

EDITORIAL BOARD

Chief Editor —

N.V. Vasilyeva — Honored Scientist of the Russian Federation, Ph.D., prof. (Russia)

Deputies Chief Editor —

N.N. Klimko — M.D., prof. (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), 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), Mazurov V.I. — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), Ozerskaya S.M. — Ph.D. (Russia), Polachek I. — M.D. (Israel), Samzov A.V. — M.D., prof. (Russia), Sidorenko S.V. — M.D., prof. (Russia), Raznatovsky K.I. — 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. 24, № 3, 2022

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, иммунитет, терапия и профилактика инфекций, микроорганизмы-контаминанты в лабораторных, клинических и других условиях.

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 24, № 3, 2022

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., профессор (Россия)

Заместители главного редактора:

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

А.Е. Тараскина — к.б.н. (Россия)

Ответственный секретарь —

Т.С. Богомолова — к.б.н. (Россия)

Зав. 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), Б. Дюпон — доктор медицины (Франция), Кашкин К.П. — д.м.н., академик РАМН, профессор (Россия), Колбин А.С. — д.б.н., профессор (Россия), Мазуров В.И. — д.м.н., акад. РАМН, профессор (Россия), Озерская С.М. — д.б.н. (Россия), Полачек И. — доктор медицины (Израиль), Самцов А.В. — д.м.н., профессор (Россия), Сидоренко С.В. — д.м.н., профессор (Россия), Разнатовский К.И. — д.м.н., профессор (Россия), Титц Х-Й. — доктор медицины (Германия), Хурцилава О.Г. — д.м.н., проф. (Россия), Цинзерлинг В.А. — д.м.н., профессор (Россия), Чжан Ф. — доктор медицины (Китай), 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, immunity, therapy and prophylaxis of infections, microorganisms — contaminants in laboratory, clinical and other conditions.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ И ОБЗОРЫ

Еноктаева О.В., Николенко М.В., Трушников Д.Ю. Механизмы адаптации грибов рода *Candida* (обзор литературы)..... 4

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ И ДЕРМАТОВЕНЕРОЛОГИЯ

Шевяков М.А., Шигина Е.А., Евсеева А.В., Митрофанов В.С. Клинический случай кандидоза пищевода, ассоциированного с ахалазией кардии 8

Чарушин А.О., Хостелиди С.Н., Боровинский Р.И., Чарушина И.П., Еловиков А.М., Ильин В.Б., Плотникова М.В., Мелехина Ю.Э., Авдеенко Ю.Л., Клишко Н.Н. Случай успешного лечения риноорбитального мукормикоза у больной COVID-19 в Пермском крае 13

Фролова Е.В., Шадривова О.В., Филиппова Л.В., Учеваткина А.Е., Богомолова Т.С., Игнатъева С.М., Соловьева Г.И., Секретарева О.В., Зайцева Е.А., Хостелиди С.Н., Борзова Ю.В., Тараскина А.Е., Клишко Н.Н., Васильева Н.В. Значение хемокина CXCL10 и петраксина-3 в диагностике инвазивного аспергиллеза легких у гематологических больных, получающих полихимиотерапию..... 20

Баранова М.М., Муравьева Н.В., Белов Б.С. Распространенность кандидоза слизистых оболочек, онихомикоза и дерматомикоза у больных воспалительными заболеваниями суставов (предварительные данные)... 31

Корнищева В.Г., Гордя Н.А., Макарова Ю.К. Новые подходы к лечению герпесвирусных поражений кожи и слизистых оболочек 35

Мавлянова Ш.З., Есинова Е.В., Мирзакулова Ш.Н., Муминова С.Р., Извекова О.В. Значимость уровня прокальцитонина у больных аллергическими заболеваниями кожи..... 40

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Мухаммадиев Рин.С., Бирюля В.В., Мухаммадиев Риш.С., Тимербулатова Л.М., Скворцов Е.В. Цитотоксическая активность экстрактов из грибов рода *Fusarium* Link. в отношении клеточных культур *in vitro*..... 43

Александрова Н.А., Заславская М.И., Ипатов А.О., Махрова Т.В., Игнатова Н.И. Анализ биопленкообразования *Candida albicans*, *C. auris*, *C. glabrata* и *C. krusei* 48

Игнатова Н.И., Заславская М.И., Ипатов А.О., Лукова О.А. Изучение спектра и выраженности антимикробной активности метаболитов пробиотического штамма *Escherichia coli* M-17..... 51

Оганесян Э.Г., Гордеева С.А., Тараскина А.Е., Чилина Г.А., Босак И.А., Мошкевич И.Р., Круглов А.Н., Орлова О.Е., Богданова Т.В., Богомолова Т.С., Козлова О.П., Ковыришин С.В., Алексеев А.Ю., Васильева Н.В. К вопросу о проблемах идентификации *Candida auris*..... 54

ХРОНИКА И ИНФОРМАЦИЯ

Памяти заслуженного деятеля науки Республики Башкортостан, профессора Айрата Радиковича Мавзютова..... 62

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

Enoktaeva O.V., Nikolenko M.V., Trushnikov D.Yu. Mechanisms of adaptation of fungi of the genus *Candida* (literature review) 4

CLINICAL MYCOLOGY AND DERMATOVENEROLOGY

Shevyakov M.A., Shigina E.A., Evseeva A.V., Mitrofanov V.S. Clinical case of esophageal candidiasis associated with cardia achalasia..... 8

Charushin A.O., Khostelidi S.N., Borovinsky R.I., Charushina I.P., Elovikov A.M., Ilin V.B., Plotnikova M.V., Melekhina Yu.E., Avdeenko Y.L., Klimko N.N. The case of successful treatment of rhinoorbital mucormycosis in a COVID-19 patient in the Perm region..... 13

Frolova E.V., Shadrivova O.V., Filippova L.V., Uchevatkina A.E., Bogomolova T.S., Ignatieva S.M., Solovyova G.I., Sekretareva O.V., Zaitseva E.A., Khostelidi S.N., Borzova Yu.V., Taraskina A.E., Klimko N.N., Vasilyeva N.V. The value of chemokine CXCL10 and pentraxin-3 in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematological patients receiving polychemotherapy..... 20

Baranova M.M., Muravyeva N.V., Belov B.S. Prevalence of mucosal candidiasis, onychomycosis and dermatomycosis in patients with inflammatory diseases of the joints (preliminary data)..... 31

Kornisheva V.G., Gordya N.A., Makarova Yu.K. New approaches to the treatment of herpesvirus lesions of skin 35

and mucous membranes.....
Mavlyanova Sh.Z., Esionova E.V., Mirzakulova Sh.N., Muminova S.R., Izvekova O.V. Value of procalcitonin in patients with allergic skin diseases..... 40

EXPERIMENTAL MICROBIOLOGY

Muhammadiev Rin.S., Biryulya V.V., Muhammadiev Rish.S., Timerbulatova L.M., Skvortsov E.V. Cytotoxic activity of extracts from *Fusarium* Link. fungi against human cells lines *in vitro*..... 43
Alexandrova N.A., Zaslavskaya M.I., Ipatova A.O., Makhrova T.V., Ignatova N.I. Biofilm formation analysis of *Candida albicans*, *C. auris*, *C. glabrata* and *C. krusei*..... 48
Ignatova N.I., Zaslavskaya M.I., Ipatova A.O., Lukova O.A. The study of spectrum and antimicrobial activity intensity of the probiotic strain *Escherichia coli* M-17 metabolites..... 51
Oganesyan E.G., Gordeeva S.A., Taraskina A.E., Chilina G.A., Bosak I.A., Moshkevich I.R., Kruglov A.N., Orlova O.E., Bogdanova T.V., Bogomolova T.S., Kozlova O.P., Kovyrshin S.V., Alekseev A. Yu., Vasilyeva N.V. On the question of identification problems of *Candida auris*..... 54

CHRONICLE AND INFORMATION

To the memory of the Honored Scientist of the Republic of Bashkortostan, professor Ayrat Radikovich Mavzyutov..... 62



Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)
Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н.Кашкина (НИИ ММ) СЗГМУ им. И.И. Мечникова
Адрес редакции: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28. Тел.: (812) 303-51-45, факс (812) 510-62-77
E-mail: mycobiota@szgmu.ru, 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, Fax (812) 510-62-77
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 04.10.2022.

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Еноктаева О.В. (ассистент кафедры)*, Николенко М.В. (профессор кафедры), Трушников Д.Ю. (доцент кафедры)

Тюменский государственный медицинский университет, Тюмень, Россия

Механизмы адаптации грибов рода *Candida* к различным экологическим условиям обусловлены генетической информацией, хранящейся в их клетках. Мутации, отличия в экспрессии генов в дрожжевых и нитчатых структурах, гомозиготное или гетерозиготное состояние генов, фенотипическая пластичность, рекомбинация генетического материала в парасексуальном цикле, изменение пloidности, наличие анеуплоидий по различным хромосомам ведут к расширению спектра признаков у особей в популяциях. Механизмы образования гетеротипических ассоциаций и многосторонние взаимоотношения хозяина и его ассоциантов зависят от экологических условий среды, в которой находятся грибы рода *Candida*. Селективное давление, оказываемое лекарствами и иммунной системой хозяина, способствует увеличению не только количества видов и штаммов *Candida* spp., обладающих патогенными свойствами, но и их механизмов резистентности к лекарственным препаратам. Поиск и изучение специфических молекулярных компонентов клеток грибов, отсутствующих у млекопитающих, позволит разработать универсальные средства для лечения широкого спектра микозов.

Ключевые слова: *Candida*, механизмы адаптации

MECHANISMS OF ADAPTATION OF FUNGI OF THE GENUS *CANDIDA* (LITERATURE REVIEW)

Enoktaeva O.V. (assistant of the department), Nikolenko M.V. (professor of the department), Trushnikov D.Yu. (associate professor of the department)

Tyumen State Medical University, Tyumen Russia

The mechanisms of adaptation of fungi of the genus Candida to various environmental conditions are determined by the genetic information stored in their cells. Mutations, differences

* Контактное лицо: Еноктаева Ольга Викторовна, e-mail: pechkanova@mail.ru

in gene expression in yeast and filamentous structures, homozygous or heterozygous state of genes, phenotypic plasticity, recombination of genetic material in the parasexual cycle, changes in ploidy, the presence of aneuploidy in different chromosomes lead to an expansion of the spectrum of traits in individuals in populations.

The mechanisms of formation of heterotypic associations and multilateral relationships between the host and its associates depend on the ecological conditions of the environment in which Candida fungi are found. The selective pressure exerted by drugs and the immune system of the host contributes to an increase not only in the number of Candida species and strains with pathogenic properties, but also in their drug resistance mechanisms. The search and study of specific molecular components of fungal cells that are absent in mammals will make it possible to develop universal agents for the treatment of a wide range of mycoses.

Key words: *Candida*, adaptation mechanisms

Чтобы адаптироваться к новым экологическим условиям, организму из любой таксономической группы необходимо претерпеть изменения на всех уровнях организации живого вещества. В современном мире, где антропогенная нагрузка на биосферу приводит к сокращению численности видов живых существ, есть группы организмов, которые успешно распространяются в новых экологических нишах. Прекрасным примером является растущее количество условно-патогенных представителей полифилетического рода *Candida*. Наиболее изученным возбудителем кандидозной инфекции остается *Candida albicans*, но в последние десятилетия среди патогенов человека все чаще встречаются *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* и *Candida krusei*. В настоящее время глобальной задачей для современного здравоохранения является контроль за распространением внутрибольничной инфекции, вызванной *Candida auris* [1]. Механизмы адаптации вышеуказанных грибов к окружающей среде будут рассмотрены ниже.

Цель работы: проанализировать данные научной литературы о механизмах адаптации к окружающей среде условно-патогенных грибов рода *Candida*.

Все процессы жизнедеятельности, будь то транспорт веществ через мембрану, взаимодействие особей внутри популяции или противостояние патогенного организма и хозяина, зависят от наличия генной информации внутри клетки. С помощью молекулярной филогенетики подтверждено, что изменения генома в эукариотических клетках идут за счет поглощения чужеродных генов или потери собственных. Потеря генов в результате мутаций при-

водит не только к зависимости от других организмов в пищевой цепочке, но и позволяет уйти от много-ступенчатого энергос затратного ферментативного пути и получать конечный продукт при питании.

Способность микроорганизмов ассимилировать цинк, марганец и железо из инфицированной ткани хозяина относится к фундаментальным свойствам патогенности, так как данные элементы являются кофакторами белков, дающих возможность грибам сопротивляться иммунным атакам хозяина. В кислой среде гемолитическая активность гиф у *C. albicans* позволяет лизировать стенки эритроцитов и поглощать железо гема или ферритин путем эндоцитоза. Эффективность поглощения железа клетками *C. albicans* и *C. glabrata* зависит от наличия в окружающей среде ксеносидерофоров, ответственных за внутриклеточное хранение ионов данного металла. Высокие концентрации меди в окружающем пространстве токсичны для грибов рода *Candida*. Поэтому, помимо механизмов адаптации к пищевому иммунитету хозяина, грибам необходимо вырабатывать механизмы детоксикации, позволяющие справляться с большими концентрациями микроэлементов [2].

