циркуляции и способны быстро реагировать на антиген. Именно в составе данной группы клеток имеются зрелые Т-лимфоциты различных типов. Терминально-дифференцированные Т-клетки памяти рассматриваются в качестве финальной стадии созревания, которую можно обнаружить в периферической крови. Таким образом, оценка распределения различных подмножеств клеток внутри клона может дать ценную информацию об особенностях формирования специфического иммунного ответа [25, 38]. При более глубоком анализе числа Tim-3<sup>+</sup> положительных клеток среди различных подмножеств Т-лимфоцитов обнаружено, что отличием пациентов с ИА было значимо высокое число эффекторных клеток памяти CD4<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>Т-клеток, эффекторных и терминально-дифференцированных клеток памяти CD8<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>Т-клеток по отношению к показателям группы сравнения. Наши данные совпадают с результатами, полученными у пациентов с вирусными и паразитарными инфекциями. Установлено, что ингибиторные рецепторы Tim-3 являются маркерами наиболее дисфункциональных клеток среди Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов у лиц с вирусным гепатитом В и С. Совместная блокада Tim-3 и PD-1 более эффективно восстанавливала функциональную активность Т-клеток при HBV и HCV, чем блокада только PD-1 [44]. Herrmann M. с соавторами выявили повышенную экспрессию Tim-3<sup>+</sup> и LAG-3<sup>+</sup> на всех стадиях дифференцировки Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов у пациентов с COVID-19 и малярией [45].

При базовой оценке иммунных показателей нам не удалось обнаружить достоверных различий в числе TIM-3<sup>+</sup> положительных клеток среди Т-лимфоцитов у онкогематологических больных в зависимости от исхода грибковой инфекции. Однако оказалось, что Т-хелперы и цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие TIM-3, тесно связаны с течением заболевания: по мере выздоровления от инфекции число клеток с ингибиторными рецепторами у онкогематологических пациентов постепенно

нормализовалось, чего не наблюдали у лиц с неблагоприятным исходом ИА. Аналогичным образом, успешное лечение вирусной инфекции у пациентов с COVID-19 сопровождалось нормализацией числа TIM-3<sup>+</sup> и LAG-3<sup>+</sup> положительных клеток среди CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток [45].

Описано несколько клинических случаев, где представлены результаты лечения больных с различными инвазивными микозами ингибиторами иммунных контрольных точек. Так, на фоне резистентности к антимикотикам комбинированная иммунотерапия IFN-γ и ингибитором PD-1 ниволумабом способствовала выздоровлению пациента с гастро-селезеночным мукормикозом и частично улучшила состояние больного ОМЛ и грибковым пансинуситом. В обоих случаях установлена нормализация числа лимфоцитов в циркуляции и экспрессии PD-1 на Т-лимфоцитах [33, 34]. Описан аналогичный случай комбинаторной иммунотерапии ниволумабом и IFN-γ сочетанной грибковой инфекции (ИА, мукормикоз головного мозга и околоносовых пазух), возникшей у пациента с диабетом и COVID-19, у которого отмечали низкую чувствительность к антифунгальной терапии. В процессе лечения ниволумабом и IFN-γ нормализовалась экспрессия PD-1 на Т-клетках, восстановилась их пролиферативная активность, абсцессы головного мозга уменьшились в размерах [35]. Приведенные данные подчеркивают важность оценки клинико-иммунологических показателей пациентов на фоне базовой противогрибковой терапии и определения целесообразности использования ИКТ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом наши результаты свидетельствуют, что клетки с признаками истощенного иммунного фенотипа находятся преимущественно среди подмножеств, ответственных за формирование защитного иммунного ответа, и тесно связаны с исходом ИА. Это частично может объяснить высокие показатели смертности у пациентов с ИА, несмотря на соответствующее этиотропное лечение. Применение иммунотерапевтических методов, восстанавливающих активность истощенных Т-клеток, может быть полезным для улучшения исхода грибковой инфекции.

*Исследование выполнено в рамках темы Государственного задания Минздрава России «Молекулярно-генетические и иммунологические аспекты микозов легких, вызванных грибами рода Aspergillus. Фокус на адаптивный иммунный ответ и механизмы иммунной толерантности». Рег. номер ЕГИСУ: 122012100294-4*

ЛИТЕРАТУРА

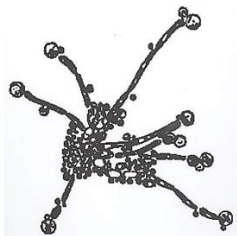
1. Souza L., Nouer S.A., Morales H., et al. Epidemiology of invasive fungal disease in haematologic patients. *Mycoses*. 2021; 64 (3): 252-256. doi:10.1111/myc.13205
2. Arastehfar A., Carvalho A., Houbraken J., et al. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: from basics to clinics. *Stud Mycol*. 2021; 10 (100): 100115. doi:10.1016/j.simyco.2021.100115
3. Hoening M., Seidel D., Sprute R., et al. COVID-19-associated fungal infections. *Nat. Microbiol*. 2022; 7 (8): 1127-1140. doi: 10.1038/s41564-022-01172-2
4. Denning D.W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect. Dis*. 2024; 24 (7): e428-e438. doi:10.1016/S1473-3099(23)00692-8
5. Parums D.V. Editorial: The World Health Organization (WHO) fungal priority pathogens list in response to emerging fungal pathogens during the COVID-19 pandemic. *Med. Sci. Monit*. 2022; 1 (28): e939088. doi:10.12659/MSM.939088
6. Ullmann A.J., Aguado J.M., Arikan-Akdagli S., et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin. Microbiol. Infect*. 2018; 24 (1): e1-e38. doi:10.1016/j.cmi.2018.01.002
7. Андреев С.С., Бронин Г.О., Епифанова Н.Ю. и др. Преимущества раннего назначения антимикотической терапии у гематологических пациентов. *Онкогематология*. 2024; 19 (1): 99-112. [Andreev S.S., Bronin G.O., Epifanova N.Yu., Kozlova O.P., Pristanskova E.A., Khostelidi S.N., Shadrivova O.V. Benefits of early antifungal therapy in hematology patients. *Oncohematology*. 2024; 19 (1): 99-112. (In Russ.)]. doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-1-99-112
8. Lestrade P.P.A., Meis J.F., Melchers W.J.G., Verweij P.E. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management. *Clin. Microbiol. Infect*. 2019; 25 (7): 799-806. doi:10.1016/j.cmi.2018.11.027
9. Тараскина А.Е., Латыпова Е.М., Пчелин И.М. и др. Аминокислотный полиморфизм CYP51a грибов рода *Aspergillus*, ассоциированный с формированием резистентности к азолам. *Проблемы медицинской микологии*. 2019; 21 (3): 39-45. [Taraskina A.E., Latypova E.M., Pchelin I.M., et al. Amino acid cyp51A polymorphism associated with azole resistance of fungi from the genus *Aspergillus*. *Problems in Medical Mycology*. 2019; 21 (3): 39-45. (In Russ.)].
10. Tsuchido Y., Tanaka M., Nakano S., et al. Prospective multicenter surveillance of clinically isolated *Aspergillus* species revealed azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates with TR34/L98H mutation in the Kyoto and Shiga regions of Japan. *Med. Mycol*. 2019; 57 (8): 997-1003. doi:10.1093/mmy/myz003
11. Czyrski A., Resztak M., Swiderski P., et al. The overview on the pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of triazoles. *Pharmaceutics*. 2021; 13 (11): 1961. doi:10.3390/pharmaceutics13111961
12. Kyriakidis I., Tragiannidis A., Munchen S., Groll A.H. Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents. *Expert Opin. Drug Saf*. 2017; 16 (2): 149-165. doi:10.1080/14740338.2017.1270264
13. Шадринова О.В., Фролова Е.В., Тараскина А.Е., Клишко Н.Н. Молекулярно-генетические и иммунологические аспекты инвазивного аспергиллеза. *Журнал Инфектологии*. 2017; 9 (1): 47-54. [Shadrivova O.V., Frolova E.V., Taraskina A.E., Klimko N.N. Molecular genetic and immunological aspects of invasive aspergillosis. *Journal Infectology*. 2017; 9 (1): 47-54. (In Russ.)]. doi.org/10.22625/2072-6732-2017-9-1-47-54
14. Heung L.J., Wiesner D.L., Wang K., et al. Immunity to fungi in the lung. *Semin. Immunol*. 2023; 3 (66): 101728. doi:10.1016/j.smim.2023.101728
15. Sam Q.H., Yew W.S., Seneviratne C.J., et al. Immunomodulation as therapy for fungal infection: Are we closer? *Front Microbiol*. 2018; 9: 1612. doi:10.3389/fmicb.2018.01612
16. Boyer J., Feys S., Zsifkovits I., et al. Treatment of invasive aspergillosis: how it's going, where it's heading. *Mycopathologia*. 2023; 188 (5): 667-681. doi:10.1007/s11046-023-00727-z
17. Dewi I.M.W., van de Veerdonk F.L., Gresnigt M.S. The multifaceted role of T-helper responses in host defense against *Aspergillus fumigatus*. *J. Fungi (Basel)*. 2017; 3 (4): 55. doi:10.3390/jof3040055
18. Bacher P., Jochheim-Richter A., Mockel-Tenbrink N., et al. Clinical-scale isolation of the total *Aspergillus fumigatus*-reactive T-helper cell repertoire for adoptive transfer. *Cytherapy*. 2015; 17 (10): 1396-405. doi:10.1016/j.jcyt.2015.05.011
19. Seif M., Kakoschke T.K., Ebel F., et al. CAR T cells targeting *Aspergillus fumigatus* are effective at treating invasive pulmonary aspergillosis in preclinical models. *Sci. Transl. Med*. 2022; 14 (664): eabh1209. doi:10.1126/scitranslmed.abh1209
20. Li B., Chan H.L., Chen P. Immune checkpoint inhibitors: basics and challenges. *Curr. Med. Chem*. 2019; 26 (17): 3009-3025. doi:10.2174/0929867324666170804143706
21. Abers M.S., Lionakis M.S., Kontoyiannis D.P. Checkpoint inhibition and infectious diseases: A good thing? *Trends Mol. Med*. 2019; 25 (12): 1080-93. doi:10.1016/j.molmed.2019.08.004
22. Karniadakis I., Mazonakis N., Akinosoglou K., et al. Immune checkpoint inhibitors and infection: what is the interplay? *In Vivo*. 2023; 37 (6): 2409-2420. doi:10.21873/invivo.13346

23. Wurster S., Watowich S.S., Kontoyiannis D.P. Checkpoint inhibitors as immunotherapy for fungal infections: Promises, challenges, and unanswered questions. *Front Immunol.* 2022; 25: 13: 1018202. doi:10.3389/fimmu.2022.1018202
24. Joller N., Anderson A.C., Kuchroo V.K. LAG-3, TIM-3, and TIGIT: Distinct functions in immune regulation. *Immunity.* 2024; 57 (2): 206-222. doi: 10.1016/j.immuni.2024.01.010
25. Sharma J., Mudalagiriappa S., Nanjappa S.G. T cell responses to control fungal infection in an immunological memory lens. *Front Immunol.* 2022; 13 (13): 905867. doi: 10.3389/fimmu.2022.905867
26. Mellinghoff S.C., Thelen M., Bruns C., et al. T-cells of invasive candidiasis patients show patterns of T-cell exhaustion suggesting checkpoint blockade as treatment option. *J. Infect.* 2022; 84 (2): 237-47. doi:10.1016/j.jinf.2021.12.00918
27. Deng W., Su Z., Liang P., et al. Single-cell immune checkpoint landscape of PBMCs stimulated with *Candida albicans*. *Emerg. Microbes. Infect.* 2021; 10 (1): 1272-83. doi:10.1080/22221751.2021.1942228
28. Campanelli A.P., Martins G.A., Souto J.T., et al. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. *J. Infect. Dis.* 2003; 187 (9): 1496-505. doi:10.1086/374646
29. Stephen-Victor E., Karnam A., Fontaine T., et al. *Aspergillus fumigatus* cell wall  $\alpha$ -(1,3)-glucan stimulates regulatory T-cell polarization by inducing PD-L1 expression on human dendritic cells. *J. Infect. Dis.* 2017; 216 (10): 1281-1294. doi:10.1093/infdis/jix469
30. Vu C.T.B., Thammahong A., Yagita H., et al. Blockade of PD-1 attenuated postsepsis aspergillosis Via the activation of IFN- $\gamma$  and the dampening of IL-10. *Shock.* 2020; 53 (4): 514-24. doi:10.1097/SHK.0000000000001392
31. Wurster S., Robinson P., Albert N.D., et al. Protective activity of programmed cell death protein 1 blockade and synergy with caspofungin in a murine invasive pulmonary aspergillosis model. *J. Infect. Dis.* 2020; 222 (6): 989-94. doi:10.1093/infdis/jiaa264
32. Wurster S., Albert N.D., Bharadwaj U., et al. Blockade of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint pathway improves infection outcomes and enhances fungicidal host defense in a murine model of invasive pulmonary mucormycosis. *Front Immunol.* 2022; 18 (13): 838344. doi:10.3389/fimmu.2022.838344
33. Grimaldi D., Pradier O., Hotchkiss R.S., Vincent J.L. Nivolumab plus interferon in the treatment of intractable mucormycosis. *Lancet Infect. Dis.* 2017; 1 (18): e530. doi:10.1016/S1473-3099(16)30541-2
34. Banck J.C., Mueller N., Mellinghoff S.C., et al. Immune checkpoint blockade for aspergillosis and mucormycosis coinfection. *Hemasphere.* 2021; 5 (3): e530. doi:10.1097/HS9.0000000000000530
35. Serris A., Ouedrani A., Uhel F., et al. Case report: Immune checkpoint blockade plus interferon- $\gamma$  add-on antifungal therapy in the treatment of refractory COVID-associated pulmonary aspergillosis and cerebral mucormycosis. *Front Immunol.* 2022; 1 (13): 900522. doi:10.3389/fimmu.2022.900522
36. Donnelly J.P., Chen S.C., Kauffman C.A., et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71 (6): 13671376. doi:10.1093/cid/ciz1008
37. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Толоян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» (проект). *Медицинская иммунология.* 2012; 14 (3): 255-268. [Khaydukov S.V., Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. Standardized technology "Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytofluorimeter analyzers" (project). *Medical immunology.* 2012; 14 (3): 255-268. (In Russ)].
38. Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Толоян А.А. Значения нормы субпопуляций Т-хелперов различного уровня дифференцировки в периферической крови. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61 (3): 179-184. [Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K., Totolyan A.A. The standard values of sub-populations of T-helpers of different level of differentiation in peripheral blood. *Clinical laboratory diagnostics.* 2016; 61 (3): 179-184. (In Russ.)]. doi 10.18821/0869-2084-2016-61-3-179-184
39. Hastings W.D., Anderson D.E., Kassam N. TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur. J. Immunol.* 2009; 39 (9): 2492-2501. doi:10.1002/eji.200939274
40. Фролова Е.В., Шадринова О.В., Филиппова Л.В. и др. Прогностическое значение иммунологических показателей у гематологических больных инвазивным аспергиллезом. *Проблемы медицинской микологии.* 2014; 16 (3): 37-43. [Frolova E.V., Shadrivova O.V., Filippova L.V., et al. Prognostic value of immunological parameters in hematological patients with invasive aspergillosis. *Problems in Medical Mycology.* 2014; 16 (3): 37-43. (In Russ.)].
41. Шадринова О.В., Фролова Е.В., Филиппова Л.В. и др. Клинико-иммунологические особенности инвазивного аспергиллеза у больных с лимфомой Ходжкина. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика.* 2014; 7 (2): 233-238. [Shadrivova O.V., Frolova Ye.V., Filippova L.V., et al. Clinico-immunological features of invasive aspergillosis in patients with Hodgkin's disease. *Clinical hematology. Basic research and clinical practice.* 2014; 7 (2): 233-238. (In Russ.)].

42. He Q., Cao J., Zhang M., Feng C. IL-17 in plasma and bronchoalveolar lavage fluid in non-neutropenic patients with invasive pulmonary aspergillosis. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2024; 8 (14): 1402888. doi: 10.3389/fcimb.2024.1402888
43. Aerts R., Ricaño-Ponce I., Bruno M., et al. ECMM Immunologic markers for treatment monitoring and diagnosis in Invasive Mold Infection Working Group Contributors. Circulatory inflammatory proteins as early diagnostic biomarkers for invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies-an exploratory study. *Mycopathologia.* 2024; 189 (2): 24. doi:10.1007/s11046-024-00831-8
44. Golden-Mason L., Palmer B.E., Kassam N., et al. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J. Virol.* 2009; 83 (18): 9122-30. doi: 10.1128/JVI.00639-09
45. Herrmann M., Schulte S., Wildner N.H., et al. Analysis of co-inhibitory receptor expression in COVID-19 infection compared to acute *Plasmodium falciparum* malaria: LAG-3 and TIM-3 correlate with T cell activation and course of disease. *Front Immunol.* 2020; 26 (11): 1870. doi:10.3389/fimmu.2020.01870

Поступила в редакцию журнала 06.09.24

Принята к печати 03.10.24



*Для цитирования:* Клименко К.Э., Русецкий Ю.Ю., Лебедева А.А., Авдеенко Ю.Л., Борзова Ю.В. Опыт лечения COVID-ассоциированного мукормикоза околоносовых пазух: описание клинического случая. Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (3): 39-46. DOI:10.24412/1999-6780-2024-3-39-46

*For citation:* Klimenko K.E., Rusetsky Yu.Y., Lebedeva A.A., Avdeenko Yu.L., Borzova Yu.V. Experience in the treatment of COVID-associated mucormycosis of the paranasal sinuses: description of the clinical case. Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (3):39-46. (In Russ). DOI:10.24412/1999-6780-2024-3-39-46

## **ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ COVID-АССОЦИИРОВАННОГО МУКОРМИКОЗА ОКОЛОНОСОВЫХ ПАЗУХ: ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ**

**<sup>1,2,3</sup>Клименко К.Э. (профессор кафедры)\*, <sup>1,2</sup>Русецкий Ю.Ю. (зав. кафедрой), <sup>1</sup>Лебедева А.А. (оториноларинголог), <sup>4</sup>Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.), <sup>4</sup>Борзова Ю.В. (зав. клиникой)**

<sup>1</sup>Центральная государственная медицинская академия (кафедра оториноларингологии), Москва; <sup>2</sup>«Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва; <sup>3</sup>Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского, Москва; <sup>4</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

*Мукормикоз околоносовых пазух является одним из наиболее тяжелых осложнений у пациентов с коронавирусной инфекцией – COVID-19. Летальность при различных формах мукормикоза варьирует от 5 до 95%, что зависит от своевременности диагностики, хирургического лечения и использования таргетной антифунгальной терапии.*

*В статье представлен клинический случай мукормикоза околоносовых пазух, возникший после внебольничной пневмонии, обусловленной вирусом SARS-CoV-2. Проведено успешное комбинированное лечение, включающее хирургическое удаление пораженных тканей и системную антифунгальную терапию, в соответствии с современными клиническими рекомендациями.*

**Ключевые слова:** мукормикоз, мукормикоз околоносовых пазух, зигомикоз, COVID-19, SARS-CoV-2

\* Контактное лицо: Клименко Ксения Эльдаровна, e-mail:lor-doctor@mail.ru

## **EXPERIENCE IN THE TREATMENT OF COVID-ASSOCIATED MUCORMYCOSIS OF THE PARANASAL SINUSES: DESCRIPTION OF THE CLINICAL CASE**

**<sup>1,2,3</sup>Klimenko K.E. (professor of the department), <sup>1,2</sup>Rusetsky Yu.Yu. (head of the department), <sup>1</sup>Lebedeva A.A. (otorhinolaryngologist), <sup>4</sup>Avdeenko Yu.L. (senior scientific researcher), <sup>4</sup>Borzova Yu.V. (head of the clinic)**

<sup>1</sup>Central State Medical Academy (Department of Otorhinolaryngology), Moscow; <sup>2</sup>"Central Clinical Hospital with Polyclinic" of the Office of the President of the Russian Federation, Moscow; <sup>3</sup>Scientific Research Clinical Institute of Otorhinolaryngology named after L.I. Sverzhevsky, Moscow; <sup>4</sup>North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

*Mucormycosis of the paranasal sinuses is one of the most serious complications in patients with the new coronavirus infection – COVID-19. Mortality in various forms of mucormycosis varies from 5 to 95%, which depends on the timeliness of diagnosis and the use of targeted antifungal therapy.*

*The article presents a clinical case of mucormycosis of the paranasal sinuses after community-acquired pneumonia caused by the SARS-CoV-2 virus which was successfully cured with combination of surgical resection of involved tissue and systemic antifungal medications.*

**Key words:** mucormycosis, rhino-orbital mucormycosis, zygomycosis, COVID-19, SARS-CoV-2

## **ВВЕДЕНИЕ**

Инвазивные грибковые инфекции развиваются преимущественно у иммунокомпрометированных пациентов [1]. На фоне пандемии COVID-19 во всем мире был отмечен рост микотических осложнений. В Российской Федерации до пандемии коронавирусной инфекции, ассоциированной с вирусом SARS-CoV-2, частота выявления мукормикоза составляла 0,16 на 100 000 человек [2]. По данным на 2023 г., общее число наблюдаемых пациентов с мукормикозом с 2020 г. по 2022 г. превысило показатели за весь



предыдущий период наблюдения (более 15 лет) [3]. Тем не менее на сегодняшний день публикации о COVID-ассоциированном мукомикозе остаются единичными. Мы представляем успешный случай лечения мукомикоза, развившегося на фоне COVID-19, с использованием хирургических и терапевтических методов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Представлен клинический случай мукомикоза после перенесенной новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Для постановки диагноза мукомикоза использовали критерии диагностики микозов ЕСММ/MSG ERC 2020 (Европейской организации по изучению и лечению рака/ группы, исследующей микозы, Национального института аллергологии и инфекционных заболеваний (NIAID), США) [4, 5]. Провели анализ литературы в базах PubMed (сентябрь 2024 г.) и Web of Science (сентябрь 2024 г.). Поиск информации осуществляли с помощью следующих ключевых слов: *COVID-19, SARS-CoV-2, invasive fungal infection, rhino-orbital mucormycosis, mucormycosis*.

### Описание клинического случая.

Пациентка В., 65 лет, поступила в ЦКБ г. Москвы в июле 2021 г. с жалобами на выраженную общую слабость, быструю утомляемость, затрудненное носовое дыхание, одышку, повышение температуры тела до 38 °С, сухой кашель.

Из анамнеза известно, что заболела остро за неделю до госпитализации, когда появилась фебрильная лихорадка, першение в горле, выраженная общая слабость. Обследована амбулаторно: определен положительный тест методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки. Пациентка принимала препараты осельтамивир, левофлоксацин, виферон и апиксабан – без эффекта. На компьютерной томографии органов грудной полости (КТ ОГП) выявлена двусторонняя полисегментарная пневмония с 40% поражением легких, в связи с чем больная была направлена на стационарное лечение.

При поступлении в стационар в клиническом анализе крови определены следующие показатели: эритроциты –  $4,28 \times 10^{12}/л$ , гемоглобин – 127 г/л, лейкоциты –  $6,9 \times 10^9/л$  (гранулоциты – 71%, лимфоциты – 19%), тромбоциты –  $140 \times 10^9/л$ , СОЭ – 23 мм/ч; в биохимическом анализе крови: глюкоза – 8,9 ммоль/л, аланинаминотрансфераза (АЛТ) – 15 мкмоль/л, аспартатаминотрансфераза (АСТ) – 35 мкмоль/л, мочевины – 8,1 ммоль/л, креатинин – 78 мкмоль/л, ферритин 557 мг/мл, С-реактивный белок (СРБ) – 10,2 мкг/л. При посеве мокроты бактерии и грибы не обнаружены. ПЦР-тест на вирусы гриппа показал отрицательный результат.

Пациентке провели терапию согласно национальным рекомендациям по лечению новой коронавирусной инфекции [6]. Применяли фавипиравир, цефтриаксон, левофлоксацин, эноксапарин, амброксол, парацетамол и кислородотерапию. Также назначали дексаметазон внутривенно 10 мг/сутки в течение 7 дней с постепенным снижением дозы. Почти весь период госпитализации больная находилась на респираторной поддержке; инвазивную и неинвазивную искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) не выполняли. Дополнительно для лечения коморбидных нозологий использовали эналаприл, бисопролол и омегапролол.

При контрольном исследовании респираторного образца на Sars-Cov-2 (от августа 2021 г.) ПЦР-тест был отрицательным. На КТ ОГП при выписке из стационара обнаружены единичные очаги инфильтрации в нижних отделах обоих легких (положительная динамика). Пациентка была выписана из стационара на амбулаторное лечение.