Способность одного генотипа генерировать ряд различных фенотипов в ответ на стимулы окружающей среды известна как фенотипическая пластичность. Среди всех природных штаммов *C. albicans* только малая часть (менее 10%) способна переключаться между двумя морфологическими формами: белой и непрозрачной. Негенетические фенотипические вариации *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. dubliniensis* играют решающую роль в адаптации к биотопам макроорганизма. Демонстрируя различные профили экспрессии генов, эти патогены продуцируют отличающиеся внешним видом клетки (с идентичным геномом) и колонии, а также протеом с характерными вирулентными свойствами.

Для непрозрачных клеток наиболее характерна колонизация на кожных покровах, в то время как белые клетки проявляют большую вирулентность при системном кандидозе. Вид *C. albicans* способен переключаться и на серые клетки, которые дают возможность колонизировать язык и кожные покровы [3-5].

Эукариотические клетки имеют схожий консервативный план строения, а также принципы хранения и реализации генетической информации, но есть и отличия. Рекомбинация генетического материала в половых клетках растений и животных происходит благодаря мейозу. Несмотря на наличие генов-гомологов, ответственных за мейоз, у некоторых грибов альтернативным путем увеличения генетического разнообразия в популяциях является сложная система спаривания, при которой количество особей не увеличивается, но происходит генерация большого пула генетически разнообразного потомства. Из-

вестно, что эффективность естественного отбора зависит от разнообразия признаков у особей в популяции. Поэтому способность продуцировать клетки с различной ploidy при смене экологических условий позволяет грибам изменять свои клинические признаки: вирулентность и устойчивость к лекарственным препаратам.

Вступление в парасексуальный цикл размножения является основным механизмом смены ploidy у *C. albicans* и *C. tropicalis*, при котором диплоидные (или близкие по ploidy) клетки претерпевают переход из стерильного белого состояния в компетентное к спариванию непрозрачное состояние. Слияние двух непрозрачных диплоидных клеток, содержащих генетические локусы MTL α и MTL α , приводит к образованию тетраплоидной клетки MTL α/α . Немейотическая парасексуальная программа согласованной потери гомологичных хромосом способствует возвращению в диплоидное или почти диплоидное состояние с образованием анеуплоидов. Несмотря на наличие множественных рецессивных летальных аллелей у *C. albicans*, также описаны гаплоидные формы клеток [6].

Отметим, что комбинация генов в клетке определяет и степень резистентности патогенных организмов к лекарственным веществам.

Рассмотрим молекулярные механизмы резистентности условно-патогенных представителей рода *Candida* к лекарственным средствам на примере фунгистатического вещества – флуконазола. Данный препарат замедляет рост клеток грибов путем ингибирования фермента 14 α -деметилазы, необходимого для биосинтеза эргостерола плазматической мембраны. Способность клеток грибов синтезировать эргостерол различными путями без использования вышеуказанного фермента снижает эффективность применения этого лекарственного средства. Точечные мутации в гене ERG11, приводящие к замене аминокислот в молекуле-мишени, также повышают резистентность патогенного штамма. Устойчивость к флуконазолу опосредована и наличием в клеточной мембране белков оттока, препятствующих накоплению лекарства в цитоплазме грибной клетки.

В ходе эволюции под действием естественного отбора преимущество получили гомозиготы, так как по сравнению с гетерозиготами они обладают повышенной продукцией эргостерола и менее подвержены фунгистатическому воздействию флуконазола. Анеуплоидии также приводят к увеличению числа копий генов, ответственных за синтез эргостерола, благодаря дубликациям участков хромосом.

Предполагают, что один патогенный штамм может обладать комбинацией механизмов резистентности к лекарственным веществам, накопленным поэтапно при длительном лечении пациентов [7].

Одной из задач современной медицины является разработка универсального лекарственного препарата при лечении широкого спектра микозов. В качестве мишеней из огромного количества консервативных белков митохондрий эукариот были идентифицированы грибоспецифичные белки NUXM и NUZM, отсутствующие у млекопитающих. Результатом индуцированного нарушения в работе митохондрий патогенных грибов будет дефицит энергии в клетке, необходимой для биосинтеза вирулентных белков, филаментации и образования биопленок [8]. Потенциально новые возможности для разработки противомикотической терапии дает изучение внеклеточных везикул, которые принимают участие во многих аспектах жизнедеятельности, включая межклеточную коммуникацию, патогенез и прогрессирование рака [9].

В качестве подтверждения адаптаций патогенной микробиоты, возникших в ходе эволюции на популяционном уровне, можно рассматривать строго регулируемый и скоординированный многоступенчатый процесс образования моновидовых биопленок [10]. Но с медицинской точки зрения наиболее вирулентными свойствами обладают конгломераты с *interkingdom* коммуникацией. Например, биопленки, включающие в себя *C. albicans* и *Streptococcus mutans*, образуют налет на зубах и способствуют появлению периодонтита [11]. Такая коадаптация между организмами с филогенетически удаленными геномами синергизирует гетеротипическую ассоциацию с увеличенной биомассой за счет повышения синтеза экзополисахаридов [2, 12].

Вступление организмов в сложные симбиотические отношения является примером проявлений адаптаций на уровне экосистемы. В ассоциативном симбиозе при стабильной работе иммунной системы хозяин является резервуаром для условно-патогенных микросимбионтов и проявляет колонизационную резистентность по отношению к ним. В противоположном случае, макроорганизм испытывает на себе вирулентные свойства грибов рода *Candida*, степень проявления которых напрямую зависит от комбинации генов и белков, кодируемых ими. Например, адгезины нужны для распознавания и инфицирования тканей или абиотических поверхностей внутри хозяина [13].

Среди грибов одним из наиболее изученных комменсалов человека и представителем его микро-

биома является *C. albicans*. Но взаимоотношения этих двух организмов можно назвать разносторонними. Когда гриб находится в конкурентных отношениях за ресурсы с более патогенными микроорганизмами своего хозяина, их взаимоотношения являются мутуалистическими. Колонизируя влагалище здоровых женщин, гриб ингибирует миграцию патогенов (например, *Escherichia coli*), вызывающих потенциально опасные для жизни инфекции мочевыводящих путей, из прямой кишки в уретру. Переход от комменсализма вплоть до оппортунистического паразитизма происходит при угнетении работы иммунной системы, когда наблюдаются дефекты врожденного иммунитета (нарушение функций нейтрофилов) или клеточного иммунитета (дефицит Т-клеток). При этом человек может выступать в роли аменсала, так как кандидоз может привести к его летальному исходу [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе эволюции грибы рода *Candida*, приспосабливаясь к меняющимся условиям среды, выработали механизмы адаптации, позволившие им стать прогрессивной группой микроорганизмов. Их способность производить генетически разнообразное потомство дает возможность демонстрировать различные профили экспрессии генов до и после парасексуального цикла, что ведет к изменению вирулентных свойств протеома клетки и делает более вариабельными механизмы реализации патогенного процесса. Благодаря *interkingdom* коммуникации и пластичности генетического материала медленно, но верно происходило увеличение количества иммунных видов и штаммов. Разработка новых методов изучения и лечения кандидозных инфекций помогает понять природу возбудителя.

Спектр симбиотических отношений между грибами и человеком варьирует в зависимости от степени угнетения иммунной системы последнего. Грибы рода *Candida* относят к облигатным комменсалам.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе не было никаких экспериментальных исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rhodes J., Fisher M.C. Global epidemiology of emerging *Candida auris*. Current opinion in microbiology. 2019; 52: 84-89. doi.org/10.1016/j.mib.2019.05.008
2. Crawford A., Wilson D. Essential metals at the host-pathogen interface: nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. FEMS yeast research. 2015; 15 (7). doi.org/10.1093/femsyr/fov071
3. Hall R.A., Noverr M.C. Fungal interactions with the human host: exploring the spectrum of symbiosis. Current opinion in microbiology. 2017; 40: 58-64. doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.020

4. Tao L., Du H., Guan G., et al. Discovery of a “white-gray-opaque” tristable phenotypic switching system in *Candida albicans*: roles of non-genetic diversity in host adaptation. PLoS biology. 2014; 12 (4): e1001830. doi.org/10.1371/journal.pbio.1001830
5. Xie J., Tao L., Nobile C. J., et al. White-opaque switching in natural MTL_a/a isolates of *Candida albicans*: evolutionary implications for roles in host adaptation, pathogenesis, and sex. PLoS biology. 2013; 11 (3): P. e1001525. doi.org/10.1371/journal.pbio.1001525
6. Seervai R.N., Jones Jr.S.K., Hiraakawa M.P., et al. Parasexuality and ploidy change in *Candida tropicalis*. Eukaryotic cell. 2013; 12 (12): 1629-1640. doi.org/10.1128/EC.00128-13
7. Berkow E.L., Lockhart S.R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. Infection and drug resistance. 2017; 10: 237. doi.org/10.2147/IDR.S118892
8. Li D., Calderone R. Exploiting mitochondria as targets for the development of new antifungals. Virulence. 2017; 8 (2): 159-168. doi.org/10.1080/21505594.2016.1188235
9. Bielska E., May R.C. Extracellular vesicles of human pathogenic fungi. Current opinion in microbiology. 2019; 52: 90-99. doi.org/10.1016/j.mib.2019.05.007
10. Wall G., Montelongo-Jauregui D., Bonifacio B.V., et al. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. Current opinion in microbiology. 2019; 52: 1-6. doi.org/10.1016/j.mib.2019.04.001
11. Sztajer H., Szafranski S.P., Tomasch J., et al. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. The ISME journal. 2014; 8 (11): 2256-2271. doi.org/10.1038/ismej.2014.73
12. Falsetta M.L., Klein M.I., Colonne P.M., et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms *in vivo*. Infection and immunity. 2014; 82 (5): 1968-1981. doi.org/10.1128/IAI.00087-14
13. Еноктаева О.В., Николенко М.В., Трушников Д.Ю. и др. Механизм формирования биопленок грибов рода *Candida* при кандидозной инфекции (обзор литературы). Проблемы медицинской микологии. 2021; 23 (4): 3-8. [Enoktaeva O.V., Nikolenko M.V., Trushnikov D.Yu., et al. Fungal biofilms formation mechanism of the genus *Candida* fungi in *Candida* infection (literature review). Problems in Medical Mycology. 2021; 23 (4): 3-8 (In Russ)]. doi: 10.24412/1999-6780-2021-4-3-8

Поступила в редакцию журнала 15.08.2022

Рецензент: Т.С. Богомолова



КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ КАНДИДОЗА ПИЩЕВОДА, АССОЦИИРОВАННОГО С АХАЛАЗИЕЙ КАРДИИ

Шевяков М.А. (профессор кафедры)*, Шигина Е.А. (клинический ординатор), Евсева А.В. (клинический ординатор), Митрофанов В.С. (зав. отделением)

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

Представлено описание клинического случая пациента 24 лет, в течение 4 лет отмечающего дисфагию и эпигастральную боль. С диагнозами кандидоза пищевода и гастроэзофагеальной рефлюксной болезни пациент получал лечение ингибиторами протонной помпы и антимикотическим препаратом флуконазола, однако без положительного эффекта. С помощью расширенного обследования установили наличие ахалазии кардии.

Ключевые слова: ахалазия кардии, кандидоз пищевода, эзофагит, *Candida*

CLINICAL CASE OF ESOPHAGEAL CANDIDIASIS ASSOCIATED WITH CARDIA ACHALASIA

Shevyakov M.A. (professor of the department), Shigina E.A. (clinical resident), Evseva A.V. (clinical resident), Mitrofanov V.S. (head of the clinical 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

A description of a clinical case of a 24-year-old patient who has been reporting dysphagia and epigastric pain for 4 years is presented. With diagnoses of esophageal candidiasis and gastroesophageal reflux disease, the patient received treatment with proton pump inhibitors and the antimycotic drug fluconazole, but without a positive effect. With the help of an extended examination, the presence of achalasia was established.

Key words: achalasia, esophageal candidiasis, esophagitis, *Candida*

ВВЕДЕНИЕ

Ахалазия кардии (синонимы: мегаэзофагус или долихоэзофагус, идиопатическое расширение пищевода, кардиоспазм и др.) – идиопатическое нервно-мышечное заболевание, проявляющееся функциональным нарушением проходимости кардии вследствие дискоординации между глотком, рефлекторным раскрытием нижнего пищеводного сфинктера и двигательной и тонической активностью гладкой мускулатуры пищевода [1, 2].

Зарегистрированные во всем мире значения заболеваемости колеблются в широких пределах – от 1,07 до 2,2/100 000 человек в год, а распространенность – от 10 до 15,7/100 000 человек в год [1, 3, 4, 5]. Хотя эпидемиологические данные об ахалазии кардии ограничены, частота заболевания, по видимому, растет [6]. Данные о распространенности заболевания на территории Российской Федерации ограничены, но специалисты российской гастроэнтерологической ассоциации приводят следующие данные: распространенность – 10 случаев на 100 000 населения, а заболеваемость – 1 на 100 000 населения [2]. Заболеваемость и распространенность ахалазии увеличиваются с возрастом, но заболевание может поражать людей всех возрастов. Ахалазия кардии регистрируется одинаково часто как у пациентов женского, так и мужского пола [7].

Основные симптомы заболевания: прогрессирующая дисфагия, регургитация и загрудинные боли, связанные с неполным опорожнением пищевода и хроническим эзофагитом [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Диагноз микоза слизистых оболочек пищеварительного тракта был рассмотрен с использованием критериев диагностики микозов Европейской организации по изучению и лечению рака и группы, исследующей микозы, Национального института аллергологии и инфекционных заболеваний США (ЕСММ/MSGERC, 2020) [8]. Диагностику ахалазии кардии проводили согласно Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению ахалазии кардии и кардиоспазма (версия 2016 г.) [2].

Описание клинического случая

Пациент К., 25 лет, обратился к гастроэнтерологу НИИ медицинской микологии СЗГМУ имени И.И. Мечникова для консультации по поводу кандидоза пищевода. На приеме: жалобы на ощущение «кома» в горле, боль в верхней части живота и средней части грудной клетки, болезненные ощущения при глотании. Считает себя больным с 2017 г. (около 4 лет), когда впервые появились дисфагия, одинофа-

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

гия и боли в эпигастральной области. Неоднократно обращался к врачу по месту жительства, выполнял эндоскопические исследования верхних отделов желудочно-кишечного тракта. Выявляли гастроэзофагеальную рефлюксную болезнь, эритематозную гастродуоденопатию. Получал успешную эрадикационную терапию *Helicobacter pylori*, а также различные ингибиторы протонной помпы в стандартных дозах, однако без положительной динамики в отношении симптомов болезни. При эзофагогастродуоденоскопии в поликлинике по месту жительства от 01.03.2021 г. в пищеводе были выявлены «белые налеты», сделано заключение: Кандидозный эзофагит. Недостаточность кардии. Эритематозная гастропатия и дуоденопатия. Гастроэзофагеальный рефлюкс. Лабораторного изучения биоматериала пищевода не проводили. Пациент получил курс таблеток флуконазола 150 мг в сутки в течение 14 дней без клинически значимого эффекта. Эндоскопический и лабораторный контроль излеченности кандидоза пищевода не выполняли.

В анамнезе: хроническая крапивница, провоцируемая температурным воздействием и контактом с аллергенами, аллергический блефароконъюнктивит, эпизодические приступообразные затруднения дыхания и эпизоды зуда кожи при контакте с шерстью собаки и домашней пылью. Эпизоды бронхоспазма купирует «по требованию» ингаляциями комбинации будесонида (160 мкг) и форматерола (4,5 мкг). На фоне отмены и поэтапного введения потенциально причинно-значимых аллергенных продуктов питания изменений в отношении симптомов заболевания верхних отделов пищеварительного тракта не зарегистрировано.

С 06.09.21 г. по 29.09.21 г. больной находился в микологической клинике СЗГМУ им. И.И. Мечникова с целью обследования, уточнения диагноза и определения дальнейшей тактики ведения. Поступил с диагнозом направления «Эозинофильный эзофагит? Хронический фибринозный эзофагит неуточненный».

Объективно при поступлении: пациент нормального питания и телосложения, индекс массы тела – 20 ед. Склеры обычной окраски. Кожа чистая. Язык тотально обложен ровным тонким налетом белого цвета (Рис). Видимые участки слизистой оболочки ротоглотки не изменены. Живот не вздут, безболезненный.

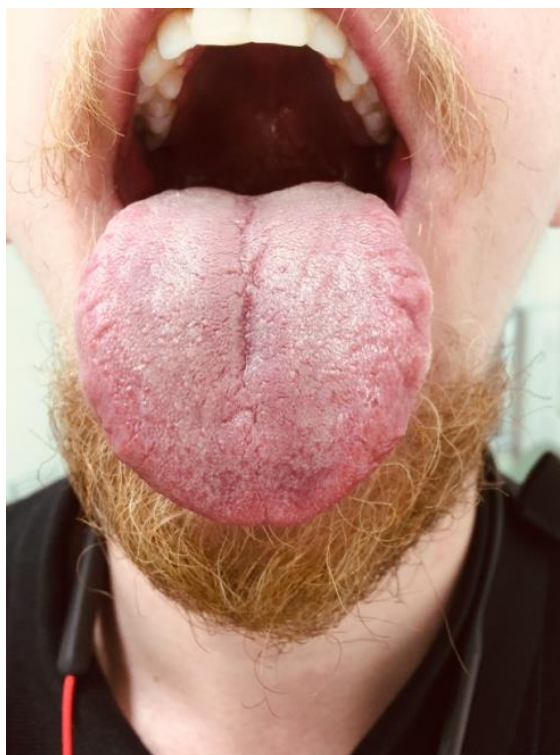


Рис. Визуальная картина при осмотре языка пациента К., 25 лет.

Флюорограмма от 14.07.21 г.: органы грудной клетки в пределах нормы.

Аллергологическое исследование от 07.09.21 г.: уровень общего иммуноглобулина Е – 106 ед./мл (N<100).

Кожные аллергологические пробы от 07.09.21: домашняя пыль (+), кошка (-), собака (++), микст пыльцы луговых трав (+), микст пыльцы сорных трав (+), микст пыльцы деревьев (+++), пыльца березы (+++), кролик (+), тест-контроль (-), гистамин (++)

Клинический анализ крови и мочи – без особенностей.

Микроскопическое исследование соскоба с языка на микромицеты, заключение: элементы микромицета не обнаружены.

Эзофагогастродуоденоскопия от 13.09.21 г.: местная анестезия лидокаин-спреем 10% 3 дозы. Пищевод: устье пищевода – на 15 см от резцов, интубируется без усилий. Грушевидные синусы – без особенностей. Пищевод свободно проходим. В просвете – без содержимого. Слизистая оболочка его бледно-розовая, в дистальном отделе с участками гиперемии, на стенках в верхней трети и средней трети пищевода – с небольшим количеством налетов белого цвета (4 биоптата и 1 мазок из пищевода на микроскопию и посев на кандидоз). Перистальтика прослеживается. Кардия смыкается не полностью. «Z» линия равномерная, совпадает с зоной пищеводно-желудочного перехода. Желудок: форма обычная. В просвете натошак небольшое количество светлой

жидкости – удалена через эндоскоп. Слизистая оболочка участками умеренно гиперемирована, в теле отечная. Складки расположены типично, расправляются при инсуффляции. Угол желудка формируется правильно. Перистальтика прослеживается. Привратник свободно проходим. Двенадцатиперстная кишка: луковица округлой формы. Слизистая оболочка гиперемирована, бархатистая. Постбульбарные отделы: слизистая оболочка гиперемирована, бархатистая. В просвете определяется небольшое количество желчи. Двенадцатиперстная кишка осмотрена до нижнегоризонтальной ветви. Продольная складка и большой дуоденальный сосочек (БДС) типичного вида. Заключение: Недостаточность кардии. Кандидоз пищевода. Поверхностный гастрит.

Микроскопическое исследование мазка пищевода на микромицеты от 16.09.21: нейтрофилы 0-3 в поле зрения, бактериальная биота смешанная скудная, эпителий – 20-30 клеток в поле зрения (примечание: слизь +++).

Микроскопия на грибы: выявлены дрожжевые клетки.

Культуральное исследование биоптата пищевода на микромицеты: обнаружен рост *Candida albicans*, культура *C. albicans* чувствительна к флуконазолу.

Лечения не назначали, для полного исключения эозинофильного и других иммунозависимых эзофагитов было решено повторить эзофагогастродуоденоскопию с биопсией и прицельным морфологическим исследованием биоптатов.

Эзофагогастродуоденоскопия от 22.09.21: пищевод свободно проходим, слизистая оболочка на всем протяжении с точечными наложениями белого цвета, налеты снимаются. Биопсия №2 на морфологическое исследование. Просвет нижней трети несколько расширен, перистальтика определяется, ослаблена, в просвете – большое количество жидкости с фрагментами пищи, частично аспирированы. Биопсия по 1 кусочку из верхней, средней и нижней трети пищевода для исключения эозинофильного эзофагита. Розетка кардии смыкается полностью, на инверсии – обхватывает эндоскоп. "Z" линия неравномерная, расположена на уровне ножек диафрагмы. Просвет кардии при инсуффляции не расправляется, проходим с затруднением. Форма желудка обычная. В просвете – мутная желчь, фрагменты пищи. Слизистая оболочка желудка и 12-типерстной кишки – без динамики. Заключение: признаки ахалазии кардии. Биопсия из пищевода для исключения эозинофильного эзофагита, микологическое исследование.

Морфологическое исследование биоптата пищевода от 23.09.21: клетки плоского эпителия с реактивными изменениями. Элементы гриба не выявлены. Лимфоциты в умеренном количестве, небольшое количество нейтрофилов. Эозинофилы не обнаружены.

Поскольку при тщательном целенаправленном исследовании биоматериалов пищевода эозинофилов не наблюдали, сочли, что данных, достаточных для постановки диагноза «эозинофильный эзофагит», нет. С учетом того, что при повторном исследовании псевдомицелий и бластомицеты грибов рода *Candida* не выявлены, было решено, что достаточных данных для диагноза «кандидоз пищевода» нет, и в антифунгальной терапии пациент в настоящий период не нуждается. Было рекомендовано исключить ахалазию кардии и склеродермию пищевода. При обследовании ревматологом диагноз склеродермии исключен.

19.04.22 г. проведено рентгенологическое исследование. Рентгеноскопия верхних отделов ЖКТ стоя и лежа с пероральным приемом жидкой бариевой взвеси: исследование проведено натошак, при этом перед приемом бария выявлено большое количество жидкости и слизи в пищеводе. Отмечен обратный заброс контраста из дистального тела в проксимальный. Пищевод расширен до 70 мм в верхней и средней трети, с трудом проходим в дистальном отделе из-за нарушения эвакуации. Выявлено небольшое количество контраста в начальном отделе кардии, где имеет место сужение в виде «мышинного хвоста» до 7 мм в диаметре и протяженностью до 20 мм. Свод и газовый пузырь не изменены. Желудок обычных размеров и формы, контуры стенок желудка четкие ровные. Складки слизистой оболочки несколько расширены, прослеживаются на всем протяжении до выходного отдела непрерывно. Перистальтика вялая. Эвакуация бариевой взвеси из желудка свободная, своевременная. Форма и размеры луковицы 12-типерстной кишки не изменены. Контур луковицы четкие, ровные. Пассаж бария по петле не нарушен. Рельеф слизистой оболочки 12-типерстной кишки перистый. Заключение: рентген-признаки ахалазии кардии. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ).

На основании данных обследования установлен основной диагноз ахалазии кардии. Сопутствующий диагноз: ГЭРБ, неэрозивная форма, средне-тяжелое течение. Кандидоз пищевода, ремиссия.

Пациенту рекомендовано лечение у хирурга, прием омепразола 20 мг в сутки длительно и наблюдение у миколога в клинике НИИ медицинской микологии имени П.Н.Кашкина.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что кандидоз пищевода является типичной оппортунистической инфекцией, то есть для заболевания необходим не только контакт с возбудителем, но и возможности для реализации патогенных свойств последнего. Кандидоз пищевода может быть проявлением иммунной дисфункции и/или

нарушением местной резистентности, обусловленной заболеванием собственно пищевода [9].

Нами представлен пациент с упорной пищеводно-желудочной симптоматикой, «белыми налетами» в пищеводе и клинической неэффективностью лечения ингибиторами протонной помпы и антимикотическим препаратом. Как правило, в таких случаях пытаются оптимизировать лечение гастроэзофагеальной рефлюксной болезни, меняя дозу или вид ингибитора протонной помпы, или присоединяют к лечению прокинетики, эзофагопротектор, другие средства. У нашего больного этот подход занял около 4 лет и не привел к улучшению.

Выявление на слизистой оболочке пищевода при эндоскопическом исследовании рецидивирующих «белых» (или фибринозных) наложений обычно побуждает врача проводить дифференциальную диагностику гастроэзофагеального рефлюкса с другими эзофагитами (например, кандидозным, эозинофильным, лимфоцитарным или множественными лейкоплакиями). В случае нашего пациента это было особенно актуально по двум причинам. Во-первых, мужчина страдает аллергическими заболеваниями (крапивница, атопический блефароконъюнктивит, аллергическая бронхиальная астма). У данной категории больных эозинофильные поражения пищеварительного тракта встречаются чаще. Однако обследование позволило исключить иммунозависимый эзофагит (эозинофильный, лимфоцитарный и склеродермию пищевода).