После выписки из стационара женщина стала отмечать боль, покалывания в правой половине лица, заложенность носа, гнойное отделяемое из носа и заложенность правого уха. Амбулаторно обратилась к отоларингологу по месту жительства, который на основании проведенной КТ околоносовых пазух (ОНП) диагностировал экссудативный средний отит справа, вторичный кохлеарный неврит и хронический полисинусит. В связи с неэффективностью предложенной консервативной терапии в январе 2022 г. больной выполнена миринготомия справа и продолжено симптоматическое лечение. В феврале 2022 г. были сделаны септопластика, функциональная верхнечелюстная синусотомия справа с кратковременным улучшением, затем клинические проявления возобновились. В течение года пациентка наблюдалась у отоларинголога амбулаторно: проводили промывание верхнечелюстной пазухи справа и раз в 2-3 месяца антибактериальную терапию. Эффекта от лечения не было, в связи с чем в марте 2023 г. женщина госпитализирована в ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой» УДП РФ с диагнозом «хронический правосторонний гнойно-некротический гемисинусит». При поступлении предъявляла жалобы на гнойные выделения из носа, боль в правой части лица, заложенность правого уха и снижение обоняния. При осмотре: кожные покровы обычной окраски, влажные, тургор сохранен, периферических отеков нет. Дыхание через нос свободное. Число дыханий в минуту – 18. При аускультации везикулярное дыхание. Тоны сердца ясные, ритмичные, шумы не выслушиваются, ритм правильный, частота сердечных сокращений (ЧСС) – 74 в 1 минуту, артериальное давление – 125/80 мм рт. ст. Язык влажный, чистый. Съёмных протезов нет. Десны, мягкое и твёрдое небо и слизистые оболочки ротовой полости чистые, миндалины не изменены. Живот не вздут, мягкий,

доступен глубокой пальпации, безболезненный во всех отделах. Печень не увеличена. Дизурических явлений нет. Менингеальные знаки отсутствуют.

При передней риноскопии и эндоскопии полости носа справа в общем носовом ходе в задних отделах полости носа визуализировали обильное гнойное отделяемое, сухие корки, некротические изменения слизистой оболочки в области сфеноэтмоидального кармана справа (Рис. 1).

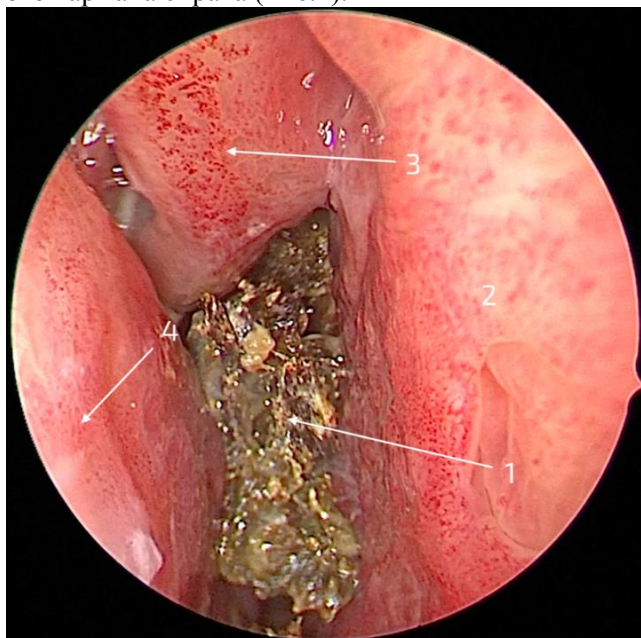


Рис. 1. Эндоскопия полости носа справа, осмотр эндоскопом 0 градусов: 1 – некротические изменения задних отделов полости носа, 2 – перегородка носа, 3 – средняя носовая раковина, 4 – нижняя носовая раковина.

Далее при осмотре: ушная раковина не изменена, наружный слуховой проход широкий, свободный, барабанная перепонка серая, втянута, опознавательные знаки четкие.

На КТ ОНП выявлено субтотальное затемнение верхнечелюстной, решетчатых и клиновидной пазух справа с признаками разряжения клиновидной кости, задних отделов перегородки носа и медиальной стенки верхнечелюстной пазухи (Рис. 2).

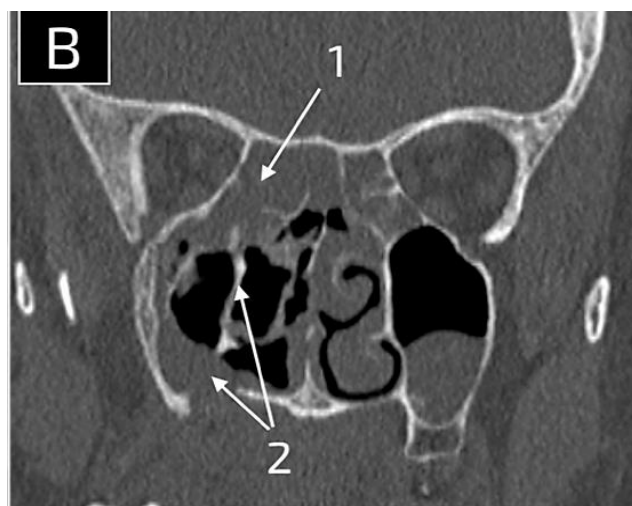
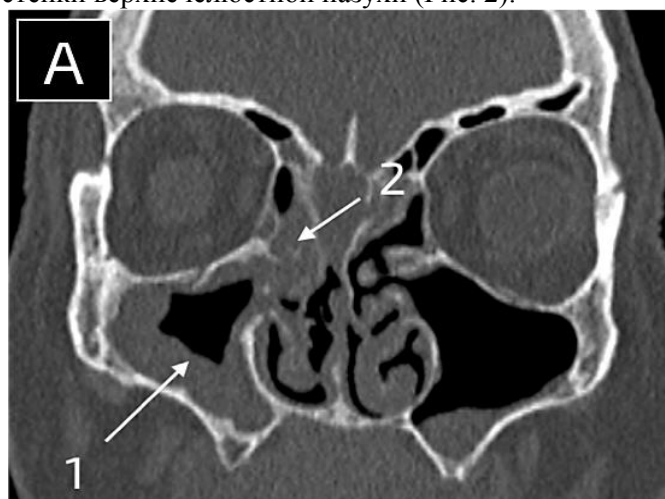


Рис. 2. КТ ОНП перед операцией, корональная проекция. А) срез на уровне передних отделов полости носа, 1 – верхнечелюстная пазуха, 2 – передние отделы решетчатого лабиринта. В) 1 – срез на уровне задних клеток решетчатого лабиринта, 2 – некротические изменения и деструкция медиальной стенки верхнечелюстной пазухи. С) 1 – срез на уровне клиновидной пазухи, визуализируется затемнение клиновидных пазух, 2 – деструктивные изменения тела клиновидной и небной костей. Д) срез на уровне клиновидных пазух – визуализируется разрушенная клиновидная кость.

22.03.23 г. выполнена расширенная эндоскопическая синусотомия справа, включающая удаление визуально некротически пораженных слизистой оболочки и костных структур верхнечелюстной, решетчатой, клиновидной костей, задних отделов перегородки носа (Рис.3).

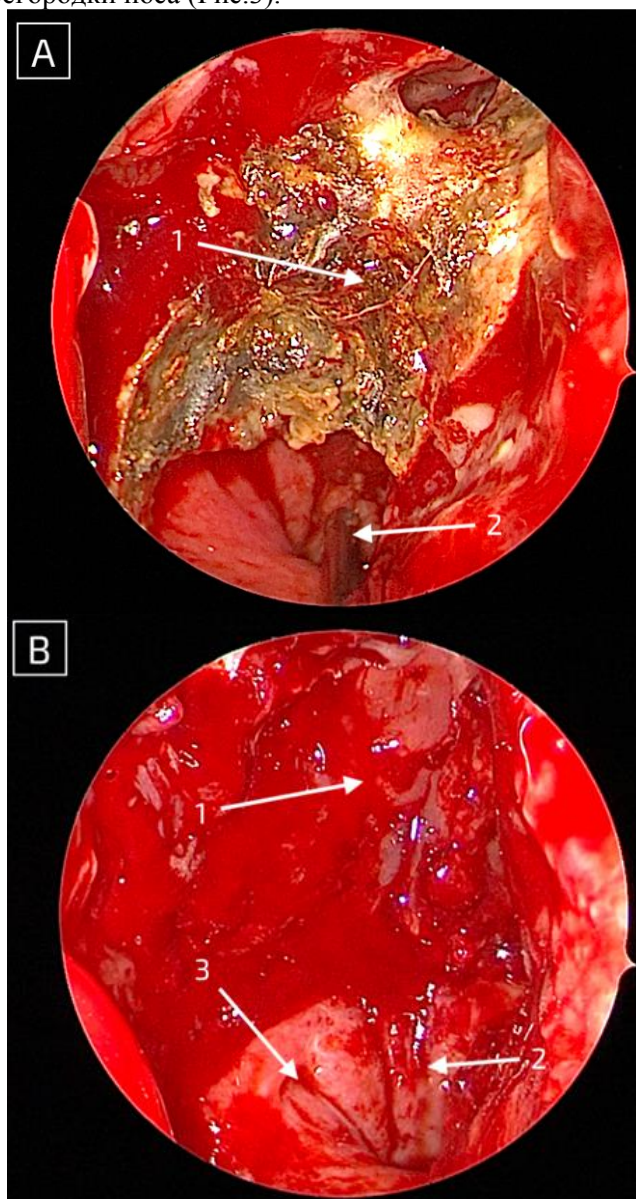


Рис. 3. Интраоперационные эндоскопические изображения правой половины носа, осмотр эндоскопом 0 градусов. А) 1 – визуализируются некротизированные передняя стенка клиновидной пазухи и небная кость, 2 – носоглотка. В) Завершающий вид на операционное поле после удаления измененных тканей: 1 – задняя стенка клиновидных пазух, 2 – носоглотка, 3 – устье слуховой трубы.

Операция и послеоперационный период – без осложнений. В послеоперационном периоде назначены системная антибиотикотерапия и ирригация полости носа антисептическими растворами.

Результаты гистологического исследования послеоперационного материала: визуализированы фрагменты слизистой оболочки с густой лимфоплазмочитарной инфильтрацией, бесструктурные

эозинофильные массы, кристаллоидные структуры, колонии микробных тел; фрагменты костной ткани с тонкими балками, в широких межбалочных пространствах – широкие, волнообразные гифы зигометов. При дополнительной окраске по методу PAS обнаружены гифы с слабopоложительной окраской. При посеве культура микромицетов не выделена.

Пациентка была консультирована микологами ГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, назначена антимикотическая терапия: позаконазол – 400 мг внутрь 2 раза в сутки, в качестве альтернативного препарата предложен изавуконазол. По данным эндоскопии и КТ ОНП, на фоне лечения сохранялся выраженный отек слизистой оболочки верхнечелюстной пазухи (Рис. 4).

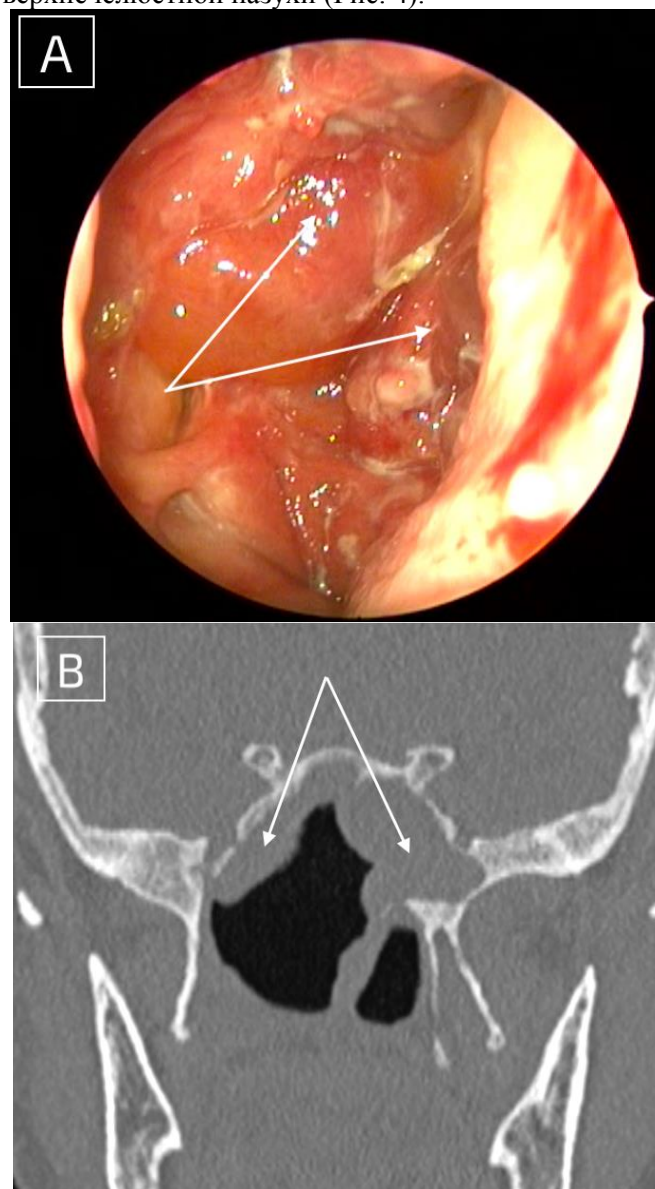


Рис. 4. Эндоскопия и КТ ОНП через 4 недели после хирургического вмешательства и антимикотической терапии. А) эндоскопия правой половины носа, визуализируется выраженный отек задней стенки клиновидных пазух (стрелки). В) корональный срез КТ на уровне клиновидных пазух, стрелка указывают на выраженное утолщение слизистой оболочки.

В связи с этим позаконазол был заменен на изавуконазол в стандартных дозах (200 мг 3 раза в сутки первые 2 дня, далее – по 200 мг в сутки). На фоне лечения отмечали положительную динамику: клинически жалобы со стороны носа купировались, на эндоскопии полости носа наблюдали восстановление слизистой оболочки в зоне операции, патологическое отделяемое отсутствовало.

На контрольной КТ ОНП выявлена значительная положительная динамика в виде восстановления воздушности оперированных пазух и отсутствия прогрессирования констно-деструктивных изменений (Рис. 5). Общая продолжительность антимикотической терапии составила 78 дней.

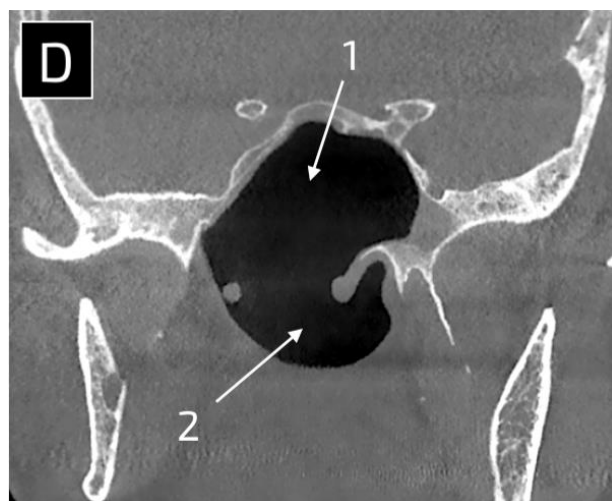
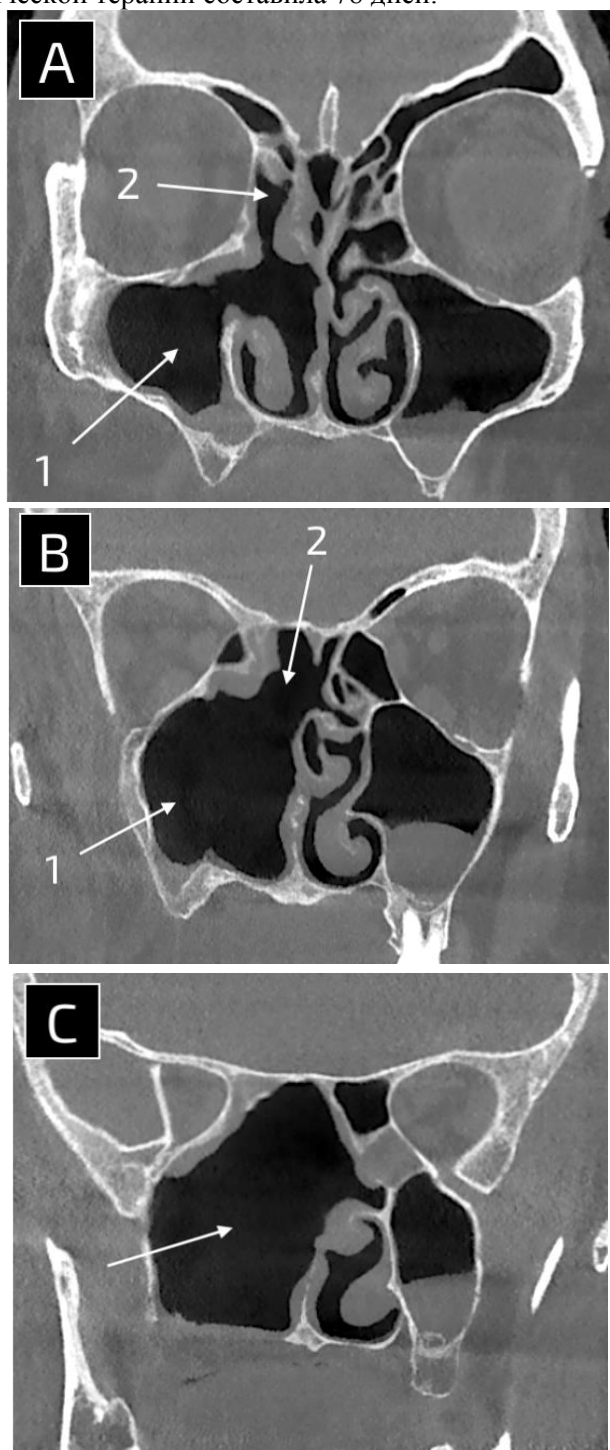


Рис. 5. КТ ОНП через 7 месяцев после хирургического вмешательства. А) корональный срез на уровне передних отделов полости носа, визуализируются воздушные верхнечелюстная пазуха (1) и передние отделы решетчатого лабиринта (2). В) срез на уровне средних отделов полости носа, визуализируется единая воздушная полость между верхнечелюстной пазухой (1) и решетчатым лабиринтом (2). С) срез на уровне задних отделов полости носа, визуализируется воздушная послеоперационная полость (стрелка) без признаков воспаления. D) срез на уровне клиновидной кости, визуализируется воздушная послеоперационная полость.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2, стала новым фактором риска, ассоциированным с инвазивными микозами [3, 6]. Инвазивный кандидоз и аспергиллез традиционно являются наиболее частыми микотическими осложнениями у иммунокомпрометированных больных, особенно длительно пребывающих в отделениях реанимации и интенсивной терапии. При этом COVID-ассоциированный мукормикоз (САМ) в РФ выявлялся почти с такой же частотой, как и данные инфекции [2, 7].

За последние 3 года значительно возросло количество публикаций, посвященных микотическим осложнениям у больных COVID-19, во всем мире [8]. Наибольшее число случаев заболевания зарегистрировано в Индии. По состоянию на 28 мая 2021 г. обнаружено не менее 14 872 случаев САМ, при этом самая высокая заболеваемость была в штате Гуджарат, (около 3726 случаев), затем следовал штат Махараштра [9, 10]. Похожая тенденция отмечена при ретроспективном исследовании 2826 пациентов с риноорбитально-церебральным мукормикозом с COVID-19 [11]. В других странах также увеличилось число выявленных случаев заболевания. Например, в Египте острый инвазивный грибковый риносинусит в 2020 г. диагностировали у 29 человек, в то время как в 2017 г. – только у 9 [12]. К 2023 г. об участившихся случаях заболевания сообщали меди-

ки и ученые из Ирана, Франции, Германии, Греции, Турции и других стран [13].

Почти 90% всех случаев САМ приходится на Индию, что может быть обусловлено высокой численностью населения, распространенностью диабета и особенностями климата [14].

Возбудители мукомикоза – грибы *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp., *Mucor* spp., *Lichtheimia* spp., *Apophysomyces* spp., *Cunninghamella* spp. и *Saksenaee* spp. встречаются повсеместно, но наиболее высокое содержание спор микромицетов отмечают в странах с теплым и влажным климатом [15]. Распределение видов грибов варьирует в разных географических регионах. Например, *Rhizopus arrhizus* наиболее распространен в Индии [16] и Франции, а *Cunninghamella* spp. – в Испании [17]. У наблюдаемой нами пациентки возбудитель мукомикоза не был выделен, несмотря на значительное поражение тканей, выявленное интраоперационно.

Анализ фоновых заболеваний показал, что у 80% больных САМ имели место традиционные факторы риска, такие как применение глюкокортикостероидов в высоких дозах, кетоацидоз и нейтропения [18-21]. У 11-14% пациентов данные факторы риска не обнаружены [7]. Можно предположить, что меры, соблюдаемые обычными людьми во время пандемии COVID-19, обеспечивали влажную местную среду, способствующую росту грибов в полости рта/носа. В этот период были распространены кислородная поддержка у стационарных больных, паровые ингаляции при амбулаторном лечении, а также длительное использование маски [16].

Отмечено, что продолжительность применения маски, независимо от ее типа (хирургическая или тканевая), была связана с риском САМ по отношению к контрольной группе пациентов с COVID-19. Ношение тканевой маски, в сравнении с хирургической, даже менее двух часов предрасполагало к развитию САМ. Удержание влаги, повторное использование и плохая фильтрация повышали риск заражения данным заболеванием [22]. Хотя трудно доказать роль каждого из этих факторов в отдельности, очевидно, что экспоненциальный рост оппортунистических инфекций стал результатом некоторых из этих ранее недооцененных факторов риска, включая сам SARS-CoV-2.

Согласно данным зарубежных исследователей, клинические проявления мукомикоза развивались в среднем на 22 день после диагностики новой коронавирусной инфекции [3, 13], преимущественно – риноцеребральный мукомикоз [23, 24].

У наблюдаемой нами больной первые признаки мукомикоза появились сразу после выписки из инфекционного стационара. Синусит стал хроническим и не поддавался стандартным методам лечения – антибактериальной терапии и функциональному эндо-

скопическому вмешательству на ОНП. Развитие устойчивой формы синусита, новая коронавирусная инфекция в анамнезе и данные КТ ОНП позволили предположить наличие инвазивного микоза, что послужило показанием к повторной эндоскопической операции на ОНП с радикальным удалением пораженных тканей. Окончательный диагноз был поставлен на основании гистологического исследования послеоперационного материала с использованием специфических окрасок для выявления микромицетов. В связи с этим была незамедлительно начата системная антимикотическая терапия, что в итоге завершилось выздоровлением пациента. Эти данные свидетельствуют о необходимости у лиц с подозрением на синоназальный мукомикоз раннего проведения расширенного эндоскопического вмешательства на ОНП с радикальным удалением некротических тканей и обязательным выполнением гистологического исследования с окраской ПАС и/или Грокотта рутинно.

Утвержденные в 2019 г. алгоритмы лечения мукомикоза ЕСММ-MSG включают сочетание хирургического метода с максимально тщательным удалением пораженных тканей и антимикотической терапией [3, 4]. В настоящее время для лечения мукомикоза у пациентов, перенесших новую коронавирусную инфекцию, применяют следующие антимикотические препараты: липосомальный амфотерицин В (АМВ) или липидный комплекс АМВ, позаконазол и изавуконазол [4]. Хирургическое вмешательство должно быть расширенным, с применением эндоскопической техники и полным удалением всех визуально измененных тканей. Несмотря на терапию, выживаемость больных мукомикозом остается на достаточно низком уровне (14-71%) и напрямую зависит от распространенности инфекционного процесса, сроков начала лечения и объема хирургического вмешательства [25-26].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мукомикоз, ассоциированный с COVID-19, – это тяжелое осложнение, связанное с поражением прежде всего околоносовых пазух, орбиты и головного мозга. Микологические диагностические тесты необходимо выполнять всем пациентам, перенесшим коронавирусную инфекцию, с клиническими признаками синусита, особенно без положительного клинического эффекта от проводимой антибактериальной терапии. Сочетание современных хирургических вмешательств с применением эндоскопической техники и радикальным удалением пораженных тканей с современной антифунгальной терапией позволяет значительно улучшить выживаемость у данной когорты пациентов.