Во-вторых, наш пациент хоть эпизодически, но все-таки использует для купирования бронхоспазма ингаляторный кортикостероидный препарат будесо-

нида. Мы не выявили у больного системной иммунной дисфункции. Однако известно, что использование ингаляторных топических кортикостероидов определенно повышает риск кандидоза пищевода и ротоглотки. У представленного нами пациента при культуральном исследовании биоптата пищевода однократно отмечен рост *C. albicans*, чувствительных к флуконазолу. С общих позиций, обнаружение роста грибов рода *Candida* свидетельствует либо о кандидозе, либо о кандидоносительстве. Известно, что *Candida* spp. являются обычным обитателем ротоглотки вполне здоровых лиц и могут оказаться в пищеводе транзитно, при проглатывании слюны. В рамках данного обследования мы не выявили у пациента главного морфологического критерия кандидоза слизистых оболочек – нитевидной формы гриба, то есть псевдомицелия грибов рода *Candida*. Впрочем, нельзя исключить, что прогрессирование ахалазии кардии или воздействие других факторов, снижающих антифунгальную резистентность пищевода, в будущем приведут к рецидиву кандидоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше наблюдение показывает, что пациентам с упорными симптомами гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и кандидозом пищевода, фибринозными налетами в пищеводе, неэффективностью ингибиторов протонной помпы и антимикотиков показано расширенное обследование, включающее диагностику предполагаемой ахалазии кардии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Oude Nijhuis R.A.B., Zaninotto G., Roman S., et al. European guidelines on achalasia: United European Gastroenterology and European Society of Neurogastroenterology and Motility recommendations. *United European Gastroenterology Journal*. 2020; 8 (1): 13-33. doi: 10.1177/2050640620903213
2. Ивашкин В.Т., Трухманов А.С., Годжелло Э.А. и др. Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению ахалазии кардии и кардиоспазма. 2016. [Ivashkin V.T., Trukhmanov A.S., Gobjello E.A., et al. Recommendations of the Russian Gastroenterological Association for the diagnosis and treatment of achalasia of cardia and cardiospasm. 2016 (In Russ)].
3. van Hoeij F.B., Ponds F.A., Smout A.J., Bredenoord A.J. Incidence and costs of achalasia in The Netherlands. *Neurogastroenterology & Motility*. 2018; 30 (2): e13195. doi: 10.1111/nmo.13195
4. Sadowski D.C., Ackah F., Jiang B., Svenson L.W. Achalasia: incidence, prevalence and survival. A population-based study. *Neurogastroenterology & Motility*. 2010; 22 (9): e256-e261 doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01511.x
5. Gennaro N., Portale G., Gallo C., et al. Esophageal achalasia in the Veneto region: epidemiology and treatment. *Epidemiology and treatment of achalasia. Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2011; 15: 423-428. doi: 10.1007/s11605-010-1392-7
6. Samo S., Carlson D.A., Gregory D.L., et al. Incidence and prevalence of achalasia in central Chicago, 2004-2014, since the widespread use of high-resolution manometry. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2017; 15 (3): 366-373. doi: 10.1016/j.cgh.2016.08.030
7. Savarino E., Bhatia S., Roman S., et al. Achalasia. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2022; 8 (1): 28. doi: 10.1038/s41572-022-00356-8

8. 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: 1367-1376. doi: 10.1093/cid/ciz1008

9. Мелёхина Ю.Э., Фролова Е.В., Шевяков М.А. и др. Клинико-иммунологические особенности рецидивирующего кандидоза пищевода у ВИЧ/СПИД-негативных больных в г. Санкт-Петербурге. Проблемы медицинской микологии. 2008; 10 (3): 15-18. [Melekhina Yu.E., Frolova E.V., Shevyakov M.A., et al. Clinical and immunological peculiarities recurrent esophageal candidosis (REC) in HIV - negative patients in St. Petersburg. Problems in Medical Mycology. 2008; 10 (3): 15-18. (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 11.07.2022

Рецензент: Ю.В. Борзова



СЛУЧАЙ УСПЕШНОГО ЛЕЧЕНИЯ РИНООРБИТАЛЬНОГО МУКОР- МИКОЗА У БОЛЬНОЙ COVID-19 В ПЕРМСКОМ КРАЕ

¹Чарушин А.О. (доцент)*, ²Хостелиди С.Н. (доцент), ³Боровинский Р.И. (врач-патологоанатом, зав. отд.), ⁴Чарушина И.П. (главный врач), ¹Еловиков А.М. (зав. кафедрой), ³Ильин В.Б. (врач-оториноларинголог), ³Плотникова М.В. (врач-оториноларинголог, зав. отд.), ²Мелехина Ю.Э. (доцент), ²Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.), ²Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

¹Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера, Пермь; ²Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург; ³Пермская краевая клиническая больница, Пермь; ⁴Пермская краевая клиническая инфекционная больница, Пермь, Россия

Представлено описание клинического случая риноорбитального мукормикоза, ассоциированного с COVID-19, в Пермском крае. Симптомы микоза появились у пациентки на 6 сутки от начала новой коронавирусной инфекции во время стационарного лечения. Фоновым заболеванием, кроме COVID-19, был сахарный диабет. Основным фактором риска было применение дексаметазона в дозе 24 мг/сутки, а затем преднизолона по 60 мг/сутки, общая продолжительность использования стероидов составила 15 дней. В оториноларингологическом отделении была выполнена дифференциальная диагностика со злокачественным новообразованием. Диагноз мукормикоза установили на основании критериев ECMM/MSGERC, 2020. Проведено хирургическое лечение и антимикотическая терапия позаконазолом, а также местное лечение с положительным эффектом.

Ключевые слова: мукормикоз околоносовых пазух, риноорбитальный мукормикоз, сахарный диабет, COVID-19-ассоциированный мукормикоз, *Mucorales*

* Контактное лицо: Чарушин Артём Олегович, e-mail: art-charushin@yandex.ru

THE CASE OF SUCCESSFUL TREAT- MENT OF RHINOORBITAL MU- CORMYCOSIS IN A COVID-19 PA- TIENT IN THE PERM REGION

¹Charushin A.O. (associate professor), ²Khostelidi S.N. (associate professor), ³Borovinsky R.I. (pathologist, head of the clinical department), ⁴Charushina I.P. (chief doctor), ¹Elovikov A.M. (head of the department), ³Ilin V.B. (otorhinolaryngologist), ³Plotnikova M.V. (otorhinolaryngologist, head of the clinical department), ²Melekhina Yu.E. (associate professor), ²Avdeenko Y.L. (senior scientific researcher), ²Klimko N.N. (head of the department)

¹Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner, Perm; ²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg; ³Perm Regional Clinical Hospital, Perm; ⁴Perm Regional Clinical Infectious Diseases Hospital, Perm, Russia

A description of a clinical case of rhinoorbital mucormycosis associated with COVID-19 in the Perm Region is presented. Symptoms of mycosis appeared in the patient on the 6th day after the onset of a new coronavirus infection, during inpatient treatment. The background disease (in addition to COVID-19) was diabetes mellitus. The main risk factor was the use of dexamethasone at a dose of 24 mg / day, followed by prednisone at 60 mg / day, the total duration of steroid use was 15 days. Differential diagnosis with malignant neoplasm was performed in the otorhinolaryngological department. The diagnosis of mucormycosis was established based on the ECMM/MSGERC, 2020 criteria. We performed surgical treatment, antimycotic therapy with Posaconazole and local treatment with a positive effect.

Key words: mucormycosis of the paranasal sinuses, rhinoorbital mucormycosis, diabetes mellitus, COVID-19-associated mucormycosis, *Mucorales*

ВВЕДЕНИЕ

Одной из особенностей пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19) является высокая частота развития у больных инвазивного мукормикоза (COVID-M) [1-3]. Это связано с вызываемой вирусом SARS-CoV-2 и действием применяемых лекарственных средств (глюкокортикостероидов, генно-инженерных биологических препаратов) иммуносупрессией, а также декомпенсацией фонового заболе-

ваний, прежде всего, сахарного диабета [3, 4]. Несмотря на уменьшение темпов распространения вирусной инфекции с начала 2022 г., наблюдается рост числа установленных и описанных в научной литературе случаев COVID-М [3]. Самые высокие показатели заболеваемости COVID-М в мире отмечены в Индии, где за 2021 г. выявлено более 47 000 случаев, из которых более 4000 закончились летальным исходом [1, 5]. В нашей стране в регистр кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова с января по декабрь 2021 г. внесено 60 взрослых больных COVID-М [6]. Пациентов наблюдали врачи в различных регионах и городах Российской Федерации: Санкт-Петербурге, Москве, Тюмени, Волгограде, Курске, Краснодаре и др. В настоящее время рост случаев мукормикоза на фоне пандемии COVID-19 отмечен во всем мире: опубликованы наблюдения серий случаев COVID-М в Германии, Нидерландах, Великобритании и др. [7-9].

Мукормикоз на фоне COVID-19 чаще всего протекает в риноорбитальной и/или риноцеребральной формах [1, 2, 10]. Клинические признаки заболевания могут появиться как на 1-2 неделе COVID-19, так и в более поздние сроки (до 90 дней) [11].

В статье представлено первое описание успешного лечения риноорбитального мукормикоза у больной COVID-19 в Пермском крае.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Диагноз риноорбитального мукормикоза был установлен с использованием критериев диагностики микозов Европейской организации по изучению и лечению рака и группы, исследующей микозы, Национального института аллергологии и инфекционных заболеваний США (ЕСММ/MSGERC, 2020) [12]. Диагностику и лечение новой коронавирусной инфекции (НКВИ) проводили согласно Временным методическим рекомендациям РФ (версия 13 от 14.10.21 г.) [13].

При обследовании пациентки применяли методы клинической, инструментальной и лабораторной диагностики. Провели эндоскопический осмотр полости носа, носоглотки, околоносовых пазух (ОНП) и орбиты слева, компьютерную томографию (КТ) лёгких, околоносовых пазух и орбит с контрастированием. Лабораторная диагностика состояла из микроскопического, культурального и патогистологического исследований.

Выполнили микроскопическое исследование отделяемого решетчатого лабиринта и орбиты слева методом окраски по Романовскому-Гимзе, а также посев интраоперационного материала на агаризованную среду Сабуро с добавлением левомицетина и дальнейшей инкубации при температурах 28° и 35° в

течение 14 дней в микробиологической лаборатории Пермской краевой клинической инфекционной больницы (ПККИБ).

Патогистологическое исследование биопсийного и операционного материала провели с использованием параллельного окрашивания гематоксилином-эозином, методом PAS (шифф-йодной кислотой) и импрегнацией серебром (по Грокотту). Для исключения злокачественного новообразования выполняли иммуногистохимическое исследование материала. Просмотр препаратов осуществляли под увеличением 100х, 200х и 400х.

Описание клинического случая.

Пациентка К., 66 лет, была госпитализирована в оториноларингологическое отделение ПККБ 20.12.21 г. по экстренным показаниям. Больная предъявляла жалобы на боль в области левого глаза, снижение зрения на него, отек и гиперемию век, наличие корок в полости носа слева.

Анамнез заболевания.

30.10.21 г. появились жалобы на лихорадку, малопродуктивный кашель, одышку, боль в груди. Специалистами по месту жительства (пациентка проживала в республике Крым) было назначено амбулаторное лечение: капсулы умифеновира по 200 мг 4 раза в сутки, таблетки азитромицина по 500 мг в день, симптоматические препараты. 05.11.21 г. в связи с нарастанием дыхательной недостаточности после подтверждения новой коронавирусной инфекции госпитализирована в специализированное отделение. Диагностировали двустороннюю полисегментарную пневмонию (КТ2). Согласно национальным рекомендациям лечения НКВИ (новой коронавирусной инфекции), получала противовирусную (таблетки фавипиравира по схеме) и системную антибактериальную терапию (левофлоксацин по 500 мг 2 раза в сутки, цефтриаксон – 2,0 в сутки в течение 10 дней), а также парентеральные глюкокортикостероиды (ГКС) раствором дексаметазона в суточной дозировке 24 мг (180 мг по преднизолону). После выписки лечение было продолжено: ципрофлоксацин в таблетках по 500 мг 2 раза и преднизолон – 60 мг в сутки. Общая продолжительность применения ГКС составила 15 суток. Генно-инженерные биологические препараты пациентка не получала. Весь период госпитализации была на респираторной поддержке увлажнённым кислородом.

На третьи сутки стационарного лечения (08.11.21 г.) у больной появилась боль в левом глазу, отёк и опущение верхнего века слева. Офтальмологическая симптоматика прогрессировала: через 4 дня значительно снизилась острота зрения. После выписки пациентку консультировали оториноларинголог и офтальмолог по месту жительства, было рекомендо-

вано выполнение компьютерной томографии околоносовых пазух (КТ ОНП). Заключение КТ ОНП от 25.11.21 г.: визуализировано новообразование ОНП слева (преимущественно решетчатого лабиринта) с распространением в левую орбиту и полость носа, с локальным дефектом перпендикулярной пластинки решетчатой кости. Больная была направлена к ЛОР-онкологу. Онкопатологии не выявлено, рекомендовано амбулаторное лечение.

Жалобы сохранялись, и пациентка была госпитализирована в ЛОР-отделение ПККБ с предварительным диагнозом: новообразование решетчатого лабиринта слева с деструкцией костных стенок и распространением в полость носа и орбиту слева.

Анамнез жизни.

Больная с 2015 г. получала лечение по поводу сахарного диабета 2 типа. На момент поступления в стационар использовала следующие препараты: вилдаглиптин (50 мг) и метформин (850 мг) по 1 таблетке 2 раза в сутки в сочетании с инсулином пролонгированного действия (10 ЕД в сутки). Пациентка контролировала уровень гликемии самостоятельно: гликемия натощак – до 12 ммоль/л, в течение дня – до 20 ммоль/л, во время лечения COVID-19 – более 30 ммоль/л.

06.12.22 г. была осмотрена эндокринологом амбулаторно, заключение: сахарный диабет 2 типа, некомпенсированный (целевой уровень HbA1c – менее 7,5%).

По поводу гипертонической болезни III ст., 3 ст. по артериальному давлению (АД), риск 4, хронической сердечной недостаточности II (ХСН) ежедневно принимала лозартан (50 мг), гидрохлоротиазид (12,5 мг), моксонидин (0,4 мг).

Объективно при поступлении.

Общее состояние удовлетворительное. Избыточная масса тела (индекс массы тела – 28,7 кг/м²). Кожные покровы розовые, чистые. АД при поступлении – 160 и 100 мм рт. ст., пульс – 76 в 1 минуту. Тоны сердца ясные, ритмичные. Носовое дыхание умеренно затруднено слева. Над легочными полями с обеих сторон жёсткое дыхание, хрипов нет.