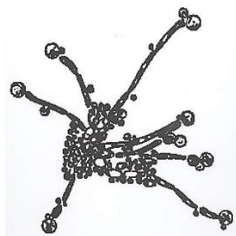
ЛИТЕРАТУРА

1. Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Учеваткина А.Е. и др. Особенности взаимодействия клеток иммунной системы с грибами порядка *Mucorales* (обзор литературы). Проблемы медицинской микологии. 2020; 22 (2): 3-11. [Frolova E.V., Filippova L.V., Uchevatkina A.E., et al. Features of interaction of cells immune system with *Mucorales* (literature review). Problems in Medical Mycology. 2020; 22 (2): 3-11. (In Russ.)]. doi:10.24412/1999-6780-2020-2-3-11
2. Klimko N.N., Kozlova Y.I., Khostelidi S.N., et al. The burden of serious fungal diseases in Russia. *Mycoses*. 2015; 58 (Suppl 5): 58-62. doi: 10.1111/myc.12388
3. Хостелиди С.Н. Тяжелые грибковые инфекции, вызванные редкими возбудителями: дисс... на соискание ученой степени доктора медицинских наук 2023: 314 с. [Khostelidi S.N. Severe fungal infections caused by rare pathogens: dissertation for the degree of Doctor of Medical Sciences 2023: 314 p. (In Russ)].
4. Cornely O.A., Alastruey-Izquierdo A., Arenz D., et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect. Dis.* 2019; 19 (12): e405-e421. doi:10.1016/S1473-3099(19)30312-3
5. Donnelly J.P., Chen S.C., Kauffman C.A., et al. Revision and update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71 (6): 1367-1376. doi.org/10.1093/cid/ciz1008
6. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 10. 08.02.2021. [Temporary guidelines "Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)". Version 10. 08.02.2021 (In Russ.)]. <https://static-0.minzdrav.gov.ru>
7. Хостелиди С.Н., Козлова О.П., Шадринова О.В. и др. Инвазивные микозы в отделениях реанимации и интенсивной терапии (анализ данных регистров и обзор литературы). Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (1): 3-21. [Khostelidi S.N., Kozlova O.P., Shadrivova O.V., et al. Invasive mycoses in intensive care units (analysis of registry data and literature review). Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (1): 3-21. (In Russ.)]. doi:10.24412/1999-6780-2024-1-3-21
8. Kumar D., Ahmad F., Kumar A., et al. Risk factors, clinical manifestations, and outcomes of COVID-19-associated mucormycosis and other opportunistic fungal infections. *Cureus*. 2023; 15 (9): e46289. doi: 10.7759/cureus.46289
9. Moorthy A., Gaikwad R., Krishna S., et al. SARS-CoV-2, uncontrolled diabetes and corticosteroids – an unholy trinity in invasive fungal infections of the maxillofacial region? A retrospective, multi-centric analysis. *J. Maxillofac. Oral. Surg.* 2021; 20 (3):418-425. doi: 10.1007/s12663-021-01532-1
10. Raut A., Huy N.T. Rising incidence of mucormycosis in patients with COVID-19: another challenge for India amidst the second wave? *Lancet Respir. Med.* 2021; 9 (8): e77. doi: 10.1016/S2213-2600(21)00265-4
11. Sen M., Honavar S.G., Bansal R., et al. Epidemiology, clinical profile, management, and outcome of COVID-19-associated rhino-orbital-cerebral mucormycosis in 2826 patients in India – Collaborative OPAI-IJO Study on Mucormycosis in COVID-19 (COSMIC). Report 1. *Indian J. Ophthalmol.* 2021; 69 (7): 1670-1692. doi: 10.4103/ij.o.IJO\_1565\_21
12. Ismaiel W.F., Abdelazim M.H., Eldsoky I., et al. The impact of COVID-19 outbreak on the incidence of acute invasive fungal rhinosinusitis. *Am. J. Otolaryngol.* 2021; 42 (6): 103080. doi: 10.1016/j.amjoto.2021.103080
13. Özbek L., Topçu U., Manay M., et al. COVID-19-associated mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of 958 cases. *Clin. Microbiol. Infect.* 2023; 29 (6): 722-731. doi: 10.1016/j.cmi.2023.03.008
14. Chakrabarti A., Singh R. Mucormycosis in India: unique features. *Mycoses*. 2014; 57 (3): 85-90. doi: 10.1111/myc.12243
15. Prakash H., Ghosh A.K., Rudramurthy S.M., et al. The environmental source of emerging *Apophysomyces variabilis* infection in India. *Med. Mycol.* 2016; 54: 567-575. doi: 10.1093/mmy/myw014
16. Prakash H., Skiada A., Paul R.A., et al. Connecting the dots: interplay of pathogenic mechanisms between COVID-19 disease and mucormycosis. *J. Fungi (Basel)*. 2021; 7 (8): 616. doi:10.3390/jof7080616
17. Rudramurthy S.M., Hoenigl M., Meis J.F., et al. ECMM/ISHAM recommendations for clinical management of COVID-19 associated mucormycosis in low- and middle-income countries. *Mycoses*. 2021; 64 (9): 1028-1037. doi:10.1111/myc.13335
18. Prakash H., Singh S., Rudramurthy S.M., et al. An aero mycological analysis of mucormycetes in indoor and outdoor environments of northern India. *Med. Mycol.* 2020; 58 (1):118-123. doi: 10.1093/mmy/myz031
19. Garg D., Muthu V., Sehgal I.S., et al. Coronavirus disease (Covid-19) associated mucormycosis (CAM): case report and systematic review of literature. *Mycopathologia*. 2021; 5: 1-10. doi: 10.1007/s11046-021-00528-2
20. Waizel-Haiat S., Guerrero-Paz J.A., Sanchez-Hurtado L., et al. A case of fatal rhino-orbital mucormycosis associated with new onset diabetic ketoacidosis and COVID-19. *Cureus*. 2021; 13 (2): e13163. doi: 10.7759/cureus

21. *Clinical management* protocol for COVID-19 (in Adults). Government of India Ministry of Health and Family Welfare. Ver. 6. 24.05.21. <https://www.mohfw.gov.in/pdf/UpdatedDetailedClinicalManagementProtocolforCOVID19adultsdated24052021.pdf>
22. *MacIntyre C.R., Seale H., Dung T.C., et al.* A cluster randomised trial of cloth masks compared with medical masks in healthcare workers. *BMJ Open.* 2015; 5 (4): e006577. doi: 10.1136/bmjopen-2014-006577
23. *Werthman-Ehrenreich A.* Mucormycosis with orbital compartment syndrome in a patient with COVID-19. *Am. J. Emerg. Med.* 2021; 42: 264.e5-264.e8. doi: 10.1016/j.ajem.2020.09.03224
24. *Mekonnen Z.K., Ashraf D.C., Jankowski T., et al.* Acute invasive rhino-orbital mucormycosis in a patient with COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome. *Ophthalmic Plast. Reconstr. Surg.* 2021; 37 (2): e40-e80. doi: 10.1097/IOP.0000000000001889
25. *Zurl C., Hoenigl M., Schulz E., et al.* Autopsy proven pulmonary mucormycosis due to *Rhizopus microsporus* in a critically ill COVID-19 patient with underlying hematological malignancy. *J. Fungi (Basel).* 2021; 7 (2): 88. doi: 10.3390/jof7020088
26. *Karimi-Galougahi M., Arastou S., Haseli S.* Fulminant mucormycosis complicating coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Int. Forum Allergy Rhinol.* 2021; 11 (6): 1029-1030. doi: 10.1002/alr.22785

*Поступила в редакцию журнала 14.09.24*

*Принята к печати 25.09.24*



*Для цитирования:* Тен М., Подгайнова А.А., Черненко Д.О., Десятник Е.А., Митрофанов В.С., Игнатъева С.М., Фролова Е.В., Шурпицкая О.А., Борзова Ю.В., Хостелиди С.Н., Соболев А.В. Аллергический бронхолегочный аспергиллёз (описание клинического случая). Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (3): 47-55. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-47-55

*For citation:* Ten M., Podgainova A.A., Chernenko D.O., Desyatnik E.A., Mitrofanov V.S., Ignatieva S.G., Frolova E.A., Shurpitskaya O.A., Borzova Y.V., Khostelidi S.N., Sobolev A.V. Allergic bronchopulmonary aspergillosis (description of the clinical case). Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (3): 47-55. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-47-55

## АЛЛЕРГИЧЕСКИЙ БРОНХОЛЕГОЧНЫЙ АСПЕРГИЛЛЁЗ (ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ)

**Тен М. (аспирант)\*, Подгайнова А.А. (аспирант), Черненко Д.О. (clin. ординатор), Десятник Е.А. (врач-миколог), Митрофанов В.С. (зав. отделением), Игнатъева С.М. (в.н.с.), Фролова Е.В. (зав. лаб.), Шурпицкая О.А. (зав. лаб.), Борзова Ю.В. (зав. клиникой), Хостелиди С.Н. (доцент), Соболев А.В. (профессор кафедры)**

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

*Аллергический бронхолегочный аспергиллёз (АБЛА) – это заболевание органов дыхания, развивающееся в результате реакции гиперчувствительности в ответ на колонизацию дыхательных путей *Aspergillus spp.* и другими мицелиальными грибами, преимущественно у пациентов с бронхиальной астмой и муковисцидозом.*

*В статье представлен клинический случай аллергического бронхолегочного аспергиллёза у больной бронхиальной астмой, приведен анализ литературных данных, посвященных проблеме АБЛА, а также рассмотрены основные методы диагностики и лечения заболевания согласно международным рекомендациям.*

**Ключевые слова:** *Aspergillus spp.*, *Aspergillus fumigatus*, аллергический бронхолегочный аспергиллёз (АБЛА), аллергический бронхолегочный микоз, бронхиальная астма, муковисцидоз

\* Контактное лицо: Тен Мён Су,  
e-mail: dr.allergeek@gmail.com

## ALLERGIC BRONCHOPULMONARY ASPERGILLOSIS (DESCRIPTION OF THE CLINICAL CASE)

**Ten M. (postgraduate student), Podgainova A.A. (postgraduate student), Chernenko D.O. (clinical resident), Desyatnik E.A. (mycologist), Mitrofanov V.S. (head of the department), Ignatieva S.M. (leading scientific researcher), Frolova E.V. (head of the laboratory), Shurpitskaya O.A. (head of the laboratory), Borzova Yu.V. (head of the clinic), Khostelidi S.N. (associate professor), Sobolev A.V. (professor of the department)**

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology; Kashkin Research Institute of Medical Mycology), St. Petersburg, Russia

*Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) is a respiratory disease that develops as a result of hypersensitivity reactions in response to colonization of the respiratory tract by *Aspergillus spp.* and other mycelial fungi, mainly in patients with bronchial asthma and cystic fibrosis.*

*The article presents a clinical case of allergic bronchopulmonary aspergillosis in a patient with bronchial asthma, analyzes the literature data on the problem of ABPA, and considers the main methods of diagnosis and treatment of the disease in accordance with international recommendations.*

**Key words:** *Aspergillus spp.*, *Aspergillus fumigatus*, allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), allergic bronchopulmonary mycosis, bronchial asthma, cystic fibrosis

## ВВЕДЕНИЕ

Респираторные заболевания, вызванные грибами, в настоящее время классифицируют как инвазивные, неинвазивные или аллергические [1]. Аллергический респираторный микоз представляет собой наиболее тяжелое проявление грибковой аллергии [2]. Наиболее распространенной причиной, вызывающей аллергический бронхолегочный микоз, являются грибы *Aspergillus fumigatus*. Традиционно микозы легких, ассоциированные с реакциями гипер-



чувствительности в бронхопульмональной системе, обозначаются как аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА), если возбудителем является *A. fumigatus*, и аллергический бронхолегочный микоз (АБПМ), если этиопатогенами являются микромицеты, отличные от *Aspergillus* spp. [2]. АБЛА обычно развивается у пациентов с бронхиальной астмой (БА) и муковисцидозом (МВ), осложняя течение основного заболевания.

Число больных с тяжелой бронхиальной астмой прогрессивно увеличивается во всем мире. По данным GINA 2024 г. (Global Initiative for Asthma), число пациентов с БА на 2019 г. составило 262 млн. человек, а смертность достигает до 1000 человек в день [3]. Согласно Hekking P.-P.W. и соавторам, распространенность тяжелой формы бронхиальной астмы составляет 3,6% среди больных БА, что эквивалентно 10,4 человек на 10000 взрослого населения [4].

Распространенность АБЛА у пациентов с БА персистирующего течения составляет около 1-2%, у больных МВ – от 2 до 9% [5-8]. Наиболее высокую распространенность заболевания наблюдают среди госпитализированных лиц с тяжелым течением БА [6].

Сенсибилизация к грибам рода *Aspergillus* обусловлена наличием реакций гиперчувствительности I и III типов к антигену *Aspergillus*, при кожной пробе или повышенном уровне специфического иммуноглобулина E (IgE) к *A. fumigatus* [9, 10]. Распространенность сенсибилизации к *Aspergillus* spp. у больных БА остается до конца неясной. Согласно общенациональному исследованию в США, в котором рутинно обследовали всех госпитализированных пациентов и выявляли уровень специфического IgE к *A. fumigatus*, 6,4% населения были сенсибилизированы к микромицетам данного вида [11, 12]. В 2013 г. D. Denning с коллегами определили, что вероятное число больных АБЛА составляет примерно 5 млн. человек среди общего числа лиц с бронхиальной астмой (193 млн. человек), предполагая, что распространенность АБЛА составляет 2,5% из общего расчета [13-15]. Известно, что заболеваемость АБЛА существенно различается в зависимости от региона мира: так, в США и Канаде, она составила 2%, по данным исследования, куда входили пациенты с МВ [15]. В то же время нельзя не отметить существенный рост распространенности АБЛА в странах Европы. Согласно данным регистра пациентов с муковисцидозом, включающего более 12000 больных из 224 центров стран, заболеваемость АБЛА в Швеции составила 7,8%, что является минимальным значением, и максимальным – 14% в Бельгии [15]. Наиболее часто АБЛА встречается в Индии. Согласно Savio J. и соавторам, распространенность АБЛА у пациентов с тяжелой астмой на 2019 г. составила 70% (35 случаев доказанного АБЛА у 50 обследованных с тяжелой астмой) [16]. В России расчетное число больных

АБЛА на 2014 г. составляло около 175082 человек, с тяжелой БА с микогенной сенсибилизацией – 231000 человек [17]. В 2023 г. Козлова Я.И. с коллегами показали, что в Российской Федерации заболеваемость АБЛА среди пациентов с аллергической БА составляет 8,1%. Среди больных АБЛА преобладали женщины (64%) 40 лет и старше [18].

В статье проведен анализ публикаций, посвященных аллергическому бронхолегочному аспергиллезу, на сентябрь 2024 г., а также представлен клинический случай динамического наблюдения пациента.

**Цель работы:** описать клинический случай длительного наблюдения пациентки с АБЛА для демонстрации алгоритмов диагностического поиска и возможностей терапии, а также проанализировать опубликованные данные для определения распространенности, этиологии, клинических проявлений и методов лечения этого заболевания у лиц с бронхиальной астмой.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В статье представлен клинический случай аллергического бронхолегочного аспергиллеза у пациентки с бронхиальной астмой. Для постановки диагноза «аллергический бронхолегочный аспергиллез» использовали критерии ISHAM-ABPA (International Society for Human and Animal Mycology-Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis). Авторы провели анализ публикаций, посвященных проблеме АБЛА. Использовали поисковые базы PubMed (на сентябрь 2024 г.), ClinicalKey (на сентябрь 2024 г.) и e-library (на сентябрь 2024 г.). Поиск информации осуществляли с помощью следующих ключевых слов: гиперчувствительность к *Aspergillus*, аллергический бронхолегочный аспергиллез, антимикотическая терапия, грибковая аллергия, плесневая аллергия, *Aspergillus* spp., *Aspergillus fumigatus*, allergic bronchopulmonary aspergillosis, ABPA, allergic bronchopulmonary mycosis, bronchial asthma, cystic fibrosis.

### Клиническое наблюдение

Пациентка Б., 62 лет, госпитализирована в микологическую клинику СЗГМУ им. И.И. Мечникова в июне 2022 г.

Из анамнеза известно, что в 1993 г. пациентке был установлен диагноз: бронхиальная астма, смешанная, легкой степени тяжести, контролируемая. Ежегодно отмечала ухудшение состояния в виде появления одышки, повышения температуры тела, увеличения количества отходящей мокроты. Более 15 лет наблюдалась и лечилась у терапевта по месту жительства. В 2021 г. при очередном обострении в виде подъема температуры тела, общего недомогания, эпизодов затруднения дыхания и отхаркивания мокроты зелено-коричневатого цвета была госпита-

лизирована на дневной стационар поликлиники по месту жительства. Проведена терапия: преднизолон – 30 мг/мл внутривенно, эуфиллин 2,4% внутривенно, с незначительным положительным эффектом в виде уменьшения интенсивности симптомов, нормализации температуры тела.

С октября 2021 г. по февраль 2022 г. пациентка отмечала ухудшение состояния, заключающегося в увеличении выраженности общей слабости, периодическом подъеме температуры до 37,4 °С, одышке при физической нагрузке, в связи с чем в феврале 2022 г. самостоятельно прошла процедуру исследования методом компьютерной томографии органов грудной клетки (КТ ОГК).

На КТ ОГК от 03.02.22 г.: очаговых и инфильтративных изменений в паренхиме легких не выявлено; фиброателектаз латеральных отделов S5 левого легкого; данных за лимфаденопатию не получено.

В дальнейшем наблюдалась у пульмонолога с диагнозом: бронхиальная астма, смешанная, частично контролируемая, фаза обострения; хронический бронхит с вторичными бронхоэктазами. Получала терапию: тиотропия бромид/олодотерол – 2,5/2,5 мкг по 2 дозы утром, будесонид – 160 мг/формотерол – 4,5 по потребности. При посеве мокроты в феврале 2022 г. выделены грибы *Aspergillus flavus*, тест IgG к *Aspergillus* – положительный (количественный показатель неизвестен). Был заподозрен аллергический бронхолегочный аспергиллез, в связи с чем пациентка госпитализирована в микологическую клинику для дообследования и решения вопроса о необходимости применения антимикотических препаратов.

**При осмотре в микологической клинике** состояние больной удовлетворительное, сознание ясное, кожные покровы обычной окраски, нормальной влажности, периферические лимфатические лимфоузлы не пальпируются, частота дыхательных движений (ЧДД) – 16 в минуту, уровень насыщения крови кислородом (SpO<sub>2</sub>) – 96%, при аускультации легких дыхание жесткое, сухие свистящие хрипы по всем полям, аускультативно тоны сердца без особенностей, частота сердечных сокращений (ЧСС) – 78 уд/мин., артериальное давление (АД) на обеих руках – 126/82 мм рт. ст., живот при пальпации мягкий, безболезненный, физиологические отправления в норме.

Результаты иммунологического обследования: уровень общего IgE – 979 ед/мл; специфический IgE к грибам *Aspergillus* – 3,37 ед/мл (положительный); IgG к *A. fumigatus* – 1:1600 (норма – до 1:100). При микологическом обследовании: в промывной жидкости из бронхов микроскопически обнаружен истинный мицелий, при посеве – рост *Aspergillus niger*. По данным спирометрии: незначительное снижение жизненной ёмкости лёгких (ЖЕЛ), умеренные нару-

шения бронхиальной проходимости; проба с атропентом – положительная.

При обследовании на КТ ОГП (Рис. 1): картина двустороннего бронхолита, ателектаза S5 правого легкого и субсегментарного ателектаза S4 левого легкого; немногочисленные солидные очаги в обоих легких, вероятно, фиброзные; единичный увеличенный правый трахеобронхиальный лимфоузел. При сравнении с КТ от 03.02.22 г. отмечается появление ателектазов, бронхолита и увеличение единичного лимфоузла, в остальном – без существенной динамики.



Рис. 1. КТ органов грудной полости (июнь 2022 г.): картина двустороннего бронхолита, ателектаза S5 правого легкого и субсегментарного ателектаза S4 левого легкого; немногочисленные солидные очаги в обоих легких.

По результатам обследования был установлен диагноз: аллергический бронхолегочный аспергиллез, стадия обострения, согласно критериям ISHAM. Назначена антимикотическая терапия вориконазолом (200 мг 2 раза в день) в течение 3 месяцев, с последующим наблюдением для оценки эффективности лечения. Рекомендована базисная терапия: будесонид – 160 мг/формотерол – 4,5 по 2 дозы утром и вечером, а также дополнительно по потребности. Тиотропия бромид/олодотерол – 2,5/2,5 мкг был отменен.

В сентябре 2022 г. при контрольном обследовании в микологической клинике на фоне проведенного лечения пациентка отмечала улучшение самочувствия, по данным валидированного опросника Asthma Controll Test (ACT) – 25 баллов.

При иммунологическом обследовании уровень общего IgE снизился почти в 2 раза (468 ед/мл). Уровень специфического IgE к *Aspergillus* составил 4,6 ед/мл, Ig G в сыворотке крови к *A. fumigatus* – 1:6400. Тест на галактоманнан в промывной жидкости из бронхов – отрицательный (индекс оптической плотности – 0,26).

Микологическое обследование: в промывной жидкости из бронхов при микроскопии элементов

микромикетов не обнаружено, при посеве – грибы не выявлены.

По данным спирометрии: ЖЕЛ в пределах нормы, бронхиальная проходимость на уровне условной нормы; проба с атровентом – отрицательная. На КТ ОГП: картина бронхолита S2, S4 справа, участка пневмофиброза S5 правого легкого и дисковидного ателектаза S4 левого легкого; немногочисленные солидные очаги в обоих легких, вероятно, фиброзные. При сравнении с КТ от 08.06.22 г. наблюдали отсутствие бронхолита в левом лёгком; уменьшение выраженности картины бронхолита в S4 справа, усиление её выраженности в S2; частичное разрешение ателектазов S5 справа и S4 слева. По результатам контрольного обследования антимикотическая терапия была отменена, базисная терапия продолжена в прежнем объеме.

Пациентка наблюдается в микологической клинике СЗГМУ им. И.И. Мечникова по настоящее время для контроля течения заболевания.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Аллергический бронхолегочный аспергиллез был впервые описан Hinson K.F. и соавторами как аспергиллез, характеризующийся бронхитом, эозинофилией, бронхоэктазами и/или слизистыми пробками, ассоциированными с *A. fumigatus* [13]. В последующем исследователи выяснили, что патогенез АБЛА связан с реакциями гиперчувствительности I и III типов к вдыхаемым и образующим колонии в бронхах микромикетам [15, 19]. Помимо *A. fumigatus*, другие виды грибов *Aspergillus*, такие как *A. flavus* и *A. niger*, а также другие виды нитчатых микромикетов, такие как *Penicillium* и *Schizophyllum commune*, могут вызывать сходные клинические проявления, называемые аллергическим бронхолегочным микозом (АБЛМ) [20,21].

В 1977 г. Rosenberg M. с коллегами были впервые предложены диагностические критерии АБЛА, которые включали в себя 7 основных критериев: астма; эозинофилия периферической крови; положительные кожные тесты с аспергиллезным антигеном; наличие преципитирующих антител к *A. fumigatus*; повышенный уровень общего IgE; летучие или фиксированные уплотнения легочной ткани при рентгенологическом исследовании; бронхоэктазы. А также 3 дополнительных критерия: выделение культуры *A. fumigatus* из мокроты или промывных вод бронхов, отделение мокроты, содержащей коричневаточерные включения, «слепки» бронхов и феномен Артюса к антигену *A. fumigatus* [22].

Greenberger P.A. и Patterson R. в 1988 г. ввели дополнительный критерий: определение специфических IgE и IgG к *A. fumigatus* с пограничным контролем общего IgE >2500 нг/мл (>1042 МЕ/мл) [19]. Несколько позже было рекомендовано использовать

значение <1000 нг/мл (<417 МЕ/мл) в качестве клинически значимого для диагностики АБЛА [15, 21].

В 2003 г. были предложены критерии АБЛА у больных муковисцидозом, включающие в себя: 1) высокий уровень общего IgE >1000 МЕ/мл (2400 нг/мл), если пациент не получает системные глюкокортикостероиды (ГКС); 2) положительные немедленные кожные реакции на *Aspergillus* или специфические IgE к *A. fumigatus*; 3) преципитирующие антитела или IgG к *A. fumigatus*, выявленные *in vitro*; 4) типичные патологические изменения на рентгенограмме или КТ (инфильтраты, слизистые пробки или бронхоэктазы) [15, 23].

В 2013 г. Agarwal R. и соавторы изучили чувствительность комплексного определения диагностических критериев, состоящих из наличия специфических IgE к *A. fumigatus* и 7 основных критериев Rosenberg-Patterson, и пришли к выводу, что только у 39% обследуемых пациентов отмечается 7 из 8 критериев [24]. В общенациональном исследовании в Японии из 148 пациентов с установленным АБЛА 22% не имели в анамнезе БА и МВ, являющиеся необходимым критерием для постановки диагноза [25, 26]. Принимая во внимание сложности дифференциальной диагностики, было предложено выделить общую концепцию аллергического грибкового заболевания дыхательных путей (АГЗДП), включающего тяжелую астму с микогенной сенсibilизацией и АБЛА [27].

Основываясь на вышеперечисленных данных, в 2013 г. международным обществом ISHAM были рекомендованы новые критерии диагностики АБЛА, подразумевающие наличие БА и МВ как факторов риска в сочетании с большими критериями (не менее 2): 1) положительная кожная проба или повышенный уровень специфических IgE к *A. fumigatus*; 2) уровень общего IgE >1000 МЕ/мл (2400 нг/мл); и малыми критериями: 1) наличие преципитирующих или IgG к *A. fumigatus* в сыворотке крови; 2) рентгенологические признаки АБЛА («летучие инфильтраты», «симптом трамвайных рельсов», бронхоэктазы, плеврорегочный фиброз); 3) эозинофилия в периферической крови >500 кл/мкл [2, 15].

Диагностические критерии, предложенные ISHAM в 2013 г., широко использовались по всему миру для диагностики АБЛА, однако обновленные данные и проведенные почти за десятилетие новые исследования заставили ученых пересмотреть критерии [28].

Таким образом, в 2024 г. рабочая группа ISHAM-АВРА представила модернизированные критерии диагностики АБЛА (табл.) [28].