Локальный статус. Отёк и гиперемия век, птоз до середины зрачка, ограничение подвижности глазного яблока кнаружи, лёгкая инъекция сосудов конъюнктивы левого глаза. У медиального угла левого глаза выявлено образование с неровными контурами, покрытое геморрагическими корками, с мацерированной кожей по краям – свищ из решетчатого лабиринта. Больная отмечала периодическое серозно-геморрагическое мутноватое отделяемое из него (Рис. 1).



Рис. 1. Птоз и свищ у медиального угла левого глаза.

Риноскопически при поступлении в среднем носовом ходу слева просматривалась серая бугристая плюс-ткань, средняя носовая раковина была уменьшена в размерах, с признаками атрофии слизистой оболочки. При фарингоскопии и отоскопии патологических изменений не выявлено.

По данным КТ ОНП от 20.12.21 г. установлено наличие новообразования решетчатого лабиринта слева, накапливающего контрастное вещество, с распространением в полость носа, внутренние отделы орбиты, верхнечелюстную и лобную пазуху слева, с деструкцией бумажной и ситовидной пластины; инфильтративные изменения медиальной прямой мышцы левого глаза, неровные «зубчатые» контуры зрительного нерва, отёк периневральной клетчатки (Рис. 2). Заподозрен злокачественный характер новообразования.



Рис. 2. Новообразование околоносовых пазух слева, дефекты бумажной и ситовидной костных пластин (указаны стрелками). КТ ОНП от 20.12.21 г.

Больная была осмотрена офтальмологом. Острота зрения левого глаза – 0,1 в узком поле (выпадение нижней половины), справа – 0,6.

В общем анализе крови от 21.12.21 г.: лейкоциты – $8,0 \times 10^9$ /л (нейтрофилы – 57,8%, лимфоциты – 29,9%, моноциты – 10,3%), эритроциты – $3,9 \times 10^{12}$ /л, гемоглобин – 100 г/л, СОЭ – 51 мм/час. В общем анализе мочи: белок, глюкоза, кетоновые тела не обнаружены. В биохимическом анализе крови: АЛат – 7 МЕ/л, АСаТ – 12 МЕ/л, креатинин – 70 мкмоль/л, мочевины – 3,7 ммоль/л, общий белок – 68,9 г/л, глюкоза – 6,47 ммоль/л. Уровень гликогемоглобина А1с от 30.11.21 г. – 11,4%, глюкозы венозной крови – 11,7 ммоль/л.

Обследование на уровень антител к SARS-CoV-2 от 22.12.21 г.: коэффициент позитивности IgG – 18,43, IgM – 4,31. На рентгенограмме лёгких обнаружены инфильтративные и фиброзные изменения в средне-базальных отделах обоих лёгких.

В день поступления выполнена диагностическая пункция левой верхнечелюстной пазухи (ВЧП). Патологического отделяемого в промывной жидкости не выявлено. На основании полученных данных установлен предварительный диагноз: новообразование решётчатого лабиринта слева с деструкцией костных стенок и распространением в полость носа, верхнечелюстную, основную пазуху и орбиту слева.

24.05.21 г. под эндотрахеальным наркозом и эндоскопическим контролем выполнено частичное удаление новообразования из среднего носового хода слева. Плюс-ткань – серая, эластической консистенции, сходной с фиброзными полипами. Также проведена микрогайморотомия слева через клыковую ямку. В просвете пазухи определялась киста, при удалении которой получена типичная кистозная янтарная жидкость. По данным патогистологического исследования, включая иммуногистохимический метод, злокачественный характер новообразования исключён.

Учитывая деструктивный рост образования, его морфологическую неясность, наличие фонового сахарного диабета, COVID-19 в анамнезе, был заподозрен инвазивный микоз ОНП. 29.12.21 г. провели эндоскопическую полисинусотомию слева. Интраоперационно обнаружено отсутствие костных структур в проекции передних клеток решётчатого лабиринта, остатки серой ткани в задней группе клеток, где также визуализированы свободно лежащие костные фрагменты. Ткань распространялась в орбиту, к соустью левой основной и верхнечелюстной пазухи. Слизистая оболочка этих пазух была полипозно изменена, экссудата в их просвете не было. Ткань удалена до фиброзной капсулы орбиты. Средняя носовая раковина слева была резко уменьшена в размерах, с атрофичной слизистой оболочкой.

При патогистологическом исследовании интрао-

перационного материала выявлены участки с фрагментами широкого несептированного мицелия, ветвящегося под углом 90 градусов, схожего с мукоромицетами (Рис. 3).

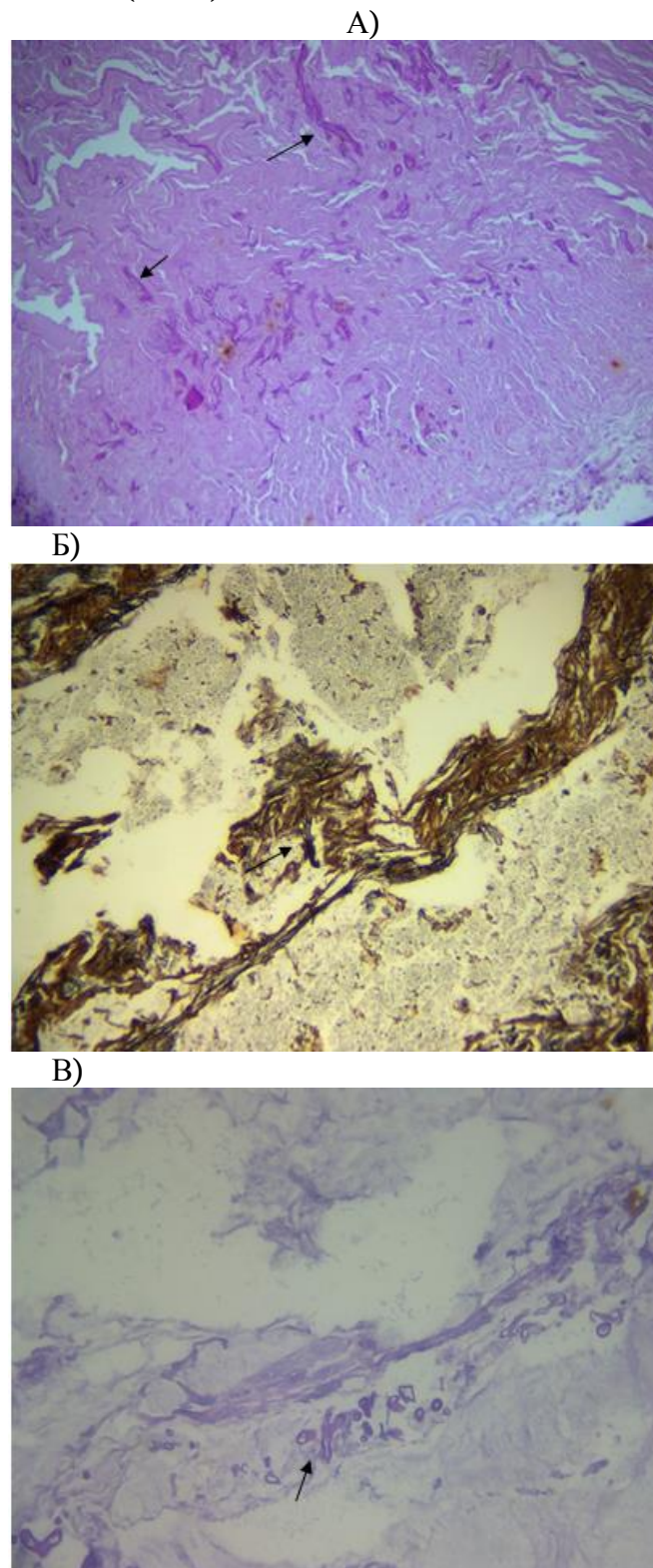


Рис. 3. Фрагменты широкого несептированного мицелия (указаны стрелками), ветвящегося под прямым углом, в интраоперационном материале решётчатого лабиринта. А) Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 200$; Б) – импрегнация серебром (по Грокотту), увеличение $\times 200$; В) – PAS, увеличение $\times 400$.

30.12.21 г. провели телемедицинскую консультацию больной специалистами кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Было рекомендовано направить гистологические препараты и парафиновые блоки на пересмотр в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. Назначен позаконазол в суспензии для приёма внутрь по 400 мг 2 раза в сутки.

Послеоперационный период протекал без особенностей. Проводили ежедневный туалет полости носа слева с орошением и закладыванием тампонов с раствором амфотерицина В дезоксихолатом в течение 6 дней.

03.01.22 г. пациентка выписана под наблюдение ЛОР-врача по месту жительства в удовлетворительном состоянии с улучшением с рекомендациями продолжить прием позаконазола. При выписке больная отмечала значительное уменьшение боли в левом глазу, улучшение носового дыхания слева. Объективно: плюс-ткань в полости носа слева не определялась, раневые поверхности эпителизовались; отек век и птоз уменьшились, глазная щель стала более широкой, подвижность глаза улучшилась. Отделяемого из свища у медиального угла глаза не было, свищ под коркой. Некротических изменений мягких тканей, слизистой оболочки, «черного струпа» не наблюдали.

Согласно заключению лаборатории патоморфологии и цитологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина риноорбитальный мукормикоз был подтвержден.

Таким образом, на основании выявленных факторов риска (инсулинозависимый сахарный диабет 2 типа, COVID-19, применение системных ГКС в высоких дозах в течение 15 дней), клинических, рентгенологических и лабораторных данных был установлен диагноз: инвазивный мукормикоз придаточных пазух носа (от 24.12.21 г.), решетчатого лабиринта слева с деструкцией костных стенок пазухи и распространением в полость носа, верхнечелюстную, основную пазуху слева, орбиту слева. Состояние после оперативного лечения от 24.12.21 г. и 29.12.22 г. Сопутствующий диагноз: новая коронавирусная инфекция (ПЦР+ от 05.11.21 г.); двусторонняя полисегментарная пневмония, тяжелое течение, реконвалесцент от 15.11.21 г.; сахарный диабет 2 типа, субкомпенсированный; ишемическая болезнь сердца; атеросклеротический кардиосклероз; гипертоническая болезнь 3 стадии; артериальная гипертензия 3 ст., риск 4; избыточная масса тела (ИМТ – 28,7 кг/м²).

Согласно рекомендациям, больная получала антимикотическую терапию позаконазолом в суточной дозе 800 мг в течение 10 недель. По результатам КТ головного мозга и лёгких в динамике очагов диссеминации не выявлено. Пациентка отмечала разрешение птоза слева, восстановление подвижности глаз-

ного яблока, отсутствие болевого синдрома. В настоящее время сохраняется снижение остроты зрения слева. Продолжено наблюдение ЛОР-специалистами по месту жительства (Крым), запланирована очная консультация специалистами кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленный клинический случай – первый случай COVID-19 ассоциированного мукормикоза в Пермском крае. Дебют клинической симптоматики микоза отмечен примерно на 6 сутки от начала НКВИ и на 4-й день пребывания в специализированном стационаре. По данным международных наблюдений, проявления мукормикоза были зафиксированы как в первые сутки COVID-19, так и в сроках до 90 дней, в среднем составляя 14-30 суток [6, 11]. В нашем случае жалобы у больной сохранялись и прогрессировали в течение 45 дней, что обусловило госпитализацию в оториноларингологическое отделение и специализированное оперативное лечение.

Микоз развился на фоне инсулинозависимого сахарного диабета 2 типа. По данным российской и общемировой статистики, сахарный диабет является фоновым заболеванием у больных COVID-М в 70-80% случаев [1-6]. Очевидным фактором риска было применение системных ГКС при лечении НКВИ. Исследователи отмечают высокий риск развития COVID-М при использовании кортикостероидов длительностью более 10 суток [6, 14, 15]. Наша пациентка получала стероиды в течение 15 дней. Также большое значение в публикациях придаётся суточной дозе ГКС. Авторы указывают на значимость дозы 100 мг и более по преднизолону в сутки [16]. В приеденном нами случае при лечении COVID-19 использовали раствор дексаметазона 24 мг в сутки, что соответствует 180 мг преднизолона.

У нашей больной COVID-М протекал в риноорбитальной форме, что согласуется с общемировыми данными. В соответствии с международными показателями, от 84 до 95% случаев мукормикоза у больных COVID-19 характеризуются поражением полости носа, ОНП, орбиты и ЦНС [1, 2, 6, 11].

Диагноз был установлен на основании патогистологического исследования материала, полученного при повторном оперативном вмешательстве. Отметим необходимость микологической настороженности и подготовленности патоморфолога, выполняющего исследование. Выделить мукоромицеты в культуре при посеве на среду Сабуро не удалось. По данным литературы, высеив мукоромицетов из патологического материала наблюдали только в 25-30% случаев [2, 17].

Учитывая деструктивный рост образования с

распространением в соседние структуры, включая орбиту, дифференциальную диагностику проводили, прежде всего, со злокачественным образованием. В подобных случаях необходимы онкологическая и микологическая настороженность, а также параллельное максимально быстрое исключение этих заболеваний для своевременного назначения специфической терапии.

В нашем случае лечение включало хирургическое удаление измененных тканей, системную и местную антимикотическую терапию, коррекцию фонового сахарного диабета. Оперативное вмешательство было эндоскопическим, относительно щадящим. Радикальное экстраназальное вскрытие поражённых ОНП и орбиты не проводили в связи с относительно стабильной клинической картиной, отсутствием обширных участков некроза тканей и слизистой оболочки. Антимикотическая терапия включала в себя прием внутрь суспензии позаконазола 800

мг в сутки, а также промывание придаточных пазух носа раствором амфотерицина В дезоксихолата. Было рекомендовано исследование иммунологического статуса [18].

На фоне проведённого лечения отмечали положительную динамику, пациентка была выписана из отделения в удовлетворительном состоянии. Продолжительность госпитализации составила 13 дней. По общемировым данным, выживаемость больных COVID-М достигает 70-80% [6-9, 17].

Несмотря на значительное снижение темпов распространения COVID-19, необходимо сохранить микологическую настороженность специалистам многих специальностей, чтобы комплексно подходить к лечению больных мукомикозом различных локализаций, перенёсших новую коронавирусную инфекцию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Prakash H., Chakrabarti A. Epidemiology of Mucormycosis in India. *Microorganisms*. 2021; 9 (3): 523. doi:10.3390/microorganisms9030523
2. 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 journal of ophthalmology*, 69 (7): 1670-1692. doi.org/10.4103/ijo.IJO_1565_21
3. Хостелиди С.Н., Зайцев В.А., Пелих Е.В. и др. Мукомикоз на фоне COVID-19: описание клинического случая и обзор литературы. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2021; 23 (3): 255-262. [Khostelidi S.N., Zaitsev V.A., Pelikh E.V., et al. Mucormycosis following COVID-19: clinical case and literature review. *Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy*. 2021; 23 (3): 255-262. (in Russ)]. doi: 10.36488/смач.2021.3.255-262
4. Чарушин А.О., Хостелиди С.Н., Боровинский Р.И. и др. Первое описание клинического случая мукомикоза околоносовых пазух в Пермском крае. *Проблемы медицинской микологии*. 2022; 24 (1): 19-25. [Charushin A.O., Khostelidi S.N., Borovinsky R.I., et al. The first clinical case of invasive mucormycosis of the paranasal sins in the Perm region. *Problems in Medial Mycology*. 2022; 24 (1): 19-25. (in Russ)]. doi: 10.24412/1999-6780-2022-1-19-24
5. Bhatt K., Agolli A., Patel M.H., et al. High mortality coinfections of COVID19 patients: mucormycosis and other fungal infections. *Discoveries (Craiova)*. 2021; 9 (1): e126. doi: 10.15190/d.2021
6. Khostelidi S., Zaytsev V., Evtukh G., et al. COVID-19 associated mucormycosis (CAM) in Russian Federation: results of prospective multi-centre study. Presentation at ECCMID 2022. Poster Session. Abstract / Presentation Number: 1641 / P1563.
7. Seidel D., Simon M., Sprute R., et al. Results from a national survey on COVID-19-associated mucormycosis in Germany: 13 patients from six tertiary hospitals. *Mycoses*. 2022; 65 (1): 103-109. doi.org/10.1111/myc.13379
8. Buil J.B., van Zanten A.R.H., Bentvelsen R.G., et al. Case series of four secondary mucormycosis infections in COVID-19 patients, the Netherlands. *Euro Surveill*. 2021; 26 (23): 2100510. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.23.2100510
9. Hanley B., Naresh K.N., Roufousse C., et al. Histopathological findings and viral tropism in UK patients with severe fatal COVID-19: a post-mortem study. *Lancet Microbe*. 2020; 1 (6): e245-e253. doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30115-4
10. 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; 6: 1-8. doi: 10.1007/s12663-021-01532-1
11. Sarkar S., Gokhale T., Choudhury S.S., Deb A.K. COVID-19 and orbital mucormycosis. *Indian J. Ophthalmol*. 2021 Apr; 69 (4): 1002-1004. doi: 10.4103/ijo.IJO_3763_20
12. Donnelly J.P., Chen S.C., Kauffman C.A., et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fun-

gal 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: 1367. doi: 10.1093/cid/ciz1008

13. *Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19».* Версия 13, 14.10.2021 г. Доступно по адресу: <https://static0.minzdrav.gov.ru>. [Temporary methodological recommendations "Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection COVID19". Version 13, 14.10.2021 Available at: <https://static-0.minzdrav.gov.ru> . (in Russ)].

14. *Kumar M., Sarma D.K., Shubham S., et al.* Mucormycosis in COVID-19 pandemic: Risk factors and linkages. Curr. Res. Microb. Sci. 2021; 2: 100057. doi:10.1016/j.crmicr.2021.100057

15. *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

16. *Хостелиди С.Н., Зайцев В.А., Вартамян С.А. и др.* Мукормикоз у больных COVID-19 в России: результаты проспективного многоцентрового исследования. Журнал инфектологии. 2022;14 (2): 116-127. doi.org/10.22625/2072-6732-2022-14-2-116-127 [Khostelidi S.N., Zaitsev V.A., Vartanyan S.A., et al. Mucormycosis in patients with COVID-19 in Russia: the results of a prospective multi-center study. Journal of Infectology. 2022; 14 (2): 116-127 (In Russ)]. doi.org/10.22625/2072-6732-2022-14-2-116-127

17. *Hoenigl M., Seidel D., Carvalho A., et al.* The emergence of COVID-19 associated mucormycosis: Analysis of cases from 18 countries. The Lancet. 2022; 3 (7): E543-E552. doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00237-8

18. *Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Учеваткина А.В. и др.* Иммунологические особенности пациентов с COVID-19 в зависимости от степени тяжести заболевания. Проблемы медицинской микологии. 2021; 23 (1): 3-13. [Frolova E.V., Filippova L.V., Uchevatkina A.E., et al. Immunological features of patients with COVID-19 depending on the severity of the disease. Problems in Medical Mycology. 2021; 23 (1): 3-13. (In Russ)]. doi: 10.24412/1999-6780-2021-1-3-13

Поступила в редакцию журнала 23.06.2022

Рецензент: М.А. Шевяков



ЗНАЧЕНИЕ ХЕМОКИНА CXCL10 И ПЕТРАКСИНА-3 В ДИАГНОСТИКЕ ИНВАЗИВНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА ЛЕГКИХ У ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ, ПОЛУЧАЮЩИХ ПОЛИХИМИОТЕРАПИЮ

Фролова Е.В. (зав. лаб.)*, Шадривова О.В. (доцент), Филиппова Л.В. (с.н.с., доцент), Учеваткина А.Е. (с.н.с.), Богомолова Т.С. (зав. лаб.), Игнатьева С.М. (в.н.с.), Соловьева Г.И. (в.н.с.), Секретарева О.В. (лаборант-исследователь), Зайцева Е.А. (clin. ординатор), Хостелиди С.Н. (доцент), Борзова Ю.В. (зав. микологической клиникой, доцент), Тараскина А.Е. (зав. лаб.), Клишко Н.Н. (зав. кафедрой), Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Инвазивный аспергиллез – одна из ведущих причин заболеваемости и смертности у гематологических пациентов, получающих полихимиотерапию (ПХТ). На сегодняшний день существует потребность в поиске новых иммунологических маркеров для своевременной диагностики инвазивных плесневых инфекций и мониторинга эффективности лечения. Целью нашего исследования было изучение диагностической значимости определения CXCL10 и PTX3 в биологических жидкостях и их связи с иммунологическими показателями у гематологических пациентов, получавших полихимиотерапию.

В исследование включили 21 больного «вероятным» инвазивным аспергиллезом легких (ИАЛ) (Me=59 лет) и 46 пациентов (Me=52 года), у которых ИАЛ был исключен в ходе обследования. Проведено изучение содержания CXCL10 и PTX3 в сыворотке крови и бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ), субпопуляционного состава лимфоцитов, метаболической активности нейтрофилов и способности клеток крови продуцировать интерфероны на начальной стадии инфекционного процесса.

Выявлено, что содержание CXCL10 и PTX3 в БАЛ было значимо выше у больных ИАЛ по сравнению с пациентами без аспергиллезной инфекции. Особенностью больных ИАЛ было значимое снижение абсолютного числа CD4⁺Т-хелперов и угнетение антиген-стимулированной продукции IFN γ в сопоставлении с показателями группы сравнения. Положительная корреляционная связь между уровнями CXCL10 в сыворотке крови и количеством НК-

клеток, содержанием PTX3 и метаболической активностью нейтрофилов указывает на важную роль данных иммунологических медиаторов в патогенетических механизмах антимикотической защиты.

Установлено, что CXCL10 и пентраксин-3 играют важную роль в патогенезе ИАЛ и могут быть рассмотрены в качестве маркеров прогнозирования риска развития грибковой инфекции у гематологических больных, получающих ПХТ.

Ключевые слова: инвазивный аспергиллез легких, CXCL10, PTX3, иммунный ответ, бронхоальвеолярный лаваж, биомаркеры, полихимиотерапия

THE VALUE OF CHEMOKINE CXCL10 AND PENTRAXIN-3 IN THE DIAGNOSIS OF INVASIVE PULMONARY ASPERGILLOSIS IN HEMATOLOGICAL PATIENTS RECEIVING POLYCHEMOTHERAPY

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

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

Invasive aspergillosis is one of the leading causes of morbidity and mortality in hematological patients receiving polychemotherapy (PCT). To date, there is a need to search for new immunological markers for the timely diagnosis of invasive mold infections and monitoring the effectiveness of treatment. The aim of our study was to study the diagnostic significance of the determination of CXCL10 and PTX3 in biological fluids and their relationship with immunological parameters in hematological patients receiving polychemotherapy.

The study included 21 patients with "probable" invasive pulmonary aspergillosis (IAL) (Me=59 years) and 46 patients (Me=52 years) in whom IAL was excluded during the examination. The content of CXCL10 and PTX3 in blood serum and bronchoalveolar lavage (BAL), the subpopulation composition

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

of lymphocytes, the metabolic activity of neutrophils and the ability of blood cells to produce interferons at the initial stage of the infectious process were studied.

It was revealed that the content of CXCL10 and PTX3 in BAL was significantly higher in patients with IAL compared with patients without aspergillosis infection. A feature of patients with IAL was a significant decrease in the absolute number of CD4⁺T-helper cells and inhibition of antigen-stimulated IFN γ production in comparison with the indicators of the comparison group. The positive correlation between the levels of CXCL10 in the blood serum and the number of NK cells, the content of PTX3 and the metabolic activity of neutrophils indicates the important role of these immunological mediators in the pathogenetic mechanisms of antimycotic protection.

It has been established that CXCL10 and pentaxin-3 play an important role in the pathogenesis of IAL and can be considered as markers for predicting the risk of fungal infection in hematological patients receiving PCTs.

Key words: invasive pulmonary aspergillosis, CXCL10, PTX3, immune response, bronchoalveolar lavage, biomarkers, polychemotherapy

ВВЕДЕНИЕ

Грибы рода *Aspergillus* постоянно присутствуют в окружающей среде, некоторые из них являются патогенными для иммунокомпрометированных пациентов [1]. Смертность среди различных когорт гематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом варьирует от 9% до 44% [2, 3]. Эффективность противогрибковой профилактики больных с высоким риском развития грибковой инфекции, а также лечения инвазивного аспергиллеза может быть снижена вследствие нарушения иммунного ответа, появления резистентных штаммов микромицетов, а также токсичности и высокой стоимости антимикотиков [4, 5]. С другой стороны, чрезмерная профилактика и нецелевая терапия могут привести к ненужным побочным эффектам и высоким медицинским расходам, увеличивая риск резистентности к противогрибковым препаратам [3].

В последнее время проводят исследование диагностической ценности определения биологически активных медиаторов как дополнительных биомаркеров инвазивного аспергиллеза у разных групп больных [6]. Также изучают связь однонуклеотидных полиморфизмов генов (ОНП; англ. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) кодирующих белки, участвующие в иммунном ответе, с риском развития грибковых инфекций [7, 8]. Однако полномасштабные исследования немногочисленны.

Клетки врожденного иммунитета, особенно макрофаги и нейтрофилы, являются ключевыми игроками в борьбе с грибковой инвазией. Нейтрофилы обладают множеством эффекторных функций, включающих зависимые и независимые от активных форм кислорода механизмы уничтожения микроорганизмов [9, 10]. Т-клетки, особенно CD4⁺Т-клетки

памяти, специфичные к различным антигенам грибов рода *Aspergillus*, могут быть обнаружены в периферической крови здоровых людей и реципиентов трансплантации гематологических стволовых клеток (ТГСК) [11-13]. Считают, что Т-хелперы 1-го типа (Th1) и Th17 обеспечивают защиту против *Aspergillus* spp., тогда как Th2 оказывают негативное влияние на формирование специфического иммунного ответа [6, 9]. Кроме Т-лимфоцитов, большое значение в уничтожении грибов имеют естественные клетки-киллеры (NK) [13, 14].