Таблица 1

**Пересмотренные критерии консенсуса рабочей группы Международного общества микологии человека и животных (ISHAM) по диагностике аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА)**

1. Факторы риска (астма, муковисцидоз, хроническая обструктивная болезнь легких, бронхоэктазы) или сходная клинико-радиологическая картина.
2. <b>Главные критерии:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• специфические Ig E к <i>A. fumigatus</i> <math>\geq 0.35</math> kUAl/;</li> <li>• уровень общего Ig E <math>\geq 500</math> МЕ/мл.</li> </ul>
3. <b>Дополнительные критерии (любые 2):</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• наличие Ig G к <i>A. fumigatus</i>;</li> <li>• повышенный уровень эозинофилов периферической крови <math>\geq 500</math> кл/мкл;</li> <li>• КТ-признаки (бронхоэктазы, мукоидные пробки, слизь с высоким уровнем затухания КТ-сигнала (высокоаттенуирующая слизь)) или «летучие инфильтраты» на рентгенограмме.</li> </ul>
<b>Важно учитывать:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• отхаркивание слизистых пробок и слепков бронхов, синдром «указательного пальца» и летучие инфильтраты на рентгенограмме, пневмоторакс;</li> <li>• возможно проведение кожного прик-тестирования с аспергиллезным антигеном при невозможности выполнения специфического Ig E к <i>A. fumigatus</i>;</li> <li>• допускается значение уровня общего IgE менее 500 при наличии всех остальных критериев;</li> <li>• IgG к <i>A. fumigatus</i> может быть определен иммунохроматографическим или иммуноферментным анализом;</li> <li>• слизь с высоким уровнем затухания КТ-сигнала (высокоаттенуирующая слизь) патогномична для АБЛА и подтверждает диагноз АБЛА, даже при отсутствии некоторых других критериев;</li> <li>• возможно определение антител к мажорным антигенам <i>A. fumigatus</i> (rAsp f1, f2 и f4) в сыворотке крови.</li> </ul>

Заподозрить аллергический бронхолегочный аспергиллез следует в первую очередь у пациентов с неконтролируемой бронхиальной астмой или с трудно поддающимся стандартной терапией муковисцидозом [2, 29]. Диагностика АБЛА включает в себя сбор анамнеза, физикальный осмотр, где врач обращает внимание на симптомы, наличие гиперчувствительности и сопутствующих заболеваний (бронхиальной астмы или муковисцидоза). Общими симптомами могут быть слабость, недомогание, потеря веса, субфебрильная температура тела [12]. Наиболее часто пациентов беспокоят продуктивный кашель и одышка как при физической нагрузке, так и в покое, свистящие хрипы при дыхании, реже – кровохарканье [30].

Главным критерием является уровень общего IgE [15]. Критерий считают достоверным при значении  $\geq 500$  МЕ/мл. Как правило, низкое или нормальное значение общего IgE исключает активный процесс АБЛА. У метода высокая чувствительность (96%), но низкая специфичность (24%) [24]. Нужно принять во внимание, что уровень общего IgE может быть повышенным как у здоровых людей, так и у

больных атопической бронхиальной астмой и АБЛА. Более того, уровень общего IgE может снижаться у лиц, получавших специфическое лечение при АБЛА [31]. Данный тест используют также для динамической оценки состояния пациентов [15].

Второй основной диагностический тест – определение специфических IgE к *A. fumigatus* и другим микромицетам. В настоящее время определение повышенных специфических IgE к *A. fumigatus* (более 0,35 МЕ/л) является высокочувствительным методом диагностики, а также служит скрининговым обследованием у больных БА с подозрением на АБЛА [32]. В 2013 г. в результате проведенного проспективного исследования Agarwal R. и соавторы выяснили что, чувствительность и специфичность данного метода обследования составляет 70 и 100% [33].

Кожное тестирование с антигеном грибов *Aspergillus* чаще всего выполняется с использованием прик-ланцета или же с помощью внутрикожного введения. Стоит учитывать, что специфичность кожного тестирования варьирует от 88 до 94%, в связи с чем у 6-12% пациентов с негативным результатом тестирования диагноз АБЛА остается неустановленным [10, 19]. В настоящее время не рекомендовано применять кожное тестирование в качестве основного метода диагностики, так как на достоверность результата могут влиять ятрогенные факторы, низкое качество реактивов, отсутствие стандартизации диагностических аллергенов.

К дополнительным диагностическим критериям относят определение преципитирующих антител IgG к *A. fumigatus*. Тест является положительным у 90% больных АБЛА [21]. В то же время он также высокочувствителен и при других вариантах течения аспергиллеза, например, при хроническом аспергиллезе легких (ХАЛ) [22].

Также к дополнительным критериям относят повышенный уровень эозинофилов периферической крови. Пограничным уровнем эозинофилии крови принято считать 500 кл/мкл и более. Однако мнения экспертов сходятся на том, что уровень эозинофилов не всегда высокий у лиц с АБЛА. Agarwal R. и соавторы показали, что у 25% пациентов с установленным АБЛА число эозинофилов в периферической крови было менее 500 кл/мкл [34], следовательно, низкий уровень эозинофилов не исключает диагноз АБЛА [15].

Выявление галактоманнана грибов *Aspergillus* в сыворотке крови или в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) наиболее характерно для инвазивного аспергиллеза легких [35].

Проведение микологического исследования респираторных субстратов (мокроты и БАЛ) необходимо для выявления штамма возбудителя и определения чувствительности к антимикотикам в виду возможной резистентности к азолам [36].

С учетом длительности заболевания, у пациентов с АБЛА нередко образуются в мелких бронхах мукоидные пробки, закупоривающие дыхательные пути и приводящие к развитию бронхоэктазов и фиброза. В виду чего рентгенологические методы обследования играют важную роль в диагностике АБЛА. Наиболее достоверным методом диагностики является КТ ОГК в высоком разрешении. Таким образом, выявление специфических изменений легочной ткани делают диагноз АБЛА высоковероятным. Дополнительно могут обнаруживаться цетралобулярные узлы и инфильтраты [18].

Несмотря на наличие критериев постановки диагноза АБЛА, в современных клинических рекомендациях по лечению муковисцидоза и БА заболевание часто остается нераспознанным, и около 30% пациентов продолжают получать терапию БА или МВ без надлежащей коррекции [37].

Лечение АБЛА можно условно поделить на 2 направления: противовоспалительная/ иммуносупрессивная терапия с использованием системных глюкокортикостероидов (ГКС) и антимикотическая терапия [38].

Ингаляционные ГКС назначают для достижения контроля над БА. Они являются препаратом первой линии терапии БА и имеют узкий спектр возможных побочных эффектов. Более того, их применяют в качестве противовоспалительных средств при АБЛА. Оценивая эффект лечения ингаляционными стероидами, специалисты выявили четкую взаимосвязь между течением АБЛА и степенью контроля БА [39, 40].

Пульс-терапия системными ГКС (15 мг/кг/сутки метилпреднизолона длительностью 3 дня) используется только в тех случаях, когда не удается достичь контроля над обострениями АБЛА на фоне адекватной терапии или у пациентов с развившейся стероидной зависимостью на фоне предыдущего длительного их применения [41].

В нескольких рандомизированных исследованиях эксперты рабочей группы пришли к заключению, что назначение высоких или низких доз системных ГКС в разных контрольных группах кардинально не изменяет эффективность лечения. Так, в 2016 г. было проведено исследование, в которое включили 2 группы пациентов. Первая группа получала высокие дозы системных ГКС (по преднизолону): 0,75 мг/кг/день в течение 6 недель, затем 0,5 мг/кг/день в течение 6 недель, с постепенным снижением дозы на 5 мг каждые 6 недель, общей продолжительностью: 8-10 месяцев. Вторая группа получала низкие дозы системных ГКС (по преднизолону): 0,5 мг/кг/день в течение 2 недель, затем 0,5 мг/кг/день через день в течение 8 недель, с постепенным снижением дозы на 5 мг каждые 2 недели, общей продолжительностью: 3-5 месяцев. Анализ эффективности терапии АБЛА

через 1 и 2 года показал, что пациенты обеих групп имели одинаковое количество обострений [42].

Основным лечением АБЛА является назначение антимикотиков, таких как триазолы (итраконазол или вориконазол). Эти препараты эффективны в отношении большинства этиопатогенов АБЛА [43]. Согласно проведенным рандомизированным исследованиям, в когорте пациентов, получавших итраконазол (400 мг/сутки) и плацебо, значительный эффект был получен у лиц, получавших антифунгальную терапию. Было отмечено снижение доз используемых системных ГКС почти в два раза, а также снижение общего IgE на 25% и улучшение функции внешнего дыхания (ФВД) на 25%. При этом наблюдали снижение уровня провоспалительных маркеров в мокроте и частоты обострений заболевания, требующих применения системных ГКС [44]. Вориконазол является альтернативным препаратом лечения АБЛА. Его эффективность также высока. Возможно использование и новых триазолов (позаконазол, изавуконазол) при отсутствии эффекта от применения итраконазола и вориконазола [45, 46].

При тяжелой атопической БА возможно использование генно-инженерной биологической терапии, рекомбинантного человеческого анти-IgE-антитела (омализумаба). Омализумаб достоверно снижает уровень циркулирующего IgE за счет связывания с мембранными рецепторами Fcε1, значительно уменьшая симптомы, потребность в госпитализации, а также снижая частоту обострений и применения системных ГКС. При АБЛА доза омализумаба составляет 0,016 мг/кг/МЕ (IgE/мл) ежемесячно. Учитывая то, что при АБЛА уровень сывороточного IgE достаточно велик, доза омализумаба должна быть соответствующей (максимально – 1200 мг). В настоящее время омализумаб остается резервным препаратом для пациентов, у которых не удалось достичь эффекта стандартными линиями терапии или же у лиц с развившейся стероидной зависимостью [47]. Также в литературе описаны случаи использования у больных АБЛА моноклональных антител, направленных на подавление Т-хелпер-2 (Тх-2) иммунного ответа: дупилумаба, меполизумаба, бенрализумаба, реслизумаба. Проведенные рандомизированные исследования свидетельствуют об эффективности вышеперечисленных препаратов у данной когорты пациентов [32, 48]. Таким образом, применение генно-инженерных биологических препаратов можно рассматривать как перспективное направление в лечении АБЛА [32, 49, 50].

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В последнее время отмечается тенденция к росту числа заболеваемости АБЛА во всем мире. В связи с этим важно повысить уровень осведомленности практикующих врачей о возможности развития

АБЛА как у пациентов с традиционными факторами риска, таких как бронхиальная астма и муковисцидоз, так и без них. Своевременное направление больного в специализированные микологические и аллергологические центры поможет предотвратить развитие и прогрессирование таких осложнений, как

бронхоэктазы, которые в свою очередь могут привести к инвалидизации и снижению качества жизни пациентов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kosmidis C., Denning D.W. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*. 2015; 70: 270-7. doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206291
2. Agarwal R., Chakrabarti A., Shah A., et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin. Exp. Allergy*. 2013; 43: 850-73. doi.org/10.1111/cea.12141
3. *Global Initiative for Asthma*. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2024. Updated May 2024.
4. Hekking P.-P.W., Wener R.R., Amelink M., et al. The prevalence of severe refractory asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015; 135 (4): 896-902. doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.042
5. Greenberger P.A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 110: 685. doi.org/10.1067/mai.2002.130179
6. Agarwal R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest* 2009; 135: 805. doi.org/10.1378/chest.08-2586
7. Agarwal R. Burden and distinctive character of allergic bronchopulmonary aspergillosis in India. *Mycopathologia* 2014; 178: 447. doi.org/10.1007/s11046-014-9767-z
8. 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; 45: 1765. doi.org/10.1111/cea.12595
9. Agarwal R. Severe asthma with fungal sensitization. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2011; 11: 403-13. doi.org/10.1007/s11882-011-0217-4
10. Agarwal R., Gupta D. Severe asthma and fungi: Current evidence. *Med. Mycol.* 2011; 49 (Suppl 1): S150-7. doi.org/10.3109/13693786.2010.504752
11. Gergen P.J., Arbes S.J., Calatroni A., et al. Total IgE levels and asthma prevalence in the US population: results from the national health and nutrition examination survey 2005-2006. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 124: 447-53. doi.org/10.1016/j.jaci.2009.06.011
12. Agarwal R., Sehgal I.S., Dhooria S., et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Indian J. Med. Res.* 2020; 151(6): 529-549. doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\_1187\_19
13. Hinson K.F., Moon A.J., Plummer N.S. Bronchopulmonary aspergillosis; a review and a report of eight new cases. *Thorax* 1952; 7: 317-33. doi.org/10.1136/thx.7.4.317
14. 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; 51: 361-70. doi.org/10.3109/13693786.2012.738312
15. Козлова Я.И., Клишко Н.Н. Аллергический бронхолегочный аспергиллез: учебное пособие. СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2019: 60 с. [Kozlova Ya.I., Klimko N.N. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: textbook. SPb.: Publishing house of I.I. Mechnikov NWSMU, 2019: 60 p. (In Russ.)].
16. Savio J., Ramachandran P., Jairaj V., et al. A cross-sectional study of skin prick test to *Aspergillus fumigatus* antigen in asthmatic patients seen at a tertiary healthcare center. *Indian J. Allergy Asthma Immunol.* 2019; 33: 19-24. doi.org/10.4103/ijaai.ijaai\_31\_18
17. 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; 16 (1): 3-8. [Klimko N.N., Kozlova Y.I., Khostelidi S.N., et al. The prevalence of serious and chronic fungal diseases in Russian Federation on LIFE program mode. *Problems in Medical Mycology*. 2014; 16 (1): 3-8. (In Russ.)].
18. Козлова Я.И., Васильев Н.Ю., Фролова Е.В. и др. Аллергические грибковые заболевания дыхательных путей: анализ данных регистра пациентов с бронхиальной астмой. *Инфекция и иммунитет*. 2023; 13 (5): 947-956. [Kozlova Yu.I., Vasiliev N.Yu., Frolova E.V., et al. Allergic fungal airway diseases: analysis of data in asthma patient register. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023; 13 (5): 947-956. (In Russ.)]. doi: 10.15789/2220-7619-AFA-13305
19. Greenberger P.A., Patterson R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and the evaluation of the patient with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988; 81: 646-50. doi.org/10.1016/0091-6749(88)91034-2
20. Chowdhary A., Agarwal K., Kathuria S., et al. Allergic bronchopulmonary mycosis due to fungi other than *Aspergillus*: a global overview. *Crit. Rev. Microbiol.* 2014; 40(1): 30-48. doi: 10.3109/1040841X.2012.754401

21. *Sehgal I.S., Choudhary H., Dhooria S., et al.* Prevalence of sensitization to *Aspergillus flavus* in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Med. Mycol.* 2019; 57: 270-6. doi.org/10.1093/mmy/myy012
22. *Rosenberg M., Patterson R., Mintzer R., et al.* Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann. Intern. Med* 1977; 86: 405-14. doi.org/10.7326/0003-4819-86-4-405
23. *Stevens D.A., Moss R.B., Kurup V.P., et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis-state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin. Infect. Dis* 2003; 37 (suppl 3): S225-64. doi.org/10.1086/376525
24. *Agarwal R., Maskey D., Aggarwal A.N., et al.* Diagnostic performance of various tests and criteria employed in allergic bronchopulmonary aspergillosis: A latent class analysis. *PLoS One.* 2013; 8: e61105. doi.org/10.1371/journal.pone.0061105
25. *Oguma T., Taniguchi M., Shimoda T., et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis in Japan: a nationwide survey. *Allergol. Int.* 2018; 67: 7984. doi.org/10.1016/j.alit.2017.04.011
26. *Agarwal R., Gupta D., Aggarwal A.N., et al.* Clinical significance of hyper-attenuating mucoid impaction in allergic bronchopulmonary aspergillosis: an analysis of 155 patients. *Chest.* 2007; 132: 1183-90. doi.org/10.1378/chest.07-0808
27. *Rick E.M., Woolnough K., Pashley C.H., Wardlaw A.J.* Allergic fungal airway disease. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2016; 26: 344-54. doi.org/10.18176/jiaci.0122
28. *Agarwal R., Sehgal I.S., Muthu V., et al.* Revised ISHAM-ABPA working group clinical practice guidelines for diagnosing, classifying and treating allergic bronchopulmonary aspergillosis/mycoses. *Eur. Respir. J.* 2024; 63 (4): 2400061. doi.org/10.1183/13993003.00061-2024
29. *Kousha M., Tadi R., Soubani A.O.* Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur. Respir. Rev.* 2011; 20 (121): 156-74. doi.org/10.1183/09059180.00001011
30. *Shah A., Panjabi C.* Allergic aspergillosis of the respiratory tract. *Eur. Respir. Rev.* 2014; 23 (131): 8-29. doi.org/10.1183/09059180.00007413
31. *Agarwal R., Gupta D., Aggarwal A.N., et al.* Clinical significance of decline in serum IgE levels in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Respir. Med.* 2010; 104: 204-10. doi.org/10.1016/j.rmed.2009.09.005
32. *Козлова Я.И., Фролова Е.В., Аак О.В. и др.* Аллергический бронхолегочный аспергиллез: клинико-иммунологические взаимосвязи. *Проблемы медицинской микологии.* 2023; 25 (2): 126. [Kozlova Y.I., Frolova E.V., Aak O.V., et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: clinical and immunological relationships. *Problems in Medical Mycology.* 2023; 25 (2): 126. (In Russ.)].
33. *Moss R.B.* Treatment options in severe fungal asthma and allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Eur. Respir. J.* 2014; 43: 1487-500. doi.org/10.1183/09031936.00139513
34. *Agarwal R., Khan A., Aggarwal A.N., et al.* Clinical relevance of peripheral blood eosinophil count in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Infect. Public Health.* 2011; 4: 235-43. doi.org/10.1016/j.jiph.2011.08.006
35. *Kono Y., Tsushima K., Yamaguchi K., et al.* The utility of galactomannan antigen in the bronchial washing and serum for diagnosing pulmonary aspergillosis. *Respir. Med.* 2013; 107: 1094-100. doi.org/10.1016/j.rmed.2013.04.007
36. *Denning D.W., Park S., Lass-Flörl C., et al.* High-frequency triazole resistance found in nonculturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. *Clin. Infect Dis.* 2011; 52: 1123-9. doi.org/10.1093/cid/cir179
37. *Agarwal R., Dua D., Choudhary H., et al.* Role of *Aspergillus fumigatus*-specific IgG in diagnosis and monitoring treatment response in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Mycoses.* 2017; 60: 33. doi.org/10.1111/myc.12541
38. *Patterson K.C., Strek M.E.* Diagnosis and treatment of pulmonary aspergillosis syndromes. *Chest.* 2014; 146: 1358-68. doi.org/10.1378/chest.14-0917
39. *Agarwal R., Khan A., Aggarwal A.N., et al.* Role of inhaled corticosteroids in the management of serological allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Intern. Med.* 2011; 50: 855-60. doi.org/10.2169/internalmedicine.50.4665
40. *Козлова Я.И., Фролова Е.В., Филиппова Л.В. и др.* Аллергический бронхолегочный аспергиллез у больных бронхиальной астмой: результаты проспективного исследования. *Терапевтический архив.* 2017; 89 (8): 13-16. [Kozlova Ya.I., Frolova E.V., Filippova L.V., et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma: Results of a prospective study. *Therapeutic Archive.* 2017; 89 (8):13-6. (In Russ.)]. doi.org/10.17116/terarkh201789813-16
41. *Singh Sehgal I., Agarwal R.* Pulse methylprednisolone in allergic bronchopulmonary aspergillosis exacerbations. *Eur. Respir. Rev.* 2014; 23: 149-52. doi.org/10.1183/09059180.00004813
42. *Agarwal R., Aggarwal A.N., Dhooria S., et al.* A randomised trial of glucocorticoids in acute-stage allergic bronchopulmonary aspergillosis complicating asthma. *Eur. Respir. J.* 2016; 47: 490-8. doi.org/10.1183/13993003.01475-2015
43. *Agarwal R.* What is the current place of azoles in allergic bronchopulmonary aspergillosis and severe asthma with fungal sensitization. *Expert. Rev. Respir. Med.* 2012; 6: 363-71. doi.org/10.1586/ers.12.35

44. Agarwal R., Dhooria S., Singh Sehgal I., et al. A randomized trial of itraconazole vs prednisolone in acute-stage allergic bronchopulmonary aspergillosis complicating asthma. *Chest*. 2018; 153: 656-64. doi.org/10.1016/j.chest.2018.01.005
45. Chishimba L., Niven R.M., Cooley J., Denning D.W. Voriconazole and posaconazole improve asthma severity in allergic bronchopulmonary aspergillosis and severe asthma with fungal sensitization. *J. Asthma*. 2012; 49: 423-33. doi.org/10.3109/02770903.2012.662568
46. Jacobs S.E., Saez-Lacy D., Wynkoop W., Walsh T.J. Successful treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis with isavuconazole: Case report and review of the literature. *Open Forum Infect Dis*. 2017; 4: ofx040. doi.org/10.1093/ofid/ofx040
47. Agarwal R., Sehgal I.S., Dhooria S., Aggarwal A.N. Challenging cases in fungal asthma. *Med Mycol*. 2019; 57: S110-7. doi.org/10.1093/mmy/myy063
48. Wardlaw A., Howarth P.H., Israel E., et al. Fungal sensitization and its relationship to mepolizumab response in patients with severe eosinophilic asthma. *Clin. Exp. Allergy*. 2020; 50 (7): 869-872. doi: 10.1111/cea.13680
49. Altman M.C., Lenington J., Bronson S., Ayars A.G. Combination omalizumab and mepolizumab therapy for refractory allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract*. 2017; 5: 1137-9. doi.org/10.1016/j.jaip.2017.01.013
50. Soeda S., Kono Y., Tsuzuki R., et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis successfully treated with benralizumab. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract*. 2019; 7: 1633-5. doi.org/10.1016/j.jaip.2018.11.024

*Поступила в редакцию журнала 14.09.24*

*Принята к печати 05.10.24*





*Для цитирования:* Боронина Л.Г., Саматова Е.В., Мухаметшин Р.Ф., Кочнева Н.А. Возможности и проблемы микробиологической верификации диагноза при инвазивных инфекциях у детей в неонатальном периоде. Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (3): 56-63. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-56-63

*For citation:* Boronina L.G., Samatova E.V., Muchametshin R.F., Kochneva N.A. Possibilities and problems of microbiological verification of diagnosis in invasive infections in neonatal children. Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (3): 56-63. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-56-63

## ВОЗМОЖНОСТИ И ПРОБЛЕМЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ВЕРИФИКАЦИИ ДИАГНОЗА ПРИ ИНВАЗИВНЫХ ИНФЕКЦИЯХ У ДЕТЕЙ В НЕОНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

<sup>1,2</sup>Боронина Л.Г. (профессор кафедры)\*,  
<sup>2</sup>Саматова Е.В. (врач-бактериолог),  
<sup>2</sup>Мухаметшин Р.Ф. (зав. отделением),  
<sup>2</sup>Кочнева Н.А. (начальник отдела лабора-  
торной диагностики, врач-бактериолог)

<sup>1</sup>Уральский государственный медицинский университет (кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики); <sup>2</sup>Областная детская клиническая больница, Екатеринбург, Россия

В работе представлены результаты микробиологического исследования крови и спинномозговой жидкости (СМЖ), полученных от детей, находившихся в отделениях интенсивной терапии в 2022-2023 гг. За этот период проведен анализ 2756 проб крови на стерильность от 2109 недоношенных детей и 582 проб от 283 доношенных новорожденных, а также 153 проб СМЖ от 153 недоношенных детей и 120 проб от 120 доношенных новорожденных. У недоношенных детей из крови выделяли коагулазоотрицательные стафилококки (62,2%), *Escherichia coli* (6,6%) и *Streptococcus agalactiae* (5,7%); у доношенных детей: коагулазоотрицательные стафилококки (47,1%), *Staphylococcus aureus* (17,6%) и *Klebsiella pneumoniae* (12,9%). У недоношенных детей в пробах из спинномозговой жидкости микроорганизмы обнаруживали в 5,2% (n=8), а у доношенных – в 3,3% (n=4). У недоношенных детей спектр микроорганизмов был представлен *Staphylococcus epidermidis* (n=2), *S. agalactiae* (n=1), *S. aureus* (n=1), *Pseudomonas aeruginosa* (n=1), *Proteus mirabilis* (n=1), *Enterobacter aerogenes* (n=1); у доношенных: *S. aureus* (n=3) и *Candida albicans* (n=1).

**Ключевые слова:** бактериемия, фунгемия, сепсис, новорожденные, отделения интенсивной терапии, маркеры резистентности

## POSSIBILITIES AND PROBLEMS OF MICROBIOLOGICAL VERIFICATION OF DIAGNOSIS IN INVASIVE INFECTIONS IN NEONATAL CHILDREN

<sup>1,2</sup>Boronina L.G. (professor of the department),  
<sup>2</sup>Samatova E.V. (bacteriologist),  
<sup>2</sup>Muchametshin R.F. (head of the clinical de-  
partment), <sup>2</sup>Kochneva N.A. (head of the labora-  
tory diagnostics department, bacteriologist)

<sup>1</sup>Ural State Medical University (Department of Medical Microbiology and Clinical Laboratory Diagnostics); <sup>2</sup>Regional Children's Clinical Hospital, Ekaterinburg, Russia

The paper presents the results of a microbiological study of blood and cerebrospinal fluid (CSF) obtained from children in intensive care units in 2022-2023. During this period, 2,756 blood samples were analyzed for sterility from 2109 premature infants and 582 samples from 283 full-term newborns, as well as 153 CSF samples from 153 premature infants and 120 samples from 120 full-term newborns. Coagulase-negative staphylococci (62,2%), *Escherichia coli* (6,6%) and *Streptococcus agalactiae* (5,7%) were isolated from the blood of premature infants; in full-term infants: coagulase-negative staphylococci (47,1%), *Staphylococcus aureus* (17,6%) and *Klebsiella pneumoniae* (12,9%). In premature infants, microorganisms were detected in 5,2% (n=8) samples from cerebrospinal fluid, and in full-term infants – in 3,3% (n=4). In premature infants, the spectrum of microorganisms was represented by *Staphylococcus epidermidis* (n=2), *S. agalactiae* (n=1), *S. aureus* (n=1), *Pseudomonas aeruginosa* (n=1), *Proteus mirabilis* (n=1), *Enterobacter aerogenes* (n=1); in full-term infants: *S. aureus* (n=3) and *Candida albicans* (n=1).