Общим свойством всех иммунных клеток является способность вырабатывать широкий спектр биологически активных молекул, которые обеспечивают механизмы межклеточного взаимодействия. Считается, что иммунные медиаторы играют важную роль в защите человека от аспергиллезной инфекции, способствуя инициации, формированию и поддержанию специфического иммунного ответа [6]. Результаты анализов *in vitro* показали, что совместная инкубация незрелых дендритных клеток с прорастающими конидиями грибов значительно увеличивает секрецию цитокинов (IL-6, IL-12, TNF- α и IL-10) и хемокинов (IL-8, CCL20 и CXCL10), а также продукцию PTX3 [6]. Первоначально внимание исследователей было обращено на изучение роли интерферон-гамма индуцибельного протеина 10 (IP-10 от англ. interferon-induced protein of 10), или CXCL10, который является членом семейства CXС α -хемокинов, в формировании защитного иммунитета при различных инфекционных процессах. Известно, что воспалительный процесс тесно связан с секрецией CXCL10 нейтрофилами, моноцитами, эпителиальными, эндотелиальными и стромальными клетками в ответ на IFN γ . CXCL10 специфически активирует рецептор CXCR3 (семь трансмембранных рецепторов, связанных с G-белком (GPCR)), который преимущественно экспрессируется на активированных Т-, В-лимфоцитах, НК, дендритных и макрофагальных клетках. CXCL10 индуцирует хемотаксис, апоптоз, ингибирование роста клеток и ангиостаз. Тот факт, что Th1 продуцируют IFN γ , который индуцирует продукцию CXCL10 различными типами клеток и позволяет CXCL10, в свою очередь, привлекать и рекрутировать Th1, указывает на существование петли положительной обратной связи между Th1, продуцирующими IFN γ , и резидентными клетками, секретирующими CXCL10 [15]. Аномально высокие уровни CXCL10 определялись в различных биосубстратах организма человека, инфицированных вирусами, в частности SARS-CoV-2, бактериями, грибами, что свидетельствует о важной роли данного иммунологического медиатора в патогенезе этих заболеваний [15-19].

Другим активно изучаемым растворимым иммунологическим фактором является пентраксин-3 (PTX3). Известно, что PTX3 образует комплексы на

поверхности конидий грибов рода *Aspergillus*, действуя, как опсонин, что приводит к усилению фагоцитоза и элиминации возбудителя. Впоследствии дендритные клетки мигрируют в региональные лимфатические узлы, представляя на своей поверхности антигенные эпитопы конидий и гиф грибов, что приводит к генерации эффекторных Th, обеспечивающих устойчивость к грибам рода *Aspergillus* [20]. Установлено, что SNPs гена *PTX3* нарушают как альвеолярную экспрессию белка, так и механизмы противогрибкового действия нейтрофилов (формирование и активность нейтрофильных внеклеточных ловушек), что играет важную роль в защите от инвазии гиф грибов в ткани легких [7]. *PTX3* стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов, а также взаимодействует со многими сывороточными белками, участвующими в каскаде комплемента, а также с мембранным белком семейства лектинов типа C, таким как Dectin-1, при этом *PTX3* потенциально усиливает ответ Dectin-1 [20]. Однонуклеотидные полиморфизмы в гене *PTX3* впервые были зарегистрированы в 2014 г., когда определили, что гомозиготный гаплотип (h2/h2) был связан с повышенной восприимчивостью к аспергиллезной инфекции у пациентов после аллогенной ТГСК, вследствие нарушения синтеза *PTX3*, что привело к снижению способности фагоцитирующих клеток к уничтожению конидий грибов [21]. Впоследствии Fisher С.Е. и его коллеги подтвердили, что SNPs гена *PTX3* в значительной степени связаны с риском возникновения ИА у пациентов с ТГСК [22]. Также установлена связь повышенного содержания *PTX3* в БАЛ у гематологических больных после ТГСК с возникновением ИАЛ [23]. В недавней работе предложен алгоритм, объединяющий в себе сочетание традиционных маркеров грибкового заболевания с определением содержания *PTX3* и SNPs в гене *PTX3* у больных с аутоиммунными заболеваниями [24]. Это исследование, как и другое, оценивающие диагностические критерии инвазивного аспергиллеза у больных хронической обструктивной болезнью легких, свидетельствует о расширении когорты больных с риском возникновения грибковой инфекции, требующих персонализированного подхода к диагностике и лечению [25]. Однако отметим, что большинство наблюдений сосредоточено на пациентах с ТГСК и гораздо меньше известно о гематологических больных, получавших ПХТ, и других группах иммунокомпрометированных пациентов. Таким образом, несмотря на растущие знания о важности определения как иммунологических маркеров, так и генетической предрасположенности для своевременной диагностики ИА и прогнозирования исхода инфекционного процесса, подходы к внедрению таких тестов в рутинную клиническую практику остаются ограниченными.

Цель нашего исследования: изучить уровни CXCL10 и *PTX3* в бронхоальвеолярном лаваже, сыворотке крови и их связь с иммунологическими показателями у гематологических пациентов, получавших полихимиотерапию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включили взрослых гематологических больных. Основную группу составил 21 пациент в возрасте от 18 до 74 лет (медиана – 59 лет) с ИАЛ, из них мужского пола – 12, женского – 9. В группу сравнения включили 46 больных (26 мужчин и 20 женщин в возрасте от 24 до 73 лет, медиана – 52 года) с клиническими и радиологическими признаками поражения легких, у которых ИАЛ был исключен в ходе обследования. Контрольная группа состояла из 25 практически здоровых людей (медиана возраста – 29 лет). Для диагностики инвазивного аспергиллеза использовали клинические и лабораторные критерии EORTC/MSG, 2020 [26]. 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. Лабораторная диагностика ИАЛ 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 (калькофлуор белый). Окрашенный препарат просматривали в люминесцентном микроскопе, отмечали наличие септированных нитей мицелия, ветвящихся под углом 45°. Галактоманнан в сыворотке крови и БАЛ определяли иммуноферментным методом с использованием специфической диагностической тест-системы PLATELIA® *Aspergillus* (BIO-RAD Laboratories, США). Наличие галактоманнана оценивали путем сравнения оптической плотности исследуемого материала и контрольного образца, содержащего 1 нг/мл галактоманнана. Диагностически значимым в БАЛ считали индекс выше «1,0».

Определение уровней CXCL10 и *PTX3* в различных биосубстратах (сыворотка, БАЛ) проводили с помощью иммуноферментных тест-систем (R&D, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови было выполнено методом 6-цветного цитофлуориметрического анализа с помощью проточного цитометра Navios™ (BeckmanCoulter, США). Подготовку образцов периферической крови и настройку цитофлуориметра проводили в соответствии с национальными рекомендациями [27]. Лимфоциты окрашивали моноклональными антителами, меченными флуорохромами,

в соответствии с рекомендациями производителя: CD45-PC5/5, CD4-FITC, CD8-ECD, CD3-APC, CD19-FITC, CD56-PC7 и CD25-PE (Beckman Coulter, США). После внесения антител образцы тщательно перемешивали, затем инкубировали при комнатной температуре 15 минут в защищенном от света месте. По завершении инкубации при постоянном перемешивании добавляли лизирующий раствор VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter, США), инкубировали еще 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. При цитометрическом анализе для каждого из образцов набирали не менее 5000 лимфоцитов. Полученные результаты анализировали при помощи программного обеспечения Navios™ Software v1.2 (Beckman Coulter, США). Для дополнительной характеристики Т-клеточного звена иммунной системы вычисляли иммунорегуляторный индекс (ИРИ) – соотношение CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺.

Для исследования продукции IFN γ и IFN α использовали гепаринизированную кровь, разведенную в 5 раз полной питательной средой (ППС): среда RPMI 1640 с добавлением L-глутамин (Биолот, Россия), 200 мкг/мл гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия). Для индуцированной продукции интерферонов в лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл разведенной крови и добавляли 100 мкл рабочего раствора для IFN γ -фитогемагглютинаина-II (ФГА-II) (ПанЭко, Россия) в конечной дозе 25 мкг/мл, для IFN α – 10 мкл вируса болезни Ньюкасла (цитолитический титр – 1/256, ФГУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Россия). Планшеты с исследуемыми образцами культивировали при 37 °С в атмосфере 5%CO₂ в CO₂-инкубаторе (Sanyo MCO-5 AC, Япония) в течение 24 часов. С целью изучения антиген-специфической продукции IFN γ к 100 мкл разведенной в 5 раз крови добавляли 100 мкл аллергена *A. fumigatus* (АлкорБио, Россия) в конечной концентрации 10 мкг/мл. Для разведения крови и аллергена использовали ППС, как описано выше. В предварительных экспериментах были определены оптимальная доза аллергена и сроки культивирования клеток. Для оценки спонтанной продукции цитокинов в лунки планшета вносили по 100 мкл ППС. Через 144 часа инкубации в тех же условиях супернатанты отбирали, аликвотировали и хранили при –20 °С до проведения анализа. Содержание интерферонов в полученных образцах определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем (Вектор-Бест, Россия) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Полученные в процессе исследования данные обрабатывали с применением программной системы STATISTICA 10 (StatSoft, США). Нормальность распределения количественных данных проверяли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка.

Исучаемые характеристики представляли медианами, нижним и верхним квартилями (Me (Q_{0,25};Q_{0,75})). Для оценки значимости различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Для выявления корреляционных взаимосвязей между двумя количественными параметрами применяли непараметрический метод ранговой корреляции по Спирмену с вычислением коэффициента ранговой корреляции (r). Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Демографические характеристики пациентов исследуемых групп были сходными. Различия по полу между больными ИАЛ и группой сравнения отсутствовали (мужчины составили по 57% в каждой). Возраст пациентов с ИАЛ варьировал от 18 до 74 лет (медиана – 59), в группе сравнения – от 24 до 73 лет (медиана – 52).

Фоновые гематологические заболевания больных ИАЛ и группы сравнения представлены в таблице № 1.

Таблица 1

Фоновые заболевания гематологических пациентов

Нозологическая форма	ИАЛ; n=21		Группа сравнения; n=46	
Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ)	7	33%	6	13%
Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ)	1	5%	1	2%
Лимфома Ходжкина (ЛХ)	2	9%	10	22%
Неходжкинская лимфома (НХЛ)	9	43%	22	48%
Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ)	1	5%	2	4%
Множественная миелома (ММ)	1	5%	5	11%

Основным фоновым онкогематологическим заболеванием у больных обеих групп была неходжкинская лимфома (43% vs 48%). В то же время ИАЛ чаще развивался на фоне острого лейкоза (38% vs 15%) и несколько реже – у больных лимфомой Ходжкина (9% vs 22%). Большинство пациентов обеих групп (86% vs 74%) получали цитостатическую ПХТ по различным протоколам (Hyper-CVAD+R, COALL-92, ALL 2009, HAD, 7+3, FLAG и др.). При этом ИАЛ чаще возникал на фоне отсутствия ремиссии гематологического заболевания (65% vs 15%). Интервал после последнего курса ПХТ до развития ИАЛ составил от 7 до 65 дней (медиана – 16 дней).

У абсолютного большинства больных в период, предшествующий развитию ИАЛ, отмечали клинически значимую нейтропению <0,5x10⁹/л (85%, медиана – 12 дней) и лимфоцитопению <1x10⁹/л (65%, медиана – 16 дней). Основными клиническими проявлениями были лихорадка (90%), рефрактерная к антибиотикам широкого спектра действия, и кашель (81%). Дыхательная недостаточность развилась у 48% пациентов, в редких случаях отмечали крово-

харканье (10%). Радиологическими симптомами легочной локализации инвазивного аспергиллеза были двусторонние легочные инфильтраты (76%), развитие гидроторакса (24%), редкими проявлениями были симптом «серпа» (10%) и симптом «ореола» (5%).

Лабораторная диагностика ИАЛ включала микологическое и серологическое исследование БАЛ. При микроскопии БАЛ характерный септированный мицелий наблюдали в 10% случаев, *Aspergillus* spp. при посеве выявили у 52% больных. Возбудителями были: *A. fumigatus* – 73% и *A. niger* – 27%. Тест на галактоманнан в БАЛ был положителен в 67%.

Пациенты с момента постановки диагноза ИАЛ получали антимикотическую терапию: вориконазол, амфотерицин В, итраконазол, каспофунгин и позаконазол. Общая выживаемость в течение 3-х месяцев составила 70%.

Всем больным с подозрением на развитие ИАЛ проводили иммунологическое исследование. Установлено, что уровни CXCL10 в сыворотке пациентов с ИАЛ составили 61,4 пг/мл (44,0-75,9) и превышали значения, полученные у больных группы сравнения, – 47,2 пг/мл (29,8-72,4), при этом статистически подтвержденных различий не отмечали ($p=0,178$) (Рис. 1А). Однако у больных ИАЛ обнаружено значимое повышение содержания CXCL10 в БАЛ по отношению к показателям группы сравнения (254,0 пг/мл (52,0-502,0) vs 29,5 пг/мл (2,0-119,0), $p<0,001$) (Рис. 1Б).

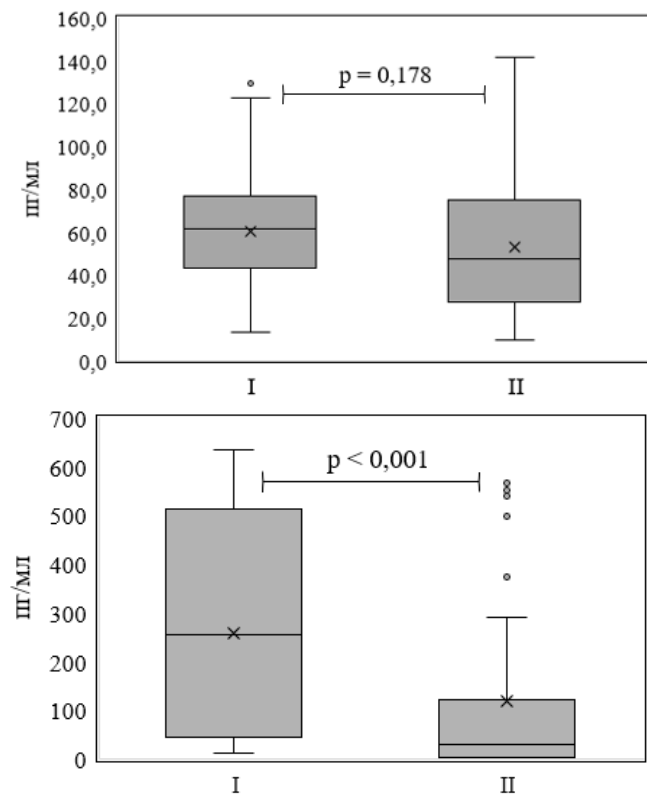


Рис. 1. Уровни CXCL10 в сыворотке (А) и бронхоальвеолярном лаваже (Б) у пациентов с ИАЛ (I) и группы сравнения (II), Ме (Q25-Q75).