**Key words:** bacteremia, fungemia, sepsis, newborns, intensive care units, resistance markers

### ВВЕДЕНИЕ

Инвазивные инфекции новорожденных и в том числе неонатальный сепсис (НС) являются в настоящее время важной проблемой здравоохранения. Для этой категории пациентов характерно тяжелое течение инфекций неонатального периода из-за морфо-

\* Контактное лицо: Боронина Любовь Григорьевна,  
e-mail: boroninalg@mail.ru

логической и функциональной незрелости органов и систем, что требует выхаживания в отделениях анестезиологии и реанимации. Неонатальный сепсис характеризуется формированием угрожающего жизни синдрома полиорганной недостаточности (СПОН) вследствие дисрегуляции иммунного ответа организма, развивается в течение первых четырех недель жизни как у доношенных, так и у недоношенных детей, частота составляет 0,5-8,0 на 1000 новорожденных. Наиболее высокие показатели встречаются у детей с низкой массой тела при рождении, младенцев с перинатальной асфиксией при рождении, выраженной в низких баллах по шкале Апгар, и с материнскими факторами перинатального риска. Различают ранний (развивается в первые 72 часа от рождения ребенка) и поздний НС (манифестирует после 72 часов). Неонатальный сепсис до сих пор остается главной причиной заболеваемости и смертности в детских отделениях интенсивной терапии [1-6].

На современном этапе лечащий врач в принятии клинического решения до 70% ориентируется на результаты лабораторных исследований, в первую очередь – на бактериологический посев крови. При этом сейчас отсутствуют четкие и единые клинико-лабораторные и микробиологические критерии, позволяющие уже на ранней стадии диагностировать развитие септического процесса.

**Цель исследования:** изучить особенности преаналитического этапа, определить возможности культурального исследования крови при инвазивных инфекциях у новорожденных в раннем и позднем неонатальном периоде.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали кровь и спинномозговую жидкость (СМЖ), полученные от детей, находившихся в отделениях интенсивной терапии в 2022-2023 гг. За этот период проведен анализ 2756 проб крови на стерильность от 2109 недоношенных детей и 582 проб от 283 доношенных новорожденных, а также 153 проб СМЖ от 153 недоношенных детей и 120 проб от 120 доношенных новорожденных.

Кровь у пациентов брали минимум однократно при поступлении в отделение, дальнейшую кратность определяли клиническим состоянием ребенка и подозрением на развитие у него септического состояния. Сбор крови осуществляли у постели больного в специальные коммерческие флаконы до начала применения антибактериальной терапии или перед введением очередной дозы и транспортировали в лабораторию клинической микробиологии в специализированном термоконтейнере немедленно, в ночное время пробы убирали в термостат. Объем посева крови не должен превышать 4% от объема циркулирующей крови и определяется на основании массы

тела пациента. В среднем производили посев 1,0 мл крови.

Для посева крови, забранной из интактной вены и/или катетера, использовали системы для гемокультур «Signal» («Oxoid», Великобритания), флаконы для автоматического анализатора гемокультур «BACTEC™FX» («Becton Dickinson», США), флаконы для автоматического анализатора гемокультур «BacT/ALERT 3D Select» («BioMerieux», Франция), для визуального учета – бульон с сердечно-мозговым экстрактом с 0,025% SPS, CO<sub>2</sub> и вакуумом («Condalab», Испания).

Взятие СМЖ для микробиологического исследования выполняли с помощью стерильной одноразовой емкости и доставляли в специализированном термоконтейнере немедленно в лабораторию клинической микробиологии согласно действующей нормативной документации [7, 8]. Посев СМЖ осуществляли на кровяно-сывороточный и шоколадный агары, а также на 0,1% полужидкую среду обогащения.

Видовую идентификацию выделенных микроорганизмов до декабря 2022 г. проводили классическим бактериологическим методом, а также на полуавтоматическом анализаторе «Phoenix M50» («Becton Dickinson», США), с декабря 2022 г. – методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) на приборе «Autof MS 1000» («Autobio Diagnostics Co.», КНР).

Определение антибиотикочувствительности выполняли как диско-диффузионным методом с использованием прибора «ADAGIO» («BIO-RAD», США), так и на анализаторе «Phoenix M50» («Becton Dickinson», США) с установлением минимальных подавляющих концентраций (МПК). Тестирование микроорганизмов к антимикробным препаратам осуществляли согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (Версия-2021-1) [9]. Класс карбапенемаз определяли с помощью тестов в панелях для «Phoenix M50» и иммунохроматографического теста «NG-Test CARBA 5» («НГ Биотех», Франция). Другие маркеры резистентности, такие как: продукция бета-лактамаз расширенного спектра, ассоциированная резистентность к макролидам и линкозамидам (индуцибельный MLSb фенотип), метициллинорезистентность определяли фенотипическими методами.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica 6.0».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

За исследуемый период у недоношенных детей микроорганизмы обнаружены в 4,4% (n=120) проб крови, а у доношенных – в 14,6% (n=85), разница

статистически недостоверна. По литературным данным, положительная гемокультура имеет место только в 30-50% с септическим шоком, но лишь посев крови позволяет идентифицировать патоген, определить его чувствительность и подобрать адекватный режим терапии [3]. Спектр выделенных микроорганизмов представлен на рисунке 1.

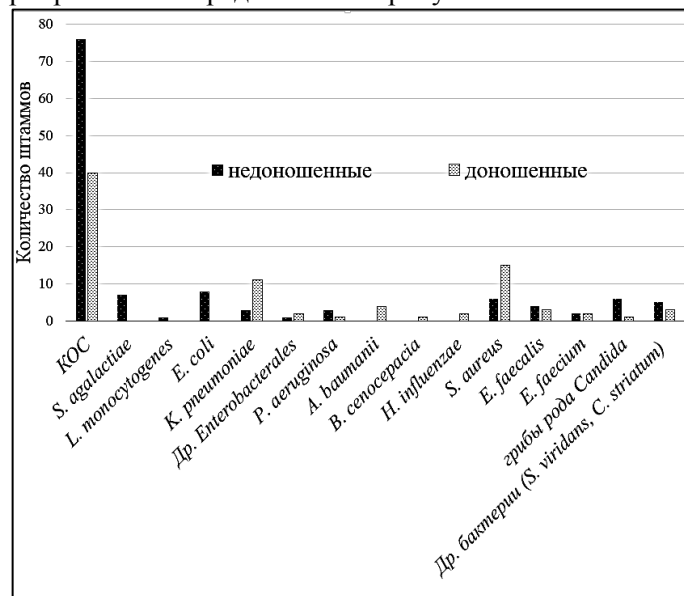


Рис. 1. Спектр микроорганизмов, выделенных из крови недоношенных и доношенных новорожденных в 2022-2023 гг.

У детей обеих групп выявляли преимущественно коагулазоотрицательные микроорганизмы (КОС). С одной стороны, это может свидетельствовать о контаминации при нарушении правил сбора материала. Риски контаминации пробы крови при посеве остаются значительными у пациентов, особенно неонатального профиля. Согласно обзору литературы [10], включающему 69 исследований, доля контаминаций составляла 0,5%-22,8% (медиана – 3,4). При этом центр по контролю и профилактике заболеваний США указывает в качестве допустимого уровень контаминации 3%. Наиболее часто (59,5%) мнение о контаминированности пробы основывается исключительно на типе выделенного микроорганизма. Только в 29,7% публикаций использовали многофакторный подход, в 10,8% – специалисты микробиологической диагностики опирались на мнение лечащих врачей. Известно, что закрытые системы сбора крови снижают риск контаминации с 5% до 1,6%, также большое внимание необходимо уделять подготовке места венепункции. Так, описаны способы сбора пробы, позволяющие отвести и утилизировать первые несколько миллилитров крови, которые, скорее всего, содержат кожные загрязнения [10, 11]. Медицинские микробиологи, врачи-бактериологи лаборатории клинической микробиологии информировали клиницистов о распространенных микроорганизмах-контаминантах, которые могут встречаться

в посевах крови (например, коагулазонегативных стафилококках; *Corynebacterium* sp., в том числе *Corynebacterium striatum*; *Streptococcus viridans*, включающих *S. oralis*, *S. mitis* и другие; видах бацилл, отличных от *Bacillus anthracis*). Для валидированной оценки роли этих микроорганизмов при сепсисе требуются неоднократные посева крови (не менее трех) и определение количественных показателей уровня прокальцитонина и других клинико-лабораторных данных. С другой стороны, КОС могут иметь этиологическое значение у пациентов с несовершенным иммуногенезом, к которым относятся недоношенные дети, поэтому врач-микробиологи должны уведомлять клиницистов в режиме реального времени о положительном результате гемокультуры. Также КОС могут играть роль при диагностике катетер-ассоциированной инфекции. Взятие крови для посева из катетеризированного сосуда сопряжено с дополнительными рисками контаминации. Coggins S.A. и соавторы [12] указывают, что при сравнении пробы из катетера и пробы из интактной вены в 67% случаев наблюдается рост обеих проб, в 17% – только пробы, полученной из катетера, в 16% – только пробы, полученной пункционно. Медиана времени роста была значительно короче при использовании катетера по сравнению с периферическими культурами (15,0 часов против 16,8 часов,  $p=0,001$ ) [12-14].

У недоношенных детей среди положительных гемокультур после КОС чаще выделяются *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*. По данным литературы, частота встречаемости *S. agalactiae* доходит до 38-43% случаев положительных гемокультур, *E. coli* – до 24%, *L. monocytogenes* – до 5% [4]. Эти микроорганизмы характерны для раннего неонатального сепсиса, так как основным источником инфицирования ими являются родовые пути матери или плацента.

У доношенных детей после КОС чаще выделяли *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, что специфично для позднего неонатального сепсиса и сопряжено с инфицированием детей внутрибольничной биотой или микроорганизмами, связанными с оказанием медицинской помощи. Так, среди возбудителей позднего неонатального сепсиса в Европе и США на первом месте находится *K. pneumoniae* [4].

Кандидемию наблюдают чаще у недоношенных детей (4,9%). Большинство видов *Candida* растут в стандартных средах для посева крови, если только пациент не получал противогрибковую терапию. К сожалению, почти у половины больных с подозрением на кандидемию посева крови не дают положительных результатов. Посев крови – золотой стандарт, однако верификация грибкового сепсиса, даже при должном объеме забора (7-10 мл) крови, составляет до 50%. Информативность посева крови определяется количеством пораженных органов, варьи-

руя от 28% при одном органе до 78% при поражении четырех органов [15].

В нашем исследовании проанализировано 1447 образцов крови от 1096 недоношенных детей в 2022 г. и 1309 проб от 1013 пациентов в 2023 г. За 2022 г. обнаружены микроорганизмы в 48 (3,3%) пробах, за 2023 г. – в 72 (5,5%), разница статистически достоверна ( $p=0,005$ ). Спектр микроорганизмов, выделенных из крови, представлен на рисунке 2.

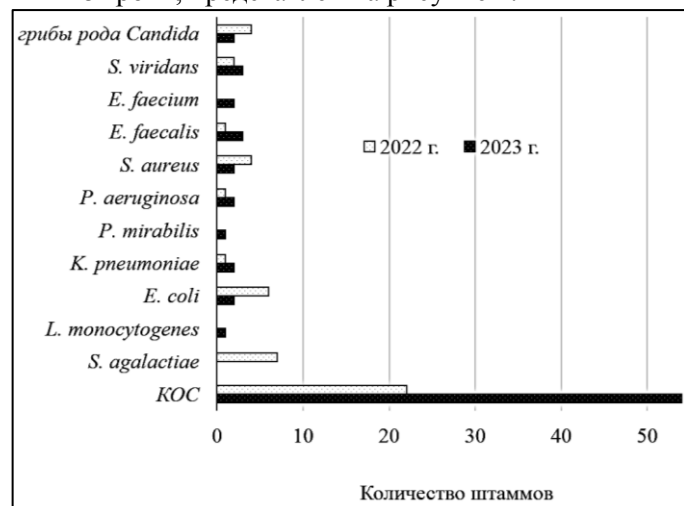


Рис. 2. Спектр микроорганизмов, выделенных из крови недоношенных новорожденных.

Возрастание доли положительных гемокультур в 2023 г. в основном произошло за счет КОС. В 2022 г. обнаружены только *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, а в 2023 г. еще выделены *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus lugdunensis*. Увеличение разнообразия связано с внедрением в диагностику масс-спектрометрии. В 2022 г. все микроорганизмы были в монокультуре, а в 2023 г. выявлены две ассоциации: *S. epidermidis* + *Streptococcus oralis*, *S. epidermidis* + *Streptococcus mitis*. Повышение доли КОС и данные ассоциации, вероятно, свидетельствуют о контаминации из-за проблем с поставками закрытых систем для сбора крови. Большая доля кандидемии в 2022 г. (8,3%), чем в 2023 г. (2,7%), возможно, связана с эпидемией COVID-19 и применением глюкокортикостероидов в терапии беременных. Среди грибов рода *Candida* встречались виды *C. albicans* и *C. lusitanae*. Маркеры резистентности: в 2022 г. среди КОС отмечены 3 метициллинорезистентных (MRS) и 3 изолята, имеющих ассоциированную резистентность к макролидам и линкозамидам (индуцибельный MLSb фенотип), а также выявлен один штамм *E. coli*, продуцирующий бета-лактамазы расширенного спектра; в 2023 г.: среди КОС наблюдали 22 MRS и 5 изолятов с индуцибельным MLSb фенотипом, а также один изолят *Pseudomonas aeruginosa*, продуцирующий карбапенемазы класса B – IMP.

У доношенных детей проанализировано 345 образцов от 184 пациентов за 2022 г. и 237 образцов

крови от 99 пациентов за 2023 г. Микроорганизмы обнаружены в 44 (12,8%) пробах в 2022 г. и в 41 (17,3%) – в 2023 г., разница статистически недостоверна. Спектр микроорганизмов, выделенных из крови, представлен на рисунке 3.

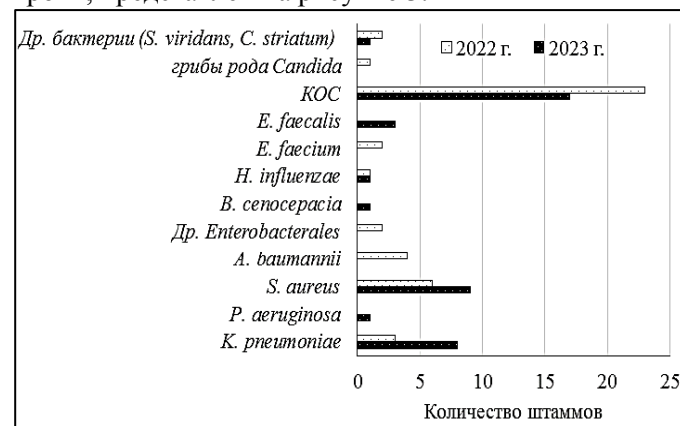


Рис. 3. Спектр микроорганизмов, выделенных из крови доношенных новорожденных.

Среди КОС выявляли виды *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, и их доля была примерно на одном уровне: 52,3% – в 2022 г. и 41,5% – в 2023 г. На втором и третьем месте – *S. aureus* (13,6% – 2022 г., 22% – 2023 г.) и *K. pneumoniae* (6,8% – 2022 г. и 19,5% – 2023 г.). При этом их доля в 2023 г. возросла, что, вероятно, связано с увеличением количества данных микроорганизмов, обладающих продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (в 2022 г. – 1 штамм, в 2023 г. – 4 штамма).

За исследуемый период у недоношенных детей микроорганизмы выявлены в 5,2% ( $n=8$ ) проб СМЖ, а у доношенных – в 3,3% ( $n=4$ ). Спектр микроорганизмов у недоношенных был представлен *S. epidermidis* ( $n=2$ ), *S. agalactiae* ( $n=1$ ), *S. aureus* ( $n=1$ ), *P. aeruginosa* ( $n=1$ ), *Proteus mirabilis* ( $n=1$ ), *Enterobacter aerogenes* ( $n=1$ ); у доношенных: *S. aureus* ( $n=3$ ) и *C. albicans* ( $n=1$ ).

Диагностика НС может быть затруднена, поскольку многие патологические состояния, особенно раннего неонатального периода, протекают с признаками СПОН. Более того, бактериемия может возникать у новорожденных без каких-либо клинических признаков или симптомов [16]. В настоящее время выделение микроорганизма из стерильно полученной культуры крови является золотым стандартом для подтверждения диагноза неонатального сепсиса [3].

При клинической и микробиологической диагностике НС есть ряд неоднозначных утверждений, и возникают вопросы, которые требуют уточнения в связи с отсутствием единых российских клинических рекомендаций по сепсису у детей (в доступной нами литературе найден только их проект [3]) и их различий с европейскими данными.

1. Согласно проекту российских клинических рекомендаций (РКР) по сепсису у детей, образцы крови для посева, по возможности, должны быть получены до начала антибактериальной терапии или до введения очередной дозы антибиотика, а применение флаконов для посева крови с сорбентами антимикробных субстанций носит рекомендательный характер [3]. Известно, что антибиотики, используемые для антибиотикопрофилактики в родах (пенициллиновый ряд), проникают через плаценту и достигают уровня в крови выше минимальной ингибирующей концентрации для *S. agalactiae* у плода и новорожденного. Поэтому высказывались опасения относительно снижения вероятности выделения микроорганизма при посеве крови новорожденного. Антибиотикопрофилактика в родах не влияет на время до получения положительного результата при использовании новейших технологий [17-18]. Однако современные системы во флаконах для посева крови имеют сорбенты, дезактивирующие антимикробные вещества, в них может обнаруживаться очень низкое количество микроорганизмов (1-10 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл), поэтому применение этих систем оправдано.

2. *В каких случаях допускается отбор крови из сосудистых катетеров?* В проекте РКР и европейских рекомендациях мнения совпадают: отбор проб крови через сосудистый катетер необходим только при подозрении на катетер-ассоциированную инфекцию или при технической невозможности венепункции. Для диагностики катетер-ассоциированной инфекции требуются сбор крови из катетера и параллельно из интактной вены, а также исследование самого катетера [19]. Обычный посев только кончиков внутривенных катетеров во время их удаления не имеет диагностической ценности для ускоренной диагностики инвазивной инфекции. В связи с этим считаем, что взятие крови из катетеризированного сосуда целесообразно даже без подозрения на катетер-ассоциированную инфекцию при отсутствии другого сосудистого доступа.

3. *Какой объем крови является достаточным для посева крови у новорожденных?* Объем посева крови не должен превышать 4% от объема циркулирующей крови и определяется на основании массы тела пациента [3]. Чувствительность посева крови у недоношенных детей ниже в связи с малым объемом пробы. Для большинства типичных возбудителей НС скорость появления культуры зависит от объема пробы и количества КОЕ. Выявление слабой бактериемии (4 КОЕ/мл и менее) может быть затруднено. Объем пробы 1 мл может быть достаточным для получения гемокультуры для бактериемии. Если объективные данные свидетельствуют о наличии микотической инфекции, то для увеличения эффективности диагностики необходимо ежедневно проводить от 2 до 3 посевов крови, при этом объем крови для

детей < 2 кг должен составлять не менее 2-4 мл/сут. [20], от 2 до 12 кг – 6 мл/сут., от 2 до 36 кг – 20 мл/сут., при этом положительным нужно считать высев *Candida spp.* уже при концентрации 1 КОЕ/мл [21].

4. *Какие системы для посева крови надо использовать при одномоментном взятии?* Согласно проекту РКР, следует использовать не менее двух специализированных педиатрических флаконов, а анаэробные флаконы – строго при подозрении на анаэробную инфекцию [3]. Как правило, у взрослых с подозрением на сепсис в лабораторию требуется отправлять два (а иногда и три) посева для оценки каждого эпизода сепсиса, при этом наиболее важным фактором для получения более двух культур является объем взятой крови. При этом риски, связанные с изъятием большого объема крови из кровотока у экстремально недоношенного новорожденного, могут быть значительными. По данным [22-23], ятрогенная потеря в первые шесть недель жизни составляла от 11 до 22 мл/кг в неделю; это эквивалентно 15-30% объема циркулирующей крови у младенцев с очень низкой массой тела при рождении (менее 1500 г). На наш взгляд, для снижения риска, связанного с изъятием большого объема крови из кровотока у экстремально недоношенного новорожденного, можно делать посев в один специализированный (аэробный) педиатрический флакон.

5. *Длительность исследования, которое является ограничением гемокультивирования.* Для подавляющего большинства этиологических агентов инфекций кровотока традиционные методы посева крови дают положительные результаты в течение 24-48 часов; инкубация более 5 дней редко требуется при использовании современных автоматизированных систем непрерывного мониторинга посева крови и питательных сред [24].

6. *О необходимости посева ликвора при подозрении на сепсис.* При инвазивных инфекциях микроорганизм попадает не только в кровь, но и в СМЖ. Исследование культуры ликвора является диагностически значимым в неонатальной популяции. Среди детей с положительной гемокультурой до 30% имеют положительную культуру из СМЖ. При этом пациенты с подтвержденным менингитом в 15-38% случаев имеют отрицательную гемокультуру, а, значит, посев ликвора у новорожденных значительно увеличивает вероятность выделить этиологический патоген и выбрать соответствующую его чувствительности терапию. В то же время выполнение люмбальной пункции и посев ликвора только детям с положительным посевом крови обусловят потерю необходимой информации об этиологии менингита. Частота менингита у асимптомных новорожденных при этом очень мала – около 1%. Таким образом, проведение люмбальной пункции с посевом ликвора

при подозрении на сепсис является обязательным у новорождённых [25-27].

При микробиологической диагностике инфекций кровотока также следует помнить, что перед сбором крови нужно продезинфицировать место венепункции хлоргексидином или 2%-ной настойкой йода у взрослых и детей старше 2 месяцев (детям младше 2 месяцев хлоргексидин НЕ рекомендуется). Организмы, как правило, выживают во флаконах с инокулированными культурами, даже если их не инкубировать немедленно; охлаждать кровь перед инкубацией недопустимо, флаконы с инокулированными культурами необходимо как можно скорее доставить в лабораторию. *S. pneumoniae* и некоторые другие грамположительные микроорганизмы могут развиваться как в анаэробных, так и в аэробных условиях, поэтому чаще рекомендуют посев на два флакона с разными системами культивирования. Тем не менее, учитывая небольшой объем крови, который можно получить у недоношенных детей с низкой массой тела, предпочтительнее делать посев в один флакон с аэробной системой культивирования. Значительно ускорить получение результата в первичной гемокультуре из осадка крови можно с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии при условии монокультуры, также требуется предварительная микроскопия мазка, окрашенного по Граму, из осадка положительной пробы крови. Так, в настоящее время появились запатентованные методики ускоренной идентификации микроорганизмов из об-

разца крови непосредственно методом MALDI-TOF масс-спектрометрии [28, 29].

## ВЫВОДЫ

1. У недоношенных детей из крови преимущественно выделяли коагулазоотрицательные стафилококки (62,2%), *E. coli* (6,6%) и *S. agalactiae* (5,7%), у доношенных – коагулазоотрицательные стафилококки (47,1%), *S. aureus* (17,6%), *K. pneumoniae* (12,9%).

2. При посеве на питательные среды с аэробной системой культивирования среди грибов рода *Candida* в крови обнаруживали виды *C. albicans* и *C. lusitanae*. Из ликвора в одном случае выявили *C. albicans*.

3. Для первичной диагностики неонатального сепсиса, особенно у недоношенных детей, считаем возможным и достаточным сбор одного миллилитра крови и ликвора в один аэробный педиатрический коммерческий флакон один раз в день. Сбор более одного миллилитра крови для гемокультивирования и увеличения кратности посева более одного раза в сутки необходимо проводить строго по клиническим показаниям и с предварительной оценкой состояния новорожденного лечащим врачом.

4. Использование современных автоматизированных систем масс-спектрометрической идентификации возбудителя значительно улучшают диагностику неонатального сепсиса различной этиологии, а также позволяют выявить микст-инфекции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Халиуллина С.В. и др. Клинико-эпидемиологические особенности и органная дисфункция при неонатальном сепсисе. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2019; 64 (5): 176-182. [Khaertynov H.S., Anokhin V.A., Khaliullina S.V., et al. Clinical and epidemiological features and organ dysfunction in neonatal sepsis. Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics. 2019; 64 (5): 176-182 (In Russ)]. doi.org/10.21508/1027-4065-2019-64-5-176-182
2. Дмитриев А.В., Залатников А.Л. Неонатальный сепсис: современные диагностические возможности. Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. 2022; 101 (1): 155-160. [Dmitriev A.V., Platnikov A.L. Neonatal sepsis: modern diagnostic capabilities. Pediatrics named after G.N. Speransky. 2022; 101 (1): 155-160. (In Russ)].
3. Лекманов А.У., Миронов П.И., Александрович Ю.С. и др. Сепсис у детей: федеральные клинические рекомендации (проект). Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии; 2021. 11 (2): 241–292. [Lekmanov A.U., Mironov P.I., Alexandrovich Yu.S., et al. Sepsis in children: federal clinical guidelines (draft). Russian Bulletin of Pediatric Surgery, Anesthesiology and Intensive Care; 2021. 11 (2): 241-292. (In Russ)]. doi.org/10.17816/psaic969
4. Александрович Ю.С., Иванов Д.О., Павловская Е.Ю. и др. Особенности микробиоты у новорожденных в критическом состоянии при поступлении в ОРИТ специализированного стационара. Вестник анестезиологии и реаниматологии. 2022; 19 (2): 56-63. [Alexandrovich Yu.S., Ivanov D.O., Pavlovskaya E.Yu., et al. Features of the microbiota in newborns in critical condition upon admission to the ICU of a specialized hospital. Bulletin of Anesthesiology and Intensive Care. 2022; 19 (2): 56-63. (In Russ)]. doi.org/10.21292/2078-5658-2022-19-2-56-63.
5. Мухин В.Е., Панкратьева Л.Л., Володин Н.Н. Неонатальный сепсис: проблемы лабораторной верификации диагноза. Педиатрия. 2018; 97 (1): 141–146. [Mukhin V.E., Pankratieva L.L., Volodin N.N. Neonatal sepsis: problems of laboratory verification of diagnosis. Pediatrics. 2018; 97 (1): 141–146. (In Russ)]. doi.org/10.24110/0031-403X-2018-97-1-141-146

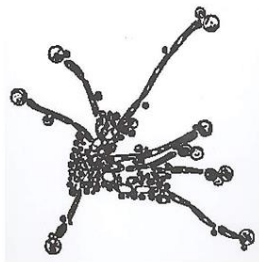
6. Вельков В.В. Неонатальный сепсис: гемокультуры, биомаркеры, ранняя диагностика и мониторинг. АО «ДИА-КОН», г. Пущино, Московская область, 2017; 38 с. [Velkov V.V. Neonatal sepsis: hemocultures, biomarkers, early diagnosis and monitoring. JSC "DEACON", Pushchino, Moscow region, 2017; 38 p. (In Russ)].
7. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. (методические указания 4.2.2039-05). М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2005. 105 с. [Techniques for collecting and transporting biomaterials to microbiological laboratories. (methodological guidelines 4.2.2039-05). Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2005. 105 p. (In Russ)].
8. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов (методические указания), 2017. 32 с. [Laboratory diagnostics of meningococcal infection and purulent bacterial meningitis (guidelines), 2017. 32 p. (In Russ)].
9. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (клинические рекомендации. Версия-2021-01). М.: Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии; 2021; 255 с. [Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy (Clinical guidelines. Version-2021-01). Moscow: Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy; 2021; 255 p. (In Russ)].
10. Chappell-Campbell L., Schwenk H.T., Capdarest-Arest N., et al. Reporting and Categorization of Blood Culture Contaminants in Infants and Young Children: A Scoping Review. *J. Pediatric Infect Dis Soc.* 2020; 9 (2): 110-117. doi: 10.1093/jpids/piy125
11. Lalezari A., Cohen M.J., Svinik O., et al. A simplified blood culture sampling protocol for reducing contamination and costs: a randomized controlled trial. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020; 26 (4): 470-474. doi: 10.1016/j.cmi.2019.09.005
12. Coggins S.A., Harris M.C., Srinivasan L. Dual-site blood culture yield and time to positivity in neonatal late-onset sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2022; 107 (5): 475-480. doi: 10.1136/archdischild-2021-322844
13. Dierikx T.H., van Kaam A.H.L.C., de Meij T.G.J., et al. Umbilical cord blood culture in neonatal early-onset sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr. Res.* 2022; 92 (2): 362-372. doi: 10.1038/s41390-021-01792-0
14. Quinones Cardona V., Lowery V., Cooperberg D., et al. Eliminating contamination in umbilical cord blood culture sampling for early-onset neonatal sepsis. *Front. Pediatr.* 2021; 20 (9): 710712. doi: 10.3389/fped.2021.794710
15. Miller J.M., Binnicker M.J., Campbell S., et al. Guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2024 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin. Infect. Dis.* 2024; 5: 104. doi: 10.1093/cid/ciae104
16. Puopolo K.M., Mukhopadhyay S., Frymoyer A., et al. The term newborn: early-onset sepsis. *Clin. Perinatol.* 2021; 48: 471-84. doi: 10.1016/j.clp.2021.05.003
17. Dhudasia M.B., Flannery D.D., Pfeifer M.R., et al. Updated guidance: prevention and management of perinatal group B streptococcus infection. *Neoreviews.* 2021; 22: e177-88. doi: 10.1542/neo.22-3-e177
18. Kuzniewicz M.W., Mukhopadhyay S., Li S., et al. Time to positivity of neonatal blood cultures for early-onset sepsis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2020; 39: 634-40. doi: 10.1097/INF.0000000000002632
19. Dhaliwal M., Daneman N. Utility of differential time to positivity in diagnosing central line associated bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 2023; 77 (3): 428-37. doi: 10.1093/cid/ciad225
20. Keighley C., Cooley L., Morris A.J., et al. Consensus guidelines for the diagnosis and management of invasive candidiasis in haematology, oncology and intensive care settings, 2021. *Intern. Med. J.* 2021; 51 (7): 89-117. doi: 10.1111/imj.15589. PMID: 34937142
21. Clancy C.J., Nguyen M.H. Diagnosing invasive candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56: e01909-17. doi: 10.1128/JCM.01909-17
22. Aboalqez A., Deindl P., Ebenebe C.U., et al. Blood loss in very low birth weight infants and transfusion of packed red blood cells in a tertiary care neonatal intensive care unit. *Children.* 2021; 8: 847. doi: 10.3390/children8100847
23. Counsilman C.E., Heeger L.E., Tan R., et al. Iatrogenic blood loss in extreme preterm infants due to frequent laboratory tests and procedures. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2021; 34 (16): 2660-2665. doi:10.1080/14767058.2019.1670800
24. Baron E.J., Weinstein M.P., Dunne W.M. et al. Blood cultures IV. ASM Press, 2005.
25. Ansong A.K., Smith P.B., Benjamin D.K., et al. Group B streptococcal meningitis: cerebrospinal fluid parameters in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Early Hum. Dev.* 2009; 85: S5-S7. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2009.08.003
26. Baker C.J., Byington C.L., Polin R.A. Policy statement – Recommendations for the prevention of perinatal group B streptococcal (GBS) disease. *Pediatrics.* 2011; 128 (3): 611-6. doi: 10.1542/peds.2011-1466
27. Smith P.B., Garges H.P., Cotton C.M., et al. Meningitis in preterm neonates: importance of cerebrospinal fluid parameters. *Am. J. Perinatol.* 2008; 25: 421-426. doi: 10.1055/s-0028-1083839

28. Халиулин А.В., Лямин А.В., Гусякова О.А. и др. Патент RU 2766185 C1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/04, G01N 33/48. Способ пробоподготовки для ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гематологических культур: № 2021121607: заявл. 20.07.2021: опубл. 09.02.2022 [Khaliulin A.V., Lyamin A.V., Gusyakova O.A., et al. Patent RU 2766185 C1 Russian Federation, IPC C12Q 1/04, G01N 33/48. Sample preparation method for accelerated identification of microorganisms from positive hematological cultures: No. 2021121607: application 20.07.2021: publ. 09.02.2022 (In Russ)].

29. Халиулин А.В., Лямин А.В., Гусякова О.А. и др. Оценка возможности повышения качества результатов ускоренной идентификации микроорганизмов из положительных гемокультур. Инфекция и иммунитет. 2023; 13 (2): 369-375. [Khaliulin A.V., Lyamin A.V., Gusyakova O.A. et al Assessment of the possibility of improving the quality of the results of accelerated identification of microorganisms from positive hemocultures. Infection and immunity. 2023; 13 (2): 369-375. (In Russ)]. doi.org/10.15789/2220-7619-AAP-2028

*Поступила в редакцию журнала 02.07.24*

*Принята к печати 04.10.24*





**Для цитирования:** Иванова Е.В., Чайникова И.Н., Михайлова И.В., Бекпергенова А.В., Бондаренко Т.А., Филиппова Ю.В. Фунгицидная и биопленкоингибирующая активность водных экстрактов лекарственных растений, содержащих танины. Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (3): 64-71. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-64-71

**For citation:** Ivanova E.V., Chainikova I.N., Mikhailova I.V., Bekpergenova A.V., Bondarenko T.A., Filippova Yu.V. Fungicidal and biofilm-inhibiting activity of aqueous extracts of medicinal plants containing tannins. Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (3): 64-71. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-64-71

## ФУНГИЦИДНАЯ И БИОПЛЕНКОИНГИБИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ТАНИНЫ

<sup>1,2</sup>Иванова Е.В. (зав. лаб.; доцент)\*,  
<sup>2</sup>Чайникова И.Н. (профессор кафедры),  
<sup>2</sup>Михайлова И.В. (зав. кафедрой),  
<sup>1</sup>Бекпергенова А.В. (с.н.с.); <sup>1</sup>Бондаренко Т.А.  
(н.с.), <sup>2</sup>Филиппова Ю.В. (доцент)

<sup>1</sup>Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза;

<sup>2</sup>Оренбургский государственный медицинский университет (кафедра фармацевтической химии; кафедра нормальной физиологии), Оренбург, Россия

Дубильные вещества отвечают за ряд биологических эффектов лекарственных растений, включая антимикробную и фунгицидную активность. Вместе с тем, исследования биопленкоингибирующей активности лекарственных растений в отношении патогенных микроорганизмов единичны. Целью работы было изучение уровня танинов и наличия фунгицидной и биопленкоингибирующей активности у лекарственных растений *Fragaria vesca* L., *Tanacetum vulgare* L., *Crataegus sanguinea* L., *Equisetum arvense* L. и *Achillea millefolium* L. Анализ содержания дубильных веществ в водных экстрактах лекарственных растений проводили титриметрическим методом. Для определения фунгицидной активности экстрактов использовали метод микроразведений, биопленкоингибирующей активности – фотометрическим методом. Установлено, что протестированные водные экстракты *Fragaria vesca* L., *Tanacetum vulgare* L., *Crataegus sanguinea* L. обладают значительным содержанием дубильных веществ и противогрибковой активностью (фунгицидной и биопленкоингибирующей) в отношении *C. albicans* по сравнению с экстрактами *Equisetum arvense* L. и *Achillea millefolium* L. Водные экстракты *Fragaria vesca* L., *Tanacetum vulgare* L. и *Crataegus sanguinea* L. могут быть перспективны для разработки новых противогрибковых средств природного происхождения, обладающих биопленкоингибирующей активностью.

**Ключевые слова:** биопленка, *Candida albicans*, лекарственные растения, биопленкоингибирующая активность, танины

## FUNGICIDAL AND BIOFILM- INHIBITING ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACTS OF MEDICINAL PLANTS CONTAINING TANNINS

<sup>1,2</sup>Ivanova E.V. (head of the laboratory; associate professor), <sup>2</sup>Chainikova I.N. (professor of the department), <sup>2</sup>Mikhailova I.V. (head of the department), <sup>1</sup>Bekpergenova A.V. (senior scientific researcher), <sup>1</sup>Bondarenko T.A. (scientific researcher), <sup>2</sup>Filippova Yu.V. (associate professor)

<sup>1</sup>Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis; <sup>2</sup>Orenburg State Medical University (Department of Pharmaceutical Chemistry; Department of Normal Physiology), Orenburg, Russia

Tannins are responsible for some of the biological effects of medicinal plants, including antimicrobial and fungicidal activity. At the same time, studies of the biofilm-inhibiting activity of medicinal plants against pathogenic microorganisms are rare. The aim of the work was to study the level of tannins and the presence of fungicidal and biofilm-inhibiting activity in medicinal plants *Fragaria vesca* L., *Tanacetum vulgare* L., *Crataegus sanguinea* L., *Equisetum arvense* L. and *Achillea millefolium* L. The analysis of the content of tannins in aqueous extracts of medicinal plants was carried out by the titrimetric method. The fungicidal activity of the extracts was determined using the micro-dilution method, the biofilm inhibitory activity was determined by photometric method. It was found that the tested aqueous extracts of *Fragaria vesca* L., *Tanacetum vulgare* L., *Crataegus sanguinea* L. have a significant content of tanning agents and antifungal activity (fungicidal and biofilm-inhibiting) against *C. albicans* compared to extracts of *Equisetum arvense* L. and *Achillea millefolium* L. Aqueous extracts of *Fragaria vesca* L., *Tanacetum vulgare* L. and *Crataegus sanguinea* L. may be promising for the development of new antifungal agents of natural origin with biofilm-inhibiting activity.

**Key words:** biofilm, *Candida albicans*, medicinal plants, biofilm-inhibiting activity, tannins

\* Контактное лицо: Иванова Елена Валерьевна,  
e-mail: walerewna13@gmail.com

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема поиска новых препаратов, способных обладать не только антибактериальной и противогрибковой активностью, но и антибиопленочным действием, в значительной степени определяет интерес к изучению лекарственных растений, являющихся источником широкого спектра биологически активных метаболитов [1]. Фармацевтический потенциал растений, начиная от антиоксидантных, антимикробных и антихолинэстеразных до нейропротекторных и антипролиферативных, широк и многообразен. Кроме того, растения служат источниками метаболитов, которые могут ингибировать или разрушать биопленки и подавлять системы чувства кворума (QS) [2]. Их эффективность обусловлена разным химическим составом и в первую очередь вторичными метаболитами, различающимися по типу и количеству у разных растений и проявляющими разнообразную биологическую активность [3].

Танины – это производные полифенолов с высокой молекулярной массой (МВТ) (500-30 000 Да), распространенные по всему растительному миру. Обнаружено, что танины подавляют рост бактерий, используя различные механизмы, включая хелатирование железа, ингибирование синтеза клеточной стенки, разрушение клеточной мембраны и ингибирование путей биосинтеза жирных кислот [4]. Танины могут действовать как ингибиторы чувства кворума и ослаблять экспрессию генов факторов вирулентности, таких как биопленкообразование, ферменты, адгезины, подвижность и токсинообразование [5].

Способности грибов *Candida albicans* образовывать биопленки, проникать через естественные барьеры организма, попадать в кровоток и поражать различные органы вносят вклад в патогенез внутрибольничных инфекций, инвазивного кандидоза (инфекция кровотока/кандидемия) и с учетом факторов хозяина угрожают жизни пациентов [6-8]. Персистирующие (длительно протекающие, хронические) инфекции, связанные с биопленкой, являются высоко распространенными (80%) и трудно поддаются лечению из-за множественной лекарственной устойчивости патогенов бактериальной и грибковой природы [9]. Низкая эффективность различных методов лечения и токсичность доступных антибиотиков и противогрибковых препаратов *in vivo* обуславливают необходимость поиска и разработки эффективных природных средств с антибиопленочными свойствами, в том числе из растений [10]. Показано, что экстракты и средства против биопленок на основе натуральных продуктов более эффективны, чем химически синтезированные аналоги, из-за их относительно нетоксичной природы, биосовместимости и доступности [11, 12].

Разработка новых веществ, обладающих активностью против биопленок *C. albicans*, имеет первостепенное значение для расширения существующих в настоящее время ограниченных возможностей эффективного лечения кандидозных инфекций, сопровождающихся образованием биопленок. *C. albicans* по-прежнему считается одним из наиболее значимых видов микробиоты человека [13-15] и является частью микобиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), влагалища и полости рта большинства здоровых людей. Вместе с тем, неопровержимые данные свидетельствуют о том, что основным источником диссеминированных инфекций, вызванных *C. albicans*, является ЖКТ [16]. *C. albicans* – условно-патогенный микроорганизм, вызывающий инфекции, начиная от поверхностных и заканчивая более опасными для жизни диссеминированными инфекциями, возникающими у пациентов с нарушениями иммунной системы и/или микробиоты слизистых оболочек.

Лекарственные растения, используемые в нашей работе, широко применяются в медицинской практике, имеют коммерческое значение, особенно для фармацевтической, пищевой, санитарно-косметической и парфюмерной промышленности, во многом благодаря наличию широкого спектра биологически-активных соединений. Антисептическими, смягчающими и дерматологическими защитными свойствами обладает земляника лесная (*Fragaria vesca*), противовоспалительным, антиоксидантным, антибактериальным и цитотоксическим действием – эфирное масло *Tanacetum vulgare*. Боярышник (*Crataegus* L.) наиболее часто применяют для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, у хвоща полевого (*Equisetum arvense* L.) антибактериальное действие выявлено только в отношении патогенных грамположительных кокков. Тысячелистник (*Achillea millefolium* L. s.l.) традиционно используют при лечении воспалительных и спазматических желудочно-кишечных расстройств, гепато-билиарных заболеваний и воспалительных процессов различной локализации.

**Цель работы:** изучить уровень танинов и наличие фунгицидной и биопленкоингибирующей активности у лекарственных растений *Fragaria vesca* L., *Tanacetum vulgare* L., *Crataegus sanguinea* L., *Equisetum arvense* L. и *Achillea millefolium* L.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Получение экстрактов лекарственных трав.*

Объектами исследования служили водные извлечения (1:10) промышленных образцов 5 видов сырья: травы тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.), листьев земляники лесной (*Fragaria vesca* L.), хвоща полевого (*Equisetum arvense* L.), плодов боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* L.) и цветков пижмы обыкновенной.

венной (*Tanacetum vulgare* L.), поступающих в аптечную сеть г. Оренбурга. Водные извлечения из лекарственного растительного сырья готовили в соответствии с методикой Государственной фармакопеи XI (вып. 1, стр. 147). Каждый образец экстрагировали нагреванием в воде в количестве 8-10-кратной массы травы в течение 3 часов при температуре 115 °С (термобаня «ЛОИП ЛБ-2\*\*», Россия). После кипячения экстракт фильтровали с помощью стандартных тестовых сит (150,0 мкм) («Retsch», Германия) и лиофилизировали до порошка. Образец каждого порошкообразного растительного лекарственного средства массой 50,0 мг растворяли в 1,0 мл дистиллированной воды и перед использованием хранили при -20 °С.

*Определение содержания танинов в водных экстрактах растений.*

Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье проводили титриметрическим методом в пересчете на танин согласно общим фармакопейным статьям (ОФС.1.5.3.0008.15). 25,0 мл настоя отмеряли в коническую колбу объемом 1,0 л и добавляли 25,0 мл раствора индиго и 750,0 мл дистиллированной деионизированной воды. Для титрования использовали 0,1% водный раствор  $KMnO_4$ , добавляли каплями до появления у раствора золотисто-желтого цвета. Стандартный раствор индигокармина готовили следующим образом: 6,0 г индигокармина растворяли в 500,0 мл дистиллированной деионизированной воды при нагревании, после охлаждения добавляли 50,0 мл 95,0-97,0%  $H_2SO_4$ , раствор разбавляли до 1,0 л и фильтровали. Проводили холостые испытания титрованием смеси 25,0 мл раствора индигокармина и 750,0 мл дистиллированной деионизированной  $H_2O$ . Все образцы были проанализированы в 20 дублях.

*Определение фунгицидной активности водных экстрактов лекарственных трав в отношении *S. albicans*.*

С помощью метода микроразведения проведена оценка фунгицидной активности лекарственных растений на основании определения минимальной ингибирующей концентрации (МИС) и минимальной фунгицидной концентрации (МФС) пяти водных экстрактов на 30 штаммах *S. albicans*. Инокуляты дрожжевых грибов готовили из 12-часовых бульонных культур, суспензии доводили до мутности 0,5 McF. Экстракты лекарственных трав сначала разводили до концентрации 100,0 мг/мл, подлежащей тестированию, а затем осуществляли серийные двукратные разведения в 5,0 мл питательного бульона с концентрациями в диапазоне 0,8-100,0 мг/мл. 96-луночные планшеты готовили путем внесения в каждую лунку 95,0 мкл питательного бульона и 5,0 мкл инокулята. В первую лунку добавляли аликвоту

по 100,0 мкл исходных растворов каждого экстракта растительного лекарственного средства, затем по 100,0 мкл серийных разведений переносили в 8 последовательных лунок. Последнюю лунку использовали в качестве отрицательного контроля, содержащего 195,0 мкл питательного бульона без экстрактов лекарственных трав и 5,0 мкл инокулята. Конечный объем в каждой лунке составлял 200,0 мкл. Планшеты инкубировали при 37 °С в течение 24 часов. МИС определяли как самую низкую концентрацию соединений, подавляющую рост микроорганизмов. Значения МФС устанавливали путем культивирования 20,0 мкл из лунок планшета на среде «Bi.G.G.Y. Agar». Значения МФС определялись как самая низкая концентрация образца, которая приводила к гибели  $\geq 99,9\%$  исходного инокулята. Исследование выполняли в трех параллелях.

*Определение биопленкоингибирующей активности водных экстрактов лекарственных трав в отношении *S. albicans*.*

Для определения биопленкоингибирующей активности лекарственных растений концентрацию экстракта разводили в два раза от МИС (это минимальная субингибиторная концентрация (SIC), мг/мл) и использовали инокулят  $1 \times 10^4$  КОЕ/мл. Образование биопленок изучали фотометрическим методом по определению способности грибов прикрепляться к поверхности 96-луночного полистиролового планшета («Thermo Scientific», США) с последующим окрашиванием кристаллическим фиолетовым. Измерение оптической плотности проводили с помощью фотометра «ELx808» («BioTek», США) на длине волны 570 нм. Степень образования биопленок штаммами выражали в условных единицах ( $OD_{570}$ ), которые представляли собой оптическую плотность бульона после роста штамма относительно оптической плотности питательного бульона.

Процент индекса ингибирования биопленки (ИИБ) в присутствии водных экстрактов лекарственных растений рассчитывали следующим образом [17]:

$$\text{ИИБ}(\%) = 100 - \left( \frac{\text{ОП опыт}}{\text{ОП контроль}} \times 100 \right), \text{ где}$$

ОП опыт – оптическая плотность дрожжевых грибов в лунках с лекарственными растениями; ОП контроль – оптическая плотность дрожжевых грибов в лунках без лекарственных растений (контроль).

*Статистический анализ.*

Результаты проведенных исследований обрабатывали методами вариационной статистики с помощью пакета прикладных программ «Microsoft Excel» и «STATISTICA 10.0». Результаты исследований представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – средняя арифметическая,  $m$  – стандартная ошибка средней, а также в виде  $Me$  (Q25;Q75), где  $Me$  – медиана, нижний (Q25)

и верхний (Q75) квартили. Критерий Стьюдента использовали для оценки статистической значимости разницы между контролем и образцами, обработанными каждым экстрактом. Статистически значимым считали значение  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ содержания танинов в водных экстрактах растений позволил установить их наибольшее содержание у *Fragaria vesca* L. и *Tanacetum vulgare* L. (табл. 1).

Таблица 1

Анализ лекарственных растений на содержание танинов (%)

Номер проб	Название лекарственных растений				
	<i>Fragaria vesca</i> L.	<i>Tanacetum vulgare</i> L.	<i>Crataégus sanguinea</i> L.	<i>Equisetum arvense</i> L.	<i>Achillea millefolium</i> L.
1.	5,081	2,628	1,155	0,239	0,693
2.	5,081	5,734	1,386	0,956	0,693
3.	4,619	3,106	1,155	0,000	0,693
4.	5,312	2,389	1,155	0,717	0,923
5.	4,850	6,451	0,924	0,000	0,928
6.	4,619	2,389	1,386	0,717	0,693
7.	4,850	2,867	1,155	0,239	0,693
8.	5,081	2,628	1,617	0,717	0,922
9.	5,312	2,628	1,155	0,000	0,900
10.	5,543	2,389	0,693	0,478	0,923
11.	4,619	2,628	0,693	0,956	0,693
12.	5,312	2,867	1,155	0,478	0,923
13.	5,081	2,628	0,924	0,717	0,923
14.	4,850	2,628	0,924	1,195	0,923
15.	4,850	2,389	1,155	0,239	0,923
16.	4,850	3,106	0,924	0,478	0,693
17.	5,081	3,345	0,924	0,239	0,693
18.	5,081	2,389	0,924	0,478	0,923
19.	5,543	2,389	0,924	0,478	0,693
20.	5,312	2,867	1,386	0,239	0,923
Me	5,04	2,628	1,155	0,478	0,924
[Q25;	4,85;	2,389;	0,924;	0,239;	0,693;
Q75]	5,312	3,046	1,155	0,717	0,924

Уровни дубильных веществ в водных экстрактах *Crataégus sanguinea* L., *Equisetum arvense* L. и *Achillea millefolium* L. были статистически ниже, чем у двух предыдущих лекарственных растений ( $p < 0,05$ ). Дубильные вещества представляют собой важную группу вторичных растительных метаболитов. Считается, что дубильные соединения отвечают за значительную часть биологических эффектов лекарственных растений, включая антимикробную и фунгицидную активность. В связи с этим на следующем этапе исследований была оценена эффективность водных экстрактов изученных лекарственных растений против *C. albicans* по показателям MIC и MFC с использованием методики микроразведения в бульоне.

Анализ противогрибковой активности экстрактов лекарственных растений представлен в таблице 2.

Таблица 2

MIC, SIC и MFC водных экстрактов лекарственных растений в отношении штаммов *C. albicans*

Название лекарственных растений	<i>C. albicans</i> (n=30)		
	MIC (mg/mL)	SIC (mg/mL)	MFC (mg/mL)
<i>Fragaria vesca</i> L.	6,25-12,5	3,12-6,25	25,0-50,0
<i>Tanacetum vulgare</i> L.	6,25-12,5	3,12-6,25	25,0-50,0
<i>Crataégus sanguinea</i> L.	12,5-25,0	6,25-12,5	50,0-100,0
<i>Equisetum arvense</i> L.	50,0-100,0	25,0-50,0	-
<i>Achillea millefolium</i> L.	50,0-100,0	25,0-50,0	-

Водные экстракты *Fragaria vesca* L. и *Tanacetum vulgare* L. показали выраженную противогрибковую активность. Как видно из таблицы 2, наибольшее значения MIC отмечали у *Fragaria vesca* L. и *Tanacetum vulgare* L. Наименьший уровень MIC, по сравнению с другими экстрактами, наблюдали у *Equisetum arvense* L. и *Achillea millefolium* L. Значения MFC для водных экстрактов *Fragaria vesca* L. и *Tanacetum vulgare* L. составили 25,0-50,0 мг/мл, что свидетельствовало об их выраженном антифунгицидном влиянии на дрожжевые грибы. Напротив, для *Equisetum arvense* L. и *Achillea millefolium* L. уровень MFC не определялся, поскольку дрожжевые грибы в присутствии экстрактов сохраняли способность к росту и размножению.

Для выявления биопленкоингибирующей активности водных экстрактов лекарственных растений предварительно была проведена оценка способности исследуемых штаммов *C. albicans* к биопленкообразованию. Установлено, что  $80,0 \pm 1,0\%$  изолятов были способны образовывать биопленку со значениями оптической плотности в диапазоне от  $0,328 \pm 0,04$  OD<sub>570</sub> до  $0,957 \pm 0,09$  OD<sub>570</sub>, тогда как у  $20,0 \pm 1,0\%$  штаммов образования биопленки не отмечали (значения менее  $0,100$  OD<sub>570</sub>).

Биопленкоингибирующая активность водных экстрактов лекарственных трав представлена в таблице 3.

Штаммы *C. albicans*, использованные на этом этапе исследования, были выбраны из изолятов, способных формировать биопленки на полистироловых планшетах (24 штамма). Водные экстракты *Fragaria vesca* L., *Tanacetum vulgare* L., *Crataégus sanguinea* L. и *Achillea millefolium* L. оказывали ингибирующее влияние на процесс биопленкообразования (БПО) в отношении всех 24 изученных штаммов грибов ( $p < 0,05$ ).

Таблица 3

Биопленкоингибирующая активность водных экстрактов лекарственных растений в отношении штаммов *C. albicans*

№	БПО штаммов OD <sub>570</sub> ± SD контроль	<i>Fragaria vesca</i> L. OD <sub>570</sub> ± SD опыт	ИИБ (%)	<i>Tanacetum vulgare</i> L. OD <sub>570</sub> ± SD опыт	ИИБ (%)	<i>Crataegus sanguinea</i> L. OD <sub>570</sub> ± SD опыт	ИИБ (%)	<i>Equisetum arvense</i> L. OD <sub>570</sub> ± SD опыт	ИИБ (%)	<i>Achillea millefolium</i> L. OD <sub>570</sub> ± SD опыт	ИИБ (%)
1	0,955 ± 0,086	0,085 ± 0,003	91,1	0,044 ± 0,001	95,4	0,267 ± 0,019	72,0	0,901 ± 0,092	5,70	0,605 ± 0,018	36,6
2	0,601 ± 0,101	0,121 ± 0,005	79,9	0,021 ± 0,002	96,5	0,195 ± 0,003	67,6	0,597 ± 0,044	0,00	0,421 ± 0,047	30,0
3	0,867 ± 0,008	0,048 ± 0,007	94,5	0,016 ± 0,001	98,1	0,309 ± 0,022	64,4	0,615 ± 0,025	29,0	0,589 ± 0,124	32,0
4	0,553 ± 0,015	0,061 ± 0,003	89,0	0,035 ± 0,001	93,7	0,244 ± 0,007	55,8	0,389 ± 0,056	29,7	0,218 ± 0,004	60,6
5	0,718 ± 0,015	0,137 ± 0,004	80,9	0,082 ± 0,003	88,6	0,200 ± 0,031	72,1	0,622 ± 0,100	13,4	0,508 ± 0,121	29,2
6	0,486 ± 0,080	0,038 ± 0,001	92,1	0,046 ± 0,001	90,5	0,178 ± 0,005	63,4	0,409 ± 0,075	15,8	0,221 ± 0,051	54,5
7	0,619 ± 0,061	0,129 ± 0,001	79,2	0,022 ± 0,001	96,4	0,168 ± 0,007	72,9	0,532 ± 0,041	14,0	0,452 ± 0,102	27,0
8	0,577 ± 0,055	0,189 ± 0,005	67,2	0,141 ± 0,002	75,6	0,331 ± 0,041	42,6	0,451 ± 0,061	21,8	0,209 ± 0,184	63,8
9	0,708 ± 0,105	0,135 ± 0,001	80,9	0,171 ± 0,001	75,8	0,334 ± 0,022	52,8	0,691 ± 0,098	2,40	0,478 ± 0,121	32,5
10	0,624 ± 0,015	0,111 ± 0,003	82,2	0,081 ± 0,003	87,0	0,244 ± 0,045	60,9	0,508 ± 0,034	18,6	0,488 ± 0,087	22,0
11	0,881 ± 0,110	0,089 ± 0,001	89,9	0,094 ± 0,001	89,3	0,328 ± 0,050	62,8	0,695 ± 0,120	21,1	0,644 ± 0,136	26,9
12	0,425 ± 0,031	0,056 ± 0,003	86,8	0,047 ± 0,001	88,9	0,164 ± 0,011	61,4	0,275 ± 0,061	35,3	0,302 ± 0,018	28,9
13	0,328 ± 0,040	0,018 ± 0,001	94,5	0,033 ± 0,001	89,9	0,057 ± 0,015	82,6	0,161 ± 0,057	50,9	0,108 ± 0,032	67,0
14	0,724 ± 0,100	0,169 ± 0,003	76,7	0,125 ± 0,002	82,7	0,437 ± 0,050	39,6	0,691 ± 0,110	4,55	0,412 ± 0,121	43,1
15	0,621 ± 0,084	0,048 ± 0,008	92,3	0,113 ± 0,001	81,8	0,211 ± 0,018	66,0	0,544 ± 0,031	12,4	0,521 ± 0,033	16,1
16	0,581 ± 0,104	0,191 ± 0,002	67,1	0,038 ± 0,001	93,5	0,302 ± 0,024	48,0	0,467 ± 0,088	19,6	0,240 ± 0,115	58,7
17	0,367 ± 0,074	0,069 ± 0,008	81,2	0,045 ± 0,001	87,7	0,191 ± 0,011	48,0	0,241 ± 0,043	34,3	0,281 ± 0,062	23,4
18	0,884 ± 0,016	0,087 ± 0,004	90,2	0,117 ± 0,005	86,8	0,271 ± 0,022	69,3	0,502 ± 0,066	43,2	0,583 ± 0,044	34,0
19	0,924 ± 0,121	0,116 ± 0,005	87,4	0,124 ± 0,013	86,6	0,391 ± 0,080	57,7	0,881 ± 0,134	4,65	0,745 ± 0,113	19,4
20	0,957 ± 0,031	0,221 ± 0,011	76,9	0,137 ± 0,011	85,7	0,448 ± 0,081	53,2	0,940 ± 0,125	1,77	0,806 ± 0,121	15,8
21	0,739 ± 0,082	0,043 ± 0,001	94,1	0,061 ± 0,001	91,7	0,257 ± 0,062	65,2	0,653 ± 0,028	11,6	0,508 ± 0,088	31,3
22	0,622 ± 0,041	0,118 ± 0,003	81,0	0,042 ± 0,001	93,2	0,191 ± 0,056	69,3	0,605 ± 0,014	2,7	0,385 ± 0,051	38,1
23	0,825 ± 0,144	0,109 ± 0,007	86,8	0,055 ± 0,003	93,3	0,401 ± 0,034	51,4	0,501 ± 0,171	39,3	0,708 ± 0,106	14,2
24	0,938 ± 0,132	0,331 ± 0,015	64,7	0,409 ± 0,001	56,4	0,581 ± 0,150	38,1	0,793 ± 0,159	15,5	0,704 ± 0,141	24,9
ИИБ(%) Me[Q25; 75]		84,5 [76,7; 94,5]		87,7 [81,8; 98,1]		59,9 [51,4; 72,0]		15,75 [11,6; 19,6]		30,7 [22,0; 43,1]	

Так, добавление водных экстрактов *Fragaria vesca* L. и *Tanacetum vulgare* приводило к снижению уровня БПО, соответственно, у 11 штаммов (45,8%) и 16 штаммов (66,7%) до значений менее 0,100 ед., что можно интерпретировать как отсутствие признака. В среднем значения индекса ингибирования биопленок (ИИБ) штаммов *C. albicans* для водного экстракта *Fragaria vesca* L. составляли 84,5% [76,7; 94,5], а для *Tanacetum vulgare* L. – 87,7% [81,8; 98,1]. Для *Crataegus sanguinea* L. наблюдали биопленкоингибирующую активность в диапазоне от 38,1% до 82,6% (59,9 % [51,4; 72,0]). Водные экстракты хвоща полевого оказывали антибиопленочное влияние в отношении 70,8% изолятов (17 штаммов). Процент ингибирования регистрировали в диапазоне от 12,4% до 50,9% (15,75% [11,6; 19,6]). Для водных экстрактов *Achillea millefolium* L. процент ингибирования составлял 14,2-67,0% для биопленок *C. albicans* – 30,7% [22,0; 43,1]).

Выявленные эффекты противогрибкового влияния исследуемых водных экстрактов в отношении роста, размножения и биопленкообразующей способности штаммов *C. albicans* свидетельствуют, что данные лекарственные растения/фитопрепараты, имеющие широкий спектр применения в традиционной медицине, могут быть перспективны при разработке новых лекарственных препаратов и биологи-

чески активных соединений в борьбе с кандидозной инфекцией.

Результаты работы позволили установить, что уровень танинов в изученных водных экстрактах соотносится с их выраженными фунгицидными и биопленкоингибирующими свойствами в отношении штаммов *C. albicans*. Наиболее выраженные противогрибковые эффекты отмечали у трех лекарственных растений – *Fragaria vesca* L., *Tanacetum vulgare* L. и *Crataegus sanguinea* L., что открывает перспективу их использования для разработки новых противогрибковых средств природного происхождения с биопленкоингибирующей активностью.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интерес к поиску препаратов с фунгицидной и антибиопленочной активностью из группы растительных препаратов определяется тем, что растения тесно связаны симбиозом с различными микроорганизмами и поэтому имеют эволюционно выработанную специфическую регуляцию, позволяющую элиминировать фитопатогенные виды микробов. Как правило, антибактериальной активностью обладают вторичные метаболиты растений – флавоноиды, алкалоиды, терпены и танины. Вместе с тем, при исследовании тотальных растительных экстрактов нельзя не учитывать влияние таких соединений, как

сахара и аминокислоты, которые также способны влиять на жизнедеятельность микроорганизмов [18].

В настоящей работе изучено 30 кишечных изолятов *C. albicans*, в отношении которых тестировали антибиопленочную активность с оценкой МИС и МФС пяти водных экстрактов лекарственных растений, в которых предварительно определяли уровень танинов. При исследовании уровня танинов и наличия фунгицидной и биопленкоингибирующей активности у лекарственных растений *Fragaria vesca* L., *Tanacetum vulgare* L., *Crataegus sanguinea* L., *Equisetum arvense* L. и *Achillea millefolium* L. активность МФС в отношении изолятов *C. albicans* наблюдали только в случае *Fragaria vesca* L., *Tanacetum vulgare* L. и *Crataegus sanguinea* L., тогда как экстракты *Equisetum arvense* L. и *Achillea millefolium* L. не оказывали фунгицидного влияния. Показатель МИС водных экстрактов в отношении изолятов *C. albicans* также был более выражен у *Fragaria vesca* L., *Tanacetum vulgare* и *Crataegus sanguinea* L. В то же время при оценке антибиопленочной активности водных экстрактов выявили, что *Fragaria vesca* L. и *Tanacetum vulgare* L. обладают самой высокой способностью ингибирования биопленок в отношении *C. albicans*, далее следует *Crataegus sanguinea* L. Судя по химической специфичности, наибольшая противогрибковая активность *Fragaria vesca* L., *Tanacetum vulgare* L. и *Crataegus sanguinea* L., возможно, обусловлена высоким уровнем дубильных веществ, в частности танинов (1,155-5,04%), содержащихся в водных экстрактах этих растений.

Обсуждая возможные механизмы, лежащие в основе полученных результатов, следует отметить, что виды *Candida* обладают несколькими факторами вирулентности, такими как: образование гиф и биопленок, продукция липаз, протеаз и фосфолипаз. Морфогенетическая конверсия (способность обратимо переключаться между дрожжевой, мицелиальной и псевдомицелиальной формами) играет ключевую роль в развитии биопленки и патогенности *C. albicans*, поскольку гифы и псевдогифы могут проникать в эпителиальные клетки, вызывать повреждение тканей и являются необходимым условием для проявления патогенности и образования биопленки [19]. Описаны регуляторные гены, которые контролируют морфологию клеток, образование нитевидных форм и биопленки [20]. Развитие биопленки включает взаимосвязанную транскрипционную регуляторную сеть (TRN), состоящую из девяти транскрипционных факторов (TFS). Поэтому ингибирование образования биопленки и вирулентных характеристик грибов рода *Candida* является одним из средств борьбы с длительными персистирующими инфекциями [21]. В настоящее время обсуждаются различные стратегии для подавления филаментации, предотвращения образования биопленки и снижения вирулентности. Эти стратегии включают ингибирование формирования грибами рода *Candida* фила-

ментов с использованием природных или синтетических соединений и их комбинации с другими агентами или наноформулами [22-25].

Разнообразие химической структуры и стабильность, проявляющиеся в группе танинов, позволяют их классифицировать как гидролизуемые, сложные и проантоцианидины [26]. Танины различных групп могут влиять на рост бактерий посредством нескольких механизмов. Прямые пути реализуются путем воздействия на микробный метаболизм через ингибирование окислительного фосфорилирования [26]. Косвенные пути осуществляются путем ингибирования внеклеточных микробных ферментов, а также лишением субстратов, необходимых для роста микроорганизмов. Установлено, что проантоцианидиновые полимерные танины, присутствующие в водной фракции F2 и полуочищенной субфракции F2.4 из коры стебля *S. adstringens* (вид бобовых растений из рода *Stryphnodendron*), обладали противогрибковой активностью *in vitro* в отношении планктонных клеток *C. albicans* и нарушали формирование этими грибами биопленки [27]. Кроме того, показано, что тоннингианин А (ТНА) – флавоноид эллагового танина, широко встречающийся в природных растениях, не только подавляет образование биопленок грибов *C. albicans*, но способен разрушать и зрелые биопленки [28]. Отметим, что растения могут взаимодействовать с кворум-сенсорной системой бактерий, манипулируя тем самым их способностью образовывать биопленки, синтезировать факторы вирулентности или другие соединения, контролируемые этой системой [11]. Вместе с тем, природа и структура многих растительных молекул, препятствующих образованию биопленок бактерий и грибов, до сих пор остается неизвестной.

Все изложенное свидетельствует, что изучение биологически активных соединений, синтезируемых растениями, может привести к разработке новых способов управления жизнедеятельностью грибов. Поэтому растения изучают как источники безопасных агентов, которые могут способствовать повышению активности и снижению токсичности противогрибковой терапии.

Таким образом, растительные экстракты лекарственных растений могут стать обоснованной альтернативой традиционным противомикробным препаратам при лечении грибковых инфекций, поскольку обладают низким уровнем цитотоксичности и не вызывают резистентности у микроорганизмов. Установленная в данном исследовании высокая способность ингибирования биопленок в отношении *C. albicans* водных экстрактов *Fragaria vesca* L., *Tanacetum vulgare* L. и *Crataegus sanguinea* L. обосновывает возможность быть перспективными для разработки новых противогрибковых средств природного происхождения с биопленкоингибирующей активностью.

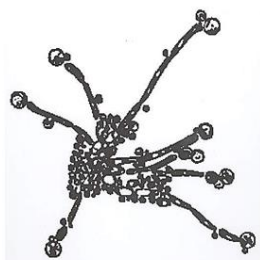
ЛИТЕРАТУРА

1. Guimarães R., Milho C., Liberal Á., et al. Antibiofilm potential of medicinal plants against *Candida* spp. Oral Biofilms: A Review. *Antibiotics* (Basel). 2021; 10 (9): 1142. doi:10.3390/antibiotics10091142
2. Carradori S., Di Giacomo N., Lobefalo M., et al. Biofilm and quorum sensing inhibitors: the road so far. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2020; 30: 917-930. doi: 10.1080/13543776.2020.1830059
3. Melander R.J., Basak A.K., Melander C. Natural products as inspiration for the development of bacterial antibiofilm agents. *Nat. Prod. Rep.* 2020; 37:1454-1477. doi: 10.1039/D0NP00022A
4. Farha A.K., Yang Q.Q., Kim G., et al. Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience.* 2020; 38: 100751. doi:10.1016/j.fbio.2020.100751
5. Ruiz-Duran J., Torres R., Stashenko E.E., Ortiz C. Antifungal and antibiofilm activity of colombian essential oils against different *Candida* strains. *Antibiotics* (Basel). 2023; 12 (4): 668. doi:10.3390/antibiotics12040668
6. Pappas P.G., Lionakis M.S., Arendrup M.C., et al. Invasive candidiasis. *Nat. Rev. Disio Prim.* 2018; 4:1-20. doi: 10.1038/nrdp.2018.26
7. Gonzalez-Lara M.F., Ostrosky-Zeichner L. Invasive candidiasis. *semin. respir. Crit. Care Med.* 2020; 41: 3-12. doi: 10.1055/s-0040-1701215
8. Desrini S., Girardot M., Imbert C., et al. Screening antibiofilm activity of invasive plants growing at the Slope Merapi Mountain, Central Java, against *Candida albicans*. *BMC Complement Med. Ther.* 2023; 23 (1): 232. doi:10.1186/s12906-023-04044-2
9. Damyanova T., Dimitrova P.D., Borisova D., et al. An overview of biofilm-associated infections and the role of phytochemicals and nanomaterials in their control and prevention. *Pharmaceutics.* 2024; 16 (2): 162. doi:10.3390/pharmaceutics16020162
10. Mishra R., Panda A.K., De Mandal S., et al. Natural anti-biofilm agents: strategies to control biofilm-forming pathogens. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 566325. doi:10.3389/fmicb.2020.566325
11. Ghosh S., Lahiri D., Nag M., et al. Phytocompound mediated blockage of quorum sensing cascade in ESKAPE pathogens. *Antibiotics.* 2022; 11: 61. doi: 10.3390/antibiotics11010061
12. Pattnaik S., Mishra M., Singh H., Naik P.K. Novel perspectives on phytochemicals-based approaches for mitigation of biofilms in ESKAPE pathogens: recent trends and future avenues. 2023; 25: 433-454. doi: 10.1016/B978-0-443-19143-5.00005-0
13. Prigitano A., Cavanna C., Passera M., et al. Evolution of fungemia in an Italian region. *J. Mycol. Med.* 2020; 30 (1): 100906. doi:10.1016/j.mycmed.2019.100906
14. Siopi M., Tarpatzi A., Kalogeropoulou E., et al. Epidemiological trends of fungemia in Greece with a focus on candidemia during the recent financial crisis: a 10-year survey in a tertiary care academic hospital and review of literature. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2020; 21; 64 (3): e01516-e01519. doi:10.1128/AAC.01516-19
15. Villanueva F., Veliz J., Canasa K., et al. Characteristics of fungemias in a Peruvian referral center: 5-year retrospective analysis. *Ver. Peru Med. Exp. Salud. Publica.* 2020; 37 (2): 276-281. doi: 0.17843/RPMESP.2020.372.5026
16. Basmaciyan L., Bon F., Paradis T., et al. *Candida albicans* interactions with the host: crossing the intestinal epithelial barrier. *Tissue Barriers.* 2019; 7 (2): 1612661. doi: 10.1080/21688370.2019.1612661
17. Romero C.M., Vivacqua C.G., Abdulhamid M.B., et al. Biofilm inhibition activity of traditional medicinal plants from Northwestern Argentina against native pathogen and environmental microorganisms. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2016; 49 (6): 703-712. doi: 10.1590/0037-8682-0452-2016
18. Zhang N., Wang D., Liu Y., et al. Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant and Soil.* 2014; 374 (1-2): 689-700. doi:10.1007/s11104-013-1915-6
19. Rai L.S., Wijlick L.V., Bougnoux M.E., et al. Regulators of commensal and pathogenic life-styles of an opportunistic fungus-*Candida albicans*. *Yeast.* 2021; 38 (4): 243-250. doi: 10.1002/yea.3550
20. Ganser C., Staples M.I., Dowell M., et al. Filamentation and biofilm formation are regulated by the phase-separation capacity of network transcription factors in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2023; 19 (12): e1011833. doi:10.1371/journal.ppat.1011833
21. Janeczko M., Kochanowicz E., Biochanin A. Inhibits the growth and biofilm of *Candida* species. *Pharmaceutics* (Basel). 2024; 17 (1): 89. doi:10.3390/ph17010089
22. Khan F., Bamunuarachchi N.I., Tabassum N., et al. Suppression of hyphal formation and virulence of *Candida albicans* by natural and synthetic compounds. *Biofouling.* 2021; 37 (6): 626-655. doi:10.1080/08927014.2021.1948538
23. Kim Y.G., Lee J.H., Park S., et al. Hydroquinones including tetrachlorohydroquinone inhibit *Candida albicans* biofilm formation by repressing hyphae-related genes. *Microbiol. Spectr.* 2022; 10 (5): e0253622. doi:10.1128/spectrum.02536-22

24. Kumpakha R., Gordon D.M. Occidiofungin inhibition of *Candida* biofilm formation on silicone elastomer surface. *Microbiol. Spectr.* 2023; 11 (6): e0246023. doi:10.1128/spectrum.02460-23
25. Lee J.H., Kim Y.G., Kim Y., Lee J. Antifungal and antibiofilm activities of chromones against nine *Candida* species. *Microbiol Spectr.* 2023; 11 (6): e0173723. doi:10.1128/spectrum.01737-23
26. Sieniawska T. Baj, Chapter 10 - Tannins, Editor (s): Simone Badal, Rupika Delgoda. *Pharmacognosy*, Academic Press. 2017; 199-232. doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00010-X
27. Luiz R.L.F., Vila T.V.M., Mello de J.C.P., et al. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. *BMC Complement. Altern. Med.* 2015; 15: 68. doi: 10.1186/s12906-015-0597-4
28. Wang H, Li H, Liu Z, et al. Activity of thonningianin A against *Candida albicans* *in vitro* and *in vivo*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2024; 108 (1): 96. doi:10.1007/s00253-023-12996-1

Поступила в редакцию журнала 27.05.24

Принята к печати 02.10.24





*Для цитирования:* Прокопьев В.В., Карабасова А.Б., Куклина Н.В., Юрова В.А., Крафт Л.А. Реципрокное влияние экзометаболитов дрожжевых микромицетов кишечника и условно-патогенных бактерий на скорость роста. Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (3): 72-77. DOI: 10.24412/1999-6780-2024-3-72-77

*For citation:* Prokopiev V.V., Karabasova E.B., Kuklina N.V., Yurova V.A., Kraft L.A. Reciprocal influence of exometabolites of yeast micromycetes of the intestine and conditional pathogenic bacteria on the growth rate. Problems in Medical Mycology. 2024; 26 (3):72-77. (In Russ). DOI:10.24412/1999-6780-2024-3-72-77

## РЕЦИПРОКНОЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ДРОЖЖЕВЫХ МИКРОМИЦЕТОВ КИШЕЧНИКА И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НА СКОРОСТЬ РОСТА

<sup>1,2</sup>Прокопьев В.В. (доцент; врач-бактериолог)\*, <sup>1</sup>Карабасова А.Б. (доцент), <sup>1</sup>Куклина Н.В. (доцент), <sup>1</sup>Юрова В.А. (доцент), <sup>1</sup>Крафт Л.А. (доцент)

<sup>1</sup>Алтайский государственный медицинский университет (кафедра эпидемиологии, микробиологии и вирусологии); <sup>2</sup>КДЛ «Здоровье», Барнаул, Россия

*Микробиом человека включает в себя десятки тысяч видов различных микроорганизмов, выработавших механизмы совместного сосуществования как с организмом человека, так и с другими представителями микробиоты. Мы провели исследование реципрокного влияния экзометаболитов наиболее часто встречающихся в кишечнике человека дрожжевых микромицетов и условно-патогенных бактерий.*

*Для оценки влияния экзометаболитов измеряли оптическую плотность культуры в стационарной фазе роста после инкубации в присутствии фильтратов культур бактерий или микромицетов.*

*Было обнаружено стимулирующее влияние экзометаболитов всех изученных условно-патогенных бактерий на скорость роста *Candida albicans*. Экзометаболиты *C. albicans*, *Geotrichum candidum* и *Pichia kudriavzevii* оказывали преимущественно стимулирующий эффект на рост бактерий.*

*Оценка взаимного влияния дрожжей и бактерий позволяет лучше понять механизмы патогенеза грибково-бактериальных микст-инфекций.*

**Ключевые слова:** дрожжевые микромицеты, условно-патогенные бактерии, скорость роста, экзометаболиты

## RECIPROCAL INFLUENCE OF EXOMETABOLITES OF YEAST MICROMYCETES OF THE INTESTINE AND CONDITIONAL PATHOGENIC BACTERIA ON THE GROWTH RATE

<sup>1,2</sup>Prokopiev V.V. (associate professor; bacteriologist), <sup>1</sup>Karabasova E.B. (associate professor), <sup>1</sup>Kuklina N.V. (associate professor), <sup>1</sup>Yurova V.A. (associate professor), <sup>1</sup>Kraft L.A. (associate professor)

<sup>1</sup>Altai State Medical University (Department of Epidemiology, Microbiology and Virology); <sup>2</sup>KDL "Zdorovie", Barnaul, Russia

*The human microbiome includes tens of thousands species of various microorganisms that have developed mechanisms for coexistence both with the human body and with other representatives of the microbiota. We conducted a study of the reciprocal effect of exometabolites of the most common yeast micromycetes and opportunistic bacteria in the human intestine.*

*To assess the effect of exometabolites, the optical density of the culture was measured in the stationary growth phase after incubation in the presence of cultures of bacterial or yeast filtrates.*

*A stimulating effect of exometabolites of all studied opportunistic bacteria on the growth rate of *Candida albicans* was discovered. Exometabolites of *C. albicans*, *Geotrichum candidum* and *Pichia kudriavzevii* had a predominantly stimulating effect on bacterial growth.*

*Assessing of the mutual influence of yeast and bacteria allows to better understand the mechanisms of pathogenesis of fungal-bacterial mixed infections.*

**Key words:** yeast, opportunistic bacteria, growth rate, exometabolites

## ВВЕДЕНИЕ

Человек в течение всей своей жизни находится в постоянном контакте с микроорганизмами самых разнообразных таксономических групп. Более того, по некоторым данным, контакт начинается до рождения [1, 2]. Ранее считалось, что соотношение кле-

\* Контактное лицо: Прокопьев Василий Валерьевич, e-mail: vasily78@mail.ru

ток микроорганизмов и клеток человека составляет 10:1 [3]. Исследования, проведённые в рамках проекта «Микробиом Человека», показали, что количество микроорганизмов имеет существенные отличия у лиц разного возраста, пола, веса и может существенно меняться в течение дня, но для используемого в литературе «стандартного человека» – мужчины 20-30 лет, весом 70 кг и ростом 170 см соотношение будет приблизительно 1:1 [4], т.е. порядка  $10^{14}$  микроорганизмов [5]! Большая часть микроорганизмов человека находится в кишечнике; вполне естественно, что данное сообщество, состоящее из десятков тысяч видов, выработало механизмы совместного сосуществования в процессе коэволюции.

Используемые в биологии термины, обозначающие типы взаимоотношений – мутуализм, комменсализм и паразитизм, только частично могут описать весь спектр взаимоотношений между представителями того или иного микробиома. Более того, по мнению ряда авторов, термин «комменсализм», определяющий тип отношений, когда один партнёр получает пользу, а другой не имеет очевидных плюсов или минусов от совместного существования, лишь показывает недостаток знаний о полном наборе функций участников этого взаимодействия [6].

Автором первых работ по изучению влияния микроорганизмов кишечника на организм человека был Илья Ильич Мечников, исследовавший влияние *Lactobacillus bulgaricus* на продолжительность жизни. За более чем вековую историю изучения влияния микробиоты на организм человека мы всё ещё крайне мало знаем о функциях микроорганизмов, с которыми человек контактирует на протяжении всей своей жизни.

Появление в руках исследователей такого инструментария, как масс-спектрометрия и секвенирование нового поколения (NGS), привело к кратному увеличению числа публикаций, посвящённых изучению микробиоты кишечника человека. Помимо роста количества работ, изучающих культивируемые микроорганизмы, методы метагеномики позволили оценивать и некультивируемые микроорганизмы.

На сегодняшний день достоверно известно об участии нормальной микробиоты в полостном пищеварении, антагонизме в отношении других микроорганизмов, синтезе витаминов [7], стимуляции иммунной системы, морфокинетической функции, способствующей увеличению абсорбционной поверхности кишечника, влиянии на перистальтику кишечника, на эндокринную систему [8], участии в биотрансформации лекарственных средств и метаболитов человека [9] и т.д. С другой стороны, многие представители нормальной микробиоты в определённых условиях могут вызывать заболевания.

При изучении микробиоты усилия учёных в большей степени направлены на оценку влияния отдельных видов микроорганизмов на организм чело-

века, но данная система не бинарная, и любой представитель микробиоты кишечника, помимо контакта с человеком, находится в постоянном взаимодействии с другими представителями микробиома. Изучение межвидовых взаимодействий особенно важно в контексте их взаимоотношения с организмом человека. Взаимодействия между микроорганизмами могут усилить или уменьшить их пробиотическую роль, а также увеличить или уменьшить риск возникновения поражений тканей человека.

К сожалению, в традиционной медицине значение межвидовых взаимоотношений существенно недооценивается, в то время как изменения микробиоты, постоянно происходящие в организме человека, возможно, являются тем фактором, при котором «случайное» взаимодействие «случайных» микроорганизмов приводит к переключению их роли во взаимодействии с человеком с мутуалистического на паразитическое и наоборот.

Несмотря на то, что подавляющее большинство исследований микробиома кишечника направлено на бактериальный компонент, наблюдается и увеличение работ, связанных с изучением грибкового компонента микробиоты – микобиома кишечника [10-12].

**Цель** настоящего исследования: изучить влияние экзометаболитов базидиомицета *Rhodotorula mucilaginosa* и аскомицетов *Candida albicans*, *Geotrichum candidum*, *Pichia kudriavzevii* на скорость роста коллекционных штаммов, наиболее часто встречающихся грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*) и грамположительных (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) условно-патогенных бактерий (УПБ). Также была проведена оценка реципрокного влияния экзометаболитов УПБ на скорость роста исследуемых микромицетов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучали базидиомицеты *Rhodotorula mucilaginosa* (25 штаммов) и аскомицеты *Candida albicans* (12), *Geotrichum candidum* (22), *Pichia kudriavzevii* (10). Все штаммы микромицетов были выделены при анализе кала пациентов крупного медицинского центра.

Исследуемые штаммы получены при посеве кала на среду Сабуро с 2% глюкозы и 0,4 г/л хлорамфеникола после 72-часовой инкубации при температуре 35 °С с последующей инкубацией в течение недели при 25 °С.

Идентификацию микромицетов проводили на основе их культуральных, морфологических и биохимических свойств и подтверждали при помощи программного обеспечения MALDI Biotyper масс-

спектрометра «Microflex» («Bruker Daltonik GmbH & Co. KG», Германия).

В работе использовали типовые штаммы условно-патогенных грамотрицательных (*Escherichia coli* ATCC25922, *Escherichia coli* ATCC35218 *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Proteus vulgaris* ATCC13315, *Serratia marcescens* ATCC13880, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) и грамположительных (*Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC29213) бактерий.

Экзометаболиты микромицетов получали при помощи фильтрации 48-часовой бульонной культуры (бульон Сабуро) через фильтры «MILLEX®GP» («Merck Millipore Ltd.») с диаметром поры 0,22 мкм. Фильтраты исследуемых штаммов каждого вида микроорганизмов пулировали. Стерильность фильтратов оценивали путём посева на агаризованную среду Сабуро.

Экзометаболиты УПБ были получены при помощи фильтрации 24-часовой культуры УПБ, выращенной на мясопептонном бульоне (МПБ), через фильтры «MILLEX®GP» («Merck Millipore Ltd.») с диаметром поры 0,22 мкм. Стерильность фильтрата определяли путём посева на среду Мюллера-Хинтон.

Для оценки взаимного влияния экзометаболитов микромицетов и УПБ на скорость роста использовали плоскодонные полистирольные 96-луночные планшеты. В лунки планшетов вносили 170 мкл бульона Сабуро с декстрозой («Condalab», Испания) или МПБ («Хемикон», Россия), после в среду добавляли 20 мкл экзометаболитов (фильтратов) грибов или УПБ. Далее в ячейки вносили 10 мкл 24-часовой бульонной культуры исследуемых микроорганизмов, доведённых физиологическим раствором до оптиче-

ской плотности, равной одной единице по Мак-Фарланду. В контрольные ячейки вместо микроорганизмов вносили 10 мкл стерильной питательной среды.

Рост микроорганизмов определяли по изменению оптической плотности через 24 часа инкубации при 37 °С для УПБ и после 48 часов инкубации при 37°С – для дрожжей (стационарная фаза роста). Оптическую плотность измеряли с применением 8-канального микропланшетного фотометра «Реал Р» («Вектор-Бест-Балтика», Россия) при длине волны 450 нм.

Анализ и статистическую обработку данных осуществляли при помощи расчета Т-критерия Уилкоксона. Расчёт выполняли на онлайн-калькуляторе [https://www.statskingdom.com/175wilcoxon\\_signed\\_ranks.html](https://www.statskingdom.com/175wilcoxon_signed_ranks.html) (p<0,05). Для оценки размера эффекта использовали стандартизованную среднюю разницу d Коэна (разница между двумя средними, делённая на стандартное отклонение для данных). Значение числа по модулю 0,2-0,49 представляет небольшой размер эффекта, 0,5-0,79 – средний размер эффекта, 0,8 и выше – большой размер эффекта.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Скорость роста микроорганизмов является одним из основных и самых очевидных показателей жизнеспособности культуры.

При исследовании мы обнаружили, что экзометаболиты всех исследованных УПБ оказывают средний или выраженный стимулирующий эффект на рост клинических штаммов *C. albicans*, полученных из кишечника человека (табл. 1).

Таблица 1

Влияние экзометаболитов УПБ на скорость роста дрожжей, полученных из кишечника

Фильтрат	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Escherichia coli</i> ATCC35218	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC700603	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC13315	<i>Serratia marcescens</i> ATCC13880	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213
Культура м/о								
<i>Candida albicans</i>	↗↗↗ (0,87)	↗↗↗ (0,87)	↗↗↗ (0,87)	↗↗ (0,78)	↗↗↗ (0,87)	↗↗ (0,6)	↗↗↗ (0,8)	↗↗ (0,78)
<i>Geotrichum candidum</i>	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Pichia kudriavzevii</i>	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	□	□	□	↘↘ (0,71)	□	□	□	□

↗ – небольшой, ↗↗ – средний, ↗↗↗ – большой стимулирующий эффект; ↘ – небольшой, ↘↘ – средний, ↘↘↘ – большой угнетающий эффект; □ – отсутствие статистически значимого эффекта. В скобках указан размер эффекта (d Коэна).

Влияние экзометаболитов УПБ на скорость роста *G. candidum* и *P. kudriavzevii* не обнаружено. Был выявлен средний подавляющий эффект экзометаболитов *P. vulgaris* на рост *R. mucilaginosa*.

Воздействие экзометаболитов дрожжевых микромицетов на рост УПБ было более выраженным и разнонаправленным (табл. 2). Экзометаболиты *C. albicans* статистически достоверно подавляли рост *E. coli* и *P. vulgaris* с выраженной и небольшой силой

эффекта соответственно. В то же время экзометаболиты *C. albicans* достоверно с большой силой эффекта стимулировали рост *K. pneumoniae* и *E. faecalis*, со средней силой – рост *S. marcescens*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Мы также наблюдали выраженный статистически значимый стимулирующий эффект экзометаболитов *P. kudriavzevii* (телеморф *Candida krusei*) на скорость роста всех исследованных УПБ.

Влияние экзометаболитов дрожжевых микромицетов на скорость роста УПБ

Фильtrat	<i>Candida albicans</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
Культура м/о				
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	↘↘↘ (0,87)	↗↗↗ (1,0)	↗↗↗ (1,0)	□
<i>Escherichia coli</i> ATCC35218	↘↘↘ (0,87)	↗↗↗ (1,0)	↗↗ (0,62)	□
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC700603	↗↗↗ (0,87)	↘↘↘ (1,0)	↗↗↗ (1,0)	□
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC13315	↘ (0,42)	□	↗↗↗ (0,87)	□
<i>Serratia marcescens</i> ATCC13880	↗↗ (0,58)	□	↗↗↗ (1,0)	□
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	↗↗ (0,63)	□	↗↗↗ (1,0)	□
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	↗↗↗ (1,0)	□	↗↗↗ (1,0)	□
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	↗↗ (0,7)	□	↗↗↗ (0,95)	□

↗ – небольшой, ↗↗ – средний, ↗↗↗ – большой стимулирующий эффект; ↘ – небольшой, ↘↘ – средний, ↘↘↘ – большой угнетающий эффект; □ – отсутствие статистически значимого эффекта. В скобках указан размер эффекта (d Козна).

Экзометаболиты *G. candidum* в некоторой степени оказывали противоположный эффект экзометаболитам *C. albicans*, стимулируя рост *E. coli*, *P. vulgaris*, при этом значимо подавляя рост *K. pneumoniae*. В случае других изученных УПБ значимого влияния экзометаболитов *G. candidum* не отмечено.

При исследовании не обнаружили влияния экзометаболитов *R. mucilaginosa* на скорость роста УПБ.

Скорость роста и размножения микромицетов, как и других микроорганизмов, является интегративным показателем ответа микробной популяции на внутренние и внешние стимулы. К внутренним стимулам можно отнести процессы, связанные с реализацией генетической информации, где, помимо работы конститутивных генов, происходит активация индуцибельных генов и целых генных кластеров [13], что напрямую связано с присутствием в окружающей среде различных компонентов.

Влияние окружающей среды может быть сопряжено с абиотическими факторами: температурой, уровнем кислорода [14], оксида азота, сероводорода и других газов [15], pH [16] и т.д.

В то же время в условиях микробиома значимость биотических факторов на скорость роста имеет большее значение.

Со стороны организма хозяина основными факторами, влияющими на рост микроорганизмов, являются диета [17, 18] и взаимодействие с иммунной системой кишечника [19].

Влияние других представителей микробиома может быть специфическим и неспецифическим. Продукты метаболизма одних микроорганизмов могут стимулировать или подавлять рост «соседей по микробиому». И если попытка проследить взаимоотношение двух микроорганизмов в отношении одного или нескольких метаболитов представляется возможной, то оценка взаимоотношения большего количества микроорганизмов микробиома является

очень сложной задачей. Тем не менее появляются работы по изучению метаболических взаимоотношений в искусственных кишечных микробиомах, состоящих из нескольких основных представителей кишечника [20, 21].

В нашем исследовании мы проследили результаты взаимодействия представителей двух царств – *Bacteria* и *Fungi*, принадлежащих к разным доменам (*Prokaryota* и *Eukaryota*).

В разные стадии роста микроорганизмов происходит экспрессия разных генов, соответственно, микроорганизмы могут выделять в окружающую среду метаболиты, способные оказывать противоположный эффект на окружающие микроорганизмы.

Учитывая, что изученные микромицеты и УПБ с относительно высокой частотой встречаются в кишечнике здоровых людей и пациентов с патологией желудочно-кишечного тракта [22, 23], результаты взаимодействия микроорганизмов позволят лучше понять механизмы патогенеза грибково-бактериальных микст-инфекций.

В ходе научной работы мы обнаружили взаимное, преимущественно стимулирующее, влияние экзометаболитов *C. albicans* и УПБ, что согласуется с рядом клинических и экспериментальных исследований. Так, было доказано усиление факторов патогенности в случае коинфекции *C. albicans* и *E. coli* при вульвовагините [24]. Усиление повреждения энтероцитов при совместной инфекции *C. albicans* и *P. vulgaris*, представленное в работе [25], также соответствует нашим результатам. При экспериментальном *K. pneumoniae*-ассоциированном колите у мышей *C. albicans* усиливала воспаление и увеличивала проницаемость кишечника, а также приводила к ряду системных изменений у экспериментальных животных [26]. Также было доказано аддитивное влияние *C. albicans* на инфекцию *S. aureus*, *S. marcescens* и *E. faecalis* [27].

При исследовании мы выявили взаимное стимулирующее влияние экзометаболитов *C. albicans* и *P.*

*aeruginosa*, что согласуется с публикациями, демонстрирующими более тяжелое течение заболеваний, вызванных данными микроорганизмами [28]. Причём, несмотря на существенную эволюционную дистанцию между этими микроорганизмами, по всей видимости, стимуляция связана с системой межмикробной коммуникации «Quorum sensing» через секрецию фарнезола – аутоиндуктора коммуникации у микромицетов [29].

Невзирая на то, что *P. kudriavzevii*, *R. mucilaginosa* и *G. candidum* могут вызывать заболевания [30-32], мы не нашли в литературе экспериментальных или клинических исследований взаимного действия этих микромицетов и УПБ.

Влияние экзометаболитов изученных нами микромицетов на скорость роста УПБ позволяет предположить их значимость в патогенезе грибково-бактериальных микст-инфекций. Преимущественно стимулирующий характер воздействия грибковых фильтратов на рост УПБ должен привести к изменению течения заболевания.

В настоящей работе доказан факт существенного взаимодействия экзометаболитов УПБ и дрожже-

вых микромицетов. В то же время механизмы этого влияния должны быть предметом дальнейшего исследования.

## ВЫВОДЫ

Популяция кишечных микроорганизмов за время совместного сосуществования с человеком в процессе коэволюции выработала механизмы взаимодействия как с организмом человека, так и с другими представителями данного биотопа. Причём индигенная биота кишечника является довольно стабильным компонентом микробиома. Несмотря на появление новых исследовательских инструментов, мы до сих пор мало знаем о межвидовом взаимоотношении между различными представителями микробиоты кишечника.

В нашем исследовании мы обнаружили статистически значимое влияние экзометаболитов дрожжевых микромицетов *C.albicans*, *P. kudriavzevii* и *G. candidum* на рост наиболее часто встречающихся в кишечнике УПБ, а также стимулирующее влияние экзометаболитов УПБ на скорость роста *C. albicans*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kennedy K.M., de Goffau M.C., Perez-Muñoz M.E., et al. Questioning the fetal microbiome illustrates pitfalls of low-biomass microbial studies. *Nature*. 2023; 613 (7945): 639-649. doi: 10.1038/s41586-022-05546-8
2. Stinson L.F., Boyce M.C., Payne M.S., Keelan J.A. The not-so-sterile womb: evidence that the human fetus is exposed to bacteria prior to birth. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 1124. doi: 10.3389/fmicb.2019.01124
3. Savage D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 1977; 31: 107-33. doi: 10.1146/annurev.mi.31.100177.000543
4. Sender R., Fuchs S., Milo R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*. 2016; 164 (3): 337-40. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.013
5. Xie Y., Hu F., Xiang D., et al. The metabolic effect of gut microbiota on drugs. *Drug Metab. Rev.* 2020; 52 (1): 139-156. doi: 10.1080/03602532.2020.1718691
6. Bäckhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005; 307 (5717): 1915-20. doi: 10.1126/science.1104816
7. Симонова Е.В., Пономарева О.А. Роль нормальной микрофлоры в поддержании здоровья человека. *БМЖ*. 2008; 8: 2-25. [Simonova E.V., Ponomareva O.A. The role of normal microflora in supporting human health. *BMJ*. 2008; 8: 2-25. (In Russ)].
8. Heintz-Buschart A., Wilmes P. Human gut microbiome: function matters. *Trends Microbiol.* 2018; 26 (7): 563-574. doi: 10.1016/j.tim.2017.11.002
9. Бабин В.Н., Домарадский И.В. Биохимические и молекулярные аспекты симбиоза человека и его микрофлоры. электрон. версия *Росс. химического журнала*. 2006; 6. Режим доступа: <http://www.domaradsky.ru/rhg94.htm> [Babin V.N., Domaradsky I.V. Biochemical and molecular aspects of human symbiosis and its microflora. the electron. the Ross version. *chemical magazine*. 2006; 6. (In Russ)].
10. Zhang F., Aschenbrenner D., Yoo J.Y., Zuo T. The gut mycobiome in health, disease, and clinical applications in association with the gut bacterial microbiome assembly. *Lancet Microbe*. 2022; 3 (12): e969-e983. doi: 10.1016/S2666-5247(22)00203-8
11. Szóstak N., Figlerowicz M., Philips A. The emerging role of the gut mycobiome in liver diseases. *Gut Microbes*. 2023; 15 (1): 2211922. doi: 10.1080/19490976.2023.2211922
12. Zhao X., Hu X., Han J., et al. Gut mycobiome: A "black box" of gut microbiome-host interactions. *WIREs Mech Dis*. 2023; 15 (5): e1611. doi: 10.1002/wsbm.1611
13. Rokas A., Mead M.E., Steenwyk J.L., et al. Biosynthetic gene clusters and the evolution of fungal chemodiversity. *Nat. Prod. Rep.* 2020; 37 (7): 868-878. doi: 10.1039/c9np00045c

14. Прокопьев В.В., Крафт Л.А., Карабасова Е.Б., Щеблякова Л.А. Влияние температуры и уровня кислорода на скорость роста микромицетов кишечника. Успехи медицинской микологии. 2023; 24:66-70. EDN VDYUCW. [Prokopyev V.V., Kraft L.A., Karabasova E.B., Shcheblyakova L.A. Influence of temperature and oxygen level on the growth rate of intestinal micromycetes. The successes of medical mycology. 2023; 24:66-70. (In Russ)].
15. Singhal R., Shah Y.M. Oxygen battle in the gut: hypoxia and hypoxia-inducible factors in metabolic and inflammatory responses in the intestine. J. Biol. Chem. 2020; 295 (30): 10493-10505. doi: 10.1074/jbc.REV120.011188
16. Vylkova S., Carman A.J., Danhof H.A., et al. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. mBio. 2011; 2 (3): e00055-11. doi: 10.1128/mBio.00055-11
17. Lee J.Y., Tsolis R.M., Bäuml A.J. The microbiome and gut homeostasis. Science. 2022; 377 (6601): eabp9960. doi: 10.1126/science.abp9960
18. Wilson A.S., Koller K.R., Ramaboli M.C., et al. Diet and the human gut microbiome: an international review. Dig Dis Sci. 2020; 65 (3): 723-740. doi: 10.1007/s10620-020-06112-w
19. Hooper L.V., Littman D.R., Macpherson A.J. Interactions between the microbiota and the immune system. Science. 2012; 336 (6086): 1268-73. doi: 10.1126/science.1223490
20. Shetty S.A., Kuipers B., Atashgahi S., et al. Inter-species metabolic interactions in an *in-vitro* minimal human gut microbiome of core bacteria. NPJ Biofilms Microbiomes. 2022; 8 (1): 21. doi: 10.1038/s41522-022-00275-2
21. D'hoë K., Vet S., Faust K., et al. Integrated culturing, modeling and transcriptomics uncovers complex interactions and emergent behavior in a three-species synthetic gut community. Elife. 2018; 7: e37090. doi: 10.7554/eLife.37090
22. Прокопьев В.В., Куклина Н.В., Емельянова И.В., Звездкина Г.С. Анализ культивируемых грибов кишечника у пациентов с патологией желудочно-кишечного тракта и клинически здоровых людей. Проблемы медицинской микологии. 2023; 25 (1): 19-24. [Prokopyev V.V., Kuklina N.V., Emelyanova I.V., Zvezdkina G.S. Analysis of cultivated intestinal fungi in patients with pathology of the gastrointestinal tract and clinically healthy people. Problems in Medical Mycology. 2023; 25 (1): 19-24. (In Russ)]. doi: 10.24412/1999-6780-2023-1-19-24
23. Rinninella E., Raoul P., Cintoni M., et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. Microorganisms. 2019; 7 (1): 14. doi: 10.3390/microorganisms7010014
24. Farrokhi Y., Al-Shibli B., Al-Hameedawi D.F., et al. *Escherichia coli* enhances the virulence factors of *Candida albicans*, the cause of vulvovaginal candidiasis, in a dual bacterial/fungal biofilm. Res. Microbiol. 2021; 172 (4-5): 103849. doi: 10.1016/j.resmic.2021.103849
25. Niemiec M.J., Kapitan M., Himmel M., et al. Augmented enterocyte damage during *Candida albicans* and *Proteus mirabilis* coinfection. Front. Cell Infect. Microbiol. 2022; 12: 866416. doi: 10.3389/fcimb.2022.866416
26. Panpetch W., Phuengmaung P., Hiengrach P., et al. *Candida* worsens *Klebsiella pneumoniae* induced-sepsis in a mouse model with low dose dextran sulfate solution through gut dysbiosis and enhanced inflammation. Int. J. Mol. Sci. 2022; 23 (13): 7050. doi: 10.3390/ijms23137050
27. Carlson E. Enhancement by *Candida albicans* of *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, and *Streptococcus faecalis* in the establishment of infection in mice. Infect Immun. 1983; 39 (1): 193-7. doi: 10.1128/iai.39.1.193-197.1983
28. Kahl L.J., Stremmel N., Esparza-Mora M.A., et al. Interkingdom interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* affect clinical outcomes and antimicrobial responses. Curr. Opin. Microbiol. 2023; 75: 102368. doi: 10.1016/j.mib.2023.102368
29. Méar J.B., Kipnis E., Faure E., et al. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interactions: more than an opportunistic criminal association? Med. Mal. Infect. 2013; 43 (4): 146-51. doi: 10.1016/j.medmal.2013.02.005
30. Nguyen T.A., Kim H.Y., Stocker S., et al. *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*): a systematic review to inform the World Health Organisation priority list of fungal pathogens. Med. Mycol. 2024; 62 (6): myad132. doi: 10.1093/mmy/myad132
31. Tuon F.F., Costa S.F. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. Rev. Iberoam. Micol. 2008; 25 (3): 135-40. doi: 10.1016/s1130-1406(08)70032-9
32. Henrich T.J., Marty F.M., Milner D.A. Jr, Thorner A.R. Disseminated *Geotrichum candidum* infection in a patient with relapsed acute myelogenous leukemia following allogeneic stem cell transplantation and review of the literature. Transpl. Infect. Dis. 2009; 11 (5): 458-62. doi: 10.1111/j.1399-3062.2009.00418.x

Поступила в редакцию журнала 15.07.24

Принята к печати 01.10.24



**Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова**  
**Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н.Кашкина**  
Адрес редакции: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28. Тел.: (812) 303-51-45  
E-mail: mycobiota@szgmu.ru, elena.gukova@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  
E-mail: mycobiota@szgmu.ru, elena.gukova@szgmu.ru. Manager of Editorial Office: E.S. Gukova

**«ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»**

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

Журнал зарегистрирован ВАК, с 2005 г. включен в Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), 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 09.10.2024 г.