Также установлено значимое увеличение концентрации РТХ3 в БАЛ у пациентов с ИАЛ по отношению к содержанию данного иммунологического медиатора у лиц без аспергиллезной инфекции (942,0 пг/мл (250,0-3022,0) vs 116,0 пг/мл (24,2-445,5), $p<0,001$) (Рис. 2). Определена положительная корреляционная связь между CXCL10 и РТХ3 в БАЛ ($r=0,41$; $p=0,002$).

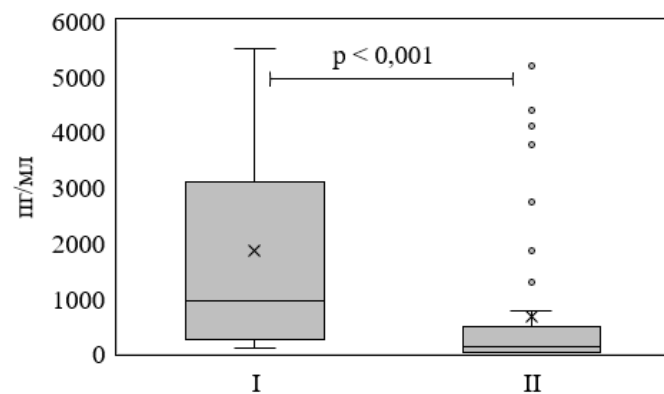


Рис. 2. Уровни РТХ3 в бронхоальвеолярном лаваже у пациентов с ИАЛ (I) и группы сравнения (II), Ме (Q25-Q75).

В дальнейшем изучали взаимосвязь между уровнями растворимых иммунологических маркеров, субпопуляционным составом лимфоцитов и функциональной активностью иммунокомпетентных клеток у больных, включенных в исследование, в сравнении с контрольной группой. Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов представлены в таблице 2.

Установлено достоверное уменьшение относительного и абсолютного числа $CD4^+$ T-хелперов у гематологических больных обеих групп по отношению к показателям контрольной группы. Выявлено повышение относительного числа цитотоксических Т-лимфоцитов в обеих группах гематологических пациентов ($p=0,002$; $p=0,002$ соответственно). Это подтверждено достоверными различиями в значениях иммунорегуляторных индексов (ИРИ) по сравнению с контрольной группой ($p=0,001$; $p=0,001$ соответственно). Установлены разнонаправленные изменения в числе НК и НКТ-клеток. Отмечено снижение относительного ($p=0,045$; $p=0,001$ соответственно) и абсолютного числа НК ($p=0,004$; $p=0,001$ соответственно) в обеих группах гематологических больных по отношению к показателям условно здоровых людей. Абсолютное число НК-клеток положительно коррелировало с уровнями CXCL10 в сыворотке крови ($r=0,31$; $p=0,042$). Выявлено повышение относительного числа НКТ-клеток у больных ИАЛ и группы сравнения ($p=0,048$; $p=0,024$ соответственно) по сравнению со значениями группы контроля. Особенностью гематологических пациентов с ИАЛ было значимое снижение абсолютного числа $CD4^+$ T-хелперов по от-

ношению к показателям группы сравнения ($p=0,035$). Отметим, что отклонения иммунных показателей от контрольных значений были более выражены у больных ИАЛ.

Метаболическая активность нейтрофилов отражает их готовность к уничтожению микроорганизмов. У больных ИАЛ и без аспергиллезной инфекции установлено повышение спонтанного показателя НСТ-теста (30,0% (20,0-48,0) и 26,0% (18,0-46,0) vs 18,0% (14,0-19,0), $p=0,003$; $p=0,009$ соответственно) и активированного НСТ-теста (62,0% (53,0-68,0) и 67,0% (49,0-78,0) vs 57,0% (51,0-59,0), $p=0,024$; $p=0,046$ соответственно) по отношению к контрольным показателям. Установлена положительная корреляционная связь между содержанием РТХ3 в БАЛ и показателями активированного НСТ-теста ($r=0,866$; $p=0,002$).

На следующем этапе провели оценку функциональной активности клеток крови. Особенностью интерферонового статуса обеих групп гематологических пациентов было ослабление способности клеток крови к продукции $IFN\alpha$ (104,0 пг/мл (36,0-150,0) и 81,5 пг/мл (50,0-302,0) vs 207,0 пг/мл (185,0-278,0), $p=0,001$ и $p=0,045$ соответственно) и $IFN\gamma$ (684,5 пг/мл (258,5-1021,5) и 1111,0 пг/мл (399,0-1527,5) vs 1512,0 пг/мл (1244,0-1590,0), $p=0,001$ и $p=0,013$ соответственно). Для оценки антиген-специфической стимуляции клеток крови дополнительно были рассчитаны индексы стимуляции (ИС) как определение соотношения индуцированной продукции цитокинов к их спонтанной выработке. В работах других исследователей также показано, что антиген *A. fumigatus* активировал лимфоциты здоровых доноров к продукции $IFN\gamma$ (табл. 3) [11, 12].

Таблица 2

Субпопуляционный состав лимфоцитов крови гематологических больных

Показатели		Группы наблюдения			Достоверность различий, p
		1	2	3	
		Контрольная группа (n=25)	Группа сравнения (n=46)	ИАЛ (n=21)	
Лейкоциты	$\times 10^9/\text{л}$	5,70 (5,30-6,30)	5,40 (4,50-6,60)	4,75 (2,85-8,70)	
Лимфоциты	%	36,00 (34,00-37,00)	30,00 (19,00-52,00)	27,50 (15,00-41,00)	$p_{1-3}=0,015$
	$\times 10^9/\text{л}$	1,98 (1,89-2,28)	1,33 (0,80-2,03)	1,10 (0,78-1,88)	$p_{1-2}=0,003$ $p_{1-3}=0,001$
Нейтрофилы	$\times 10^9/\text{л}$	3,07 (2,75-3,78)	2,8 (0,83-4,03)	2,29 (1,10-4,87)	
Т-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁻	%	76,00 (70,00-77,00)	80,00 (75,00-91,00)	80,00 (69,00-91,00)	$p_{1-2}=0,014$ $p_{1-3}=0,050$
	$\times 10^9/\text{л}$	1,48 (1,32-1,65)	1,09 (0,63-1,38)	0,84 (0,52-1,14)	$p_{1-2}=0,003$ $p_{1-3}=0,001$
Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	45,00 (42,00-49,00)	38,00 (19,00-44,00)	26,00 (19,00-43,00)	$p_{1-2}=0,005$ $p_{1-3}=0,001$
	$\times 10^9/\text{л}$	0,88 (0,83-1,01)	0,47 (0,30-0,73)	0,25 (0,16-0,47)	$p_{1-2}=0,001$ $p_{1-3}=0,001$ $p_{2-3}=0,035$
Т-цитотоксические CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	26,00 (24,00-29,00)	36,00 (27,00-58,00)	40,00 (25,00-60,00)	$p_{1-2}=0,002$ $p_{1-3}=0,002$
	$\times 10^9/\text{л}$	0,54 (0,45-0,63)	0,45 (0,28-0,77)	0,48 (0,25-0,62)	
NK-клетки CD3 ⁻ CD56 ⁺	%	12,00 (10,00-14,00)	8,60 (5,5-12,50)	6,00 (3,00-10,3)	$p_{1-2}=0,045$ $p_{1-3}=0,001$
	$\times 10^9/\text{л}$	0,25 (0,20-0,29)	0,13 (0,05-0,26)	0,10 (0,04-0,16)	$p_{1-2}=0,004$ $p_{1-3}=0,001$
NKT-клетки CD3 ⁺ CD56 ⁺	%	2,30 (1,30-3,00)	3,80 (1,75-7,30)	3,40 (1,00-6,40)	$p_{1-2}=0,024$ $p_{1-3}=0,048$
	$\times 10^9/\text{л}$	0,05 (0,03-0,06)	0,06 (0,02-0,16)	0,04 (0,01-0,12)	
ИРИ		1,70 (1,60-1,90)	1,00 (0,50-1,40)	0,80 (0,35-1,45)	$p_{1-2}=0,001$ $p_{1-3}=0,001$

Примечание. Представлены медианные значения с интерквартильным размахом Me ($Q_{25}-Q_{75}$). Статистически значимые различия p между группами выявлены с использованием критерия Манн-Уитни.

Таблица 3

Показатели продукции интерферонов у гематологических больных

Показатель	Группы наблюдения			Достоверность различий, р
	1	2	3	
	Контрольная группа (n=25)	Группа сравнения (n=46)	ИАЛ (n=21)	
IFN α индуцированный, пг/мл, 24 часа	207,0 (185,0 – 278,0)	81,5 (50,0 – 302,0)	104,0 (36,0 - 150,0)	p ₁₋₂ =0,045 p ₁₋₃ =0,001
IFN γ ФГА, пг/мл, 24 часа	1512,0 (1244,0 – 1590,0)	1111,0 (399,0 – 1527,5)	684,5 (258,5 – 1021,5)	p ₁₋₂ =0,013 p ₁₋₃ =0,001
IFN γ спонтанный, пг/мл, 144 часа	7,7 (3,5 - 10,4)	21,5 (2,0 – 31,4)	12,0 (2,0 -24,0)	
IFN γ <i>A.fumigatus</i> , пг/мл, 144 часа	32,0 (20,8 - 49,0)	45,10 (2,6 - 58,0)	16,0 (13,0 – 29,4)	p ₁₋₃ =0,024
ИС IFN γ	5,76 (2,1 - 11,0)	2,03 (0,88– 5,30)	1,00 (0,87 – 2,00)	p ₁₋₃ =0,027

Примечание. Представлены медианные значения с интерквартильным размахом Ме (Q₂₅-Q₇₅). Статистически значимые различия р между группами выявлены с использованием критерия Манн-Уитни.

В группе больных ИАЛ по сравнению с группой контроля были выявлены значимо более низкие уровни IFN γ (16,0 пг/мл (13,0-29,4) vs 32,0 пг/мл (20,8 - 49,0); p=0,024) и значения ИС (1,00 (0,87-2,00) vs 5,76 (2,1-11,01); p=0,027) в ответ на индукцию грибковым антигеном (табл. 2). Таким образом, для гематологических больных ИАЛ было характерно снижение продукции митоген- и антиген-стимулированной продукции IFN γ , который в норме усиливает антифунгальную активность макрофагов и нейтрофилов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранняя диагностика и своевременное назначение противогрибковой терапии имеют наибольшее значение в успешном лечении больных ИАЛ [26]. Диагностика инвазивных плесневых инфекций остается сложной из-за низкой чувствительности диагностических тестов, включая посев и другие микологические тесты, особенно у пациентов, получающих противогрибковую профилактику. Кроме того, надежные маркеры для мониторинга лечения и прогнозирования результатов терапии отсутствуют. Таким образом, существует потребность в поиске новых маркеров для своевременной диагностики инвазивных плесневых инфекций, мониторинга эффективности лечения, в том числе определения сроков прекращения антимикотической терапии.

Противогрибковые профилактические стратегии, широко применяемые в группах высокого риска (например, острый лейкоз или реципиенты алло-ТГСК), могут свести к минимуму риск развития инвазивного аспергиллеза [28]. Тем не менее, даже при отсутствии противогрибковой профилактики, у большинства (>85%) гематологических пациентов не развивается инвазивный аспергиллез, несмотря на очевидный риск и постоянный контакт с грибами [29]. Поэтому в последнее десятилетие ведется активное изучение возможности использования имму-

нологических биомаркеров и SNPs генов, кодирующих участвующие в иммунном ответе белки, в расшифровке патогенеза ИАЛ и совершенствование диагностических подходов [6-8].

Как уже упоминалось, хемокины являются важными регуляторными молекулами, отвечающими за активацию и миграцию лейкоцитов, а также участвуют в развитии легочной патологии при различных острых и хронических заболеваниях легких [6]. Установлено, что провоспалительный хемокин CXCL10 играет важную роль в патогенезе инфекционных заболеваний [15]. Отметим, что уровни CXCL10 в плазме крови коррелируют с тяжестью и прогрессированием COVID-19 [16, 17]. Определение содержания CXCL10 у детей позволяет прогнозировать тяжесть течения и исход микоплазменной инфекции [18]. Однако сведений о значении CXCL10 в патогенезе ИАЛ недостаточно. Mezger M. и соавт. сообщили, что повышенный риск развития ИА у больных после алло-ТГСК ассоциирован с тремя SNPs (*CXCL10*, 4q21, 11,101 C>T, p=0,007; 1642 C<G, p=0,003; -1101 A<G, p=0,001). В сыворотке пациентов с доказанным/вероятным ИАЛ выявлены значимо более высокие уровни CXCL10 по сравнению с образцами, полученными от лиц с ослабленным иммунитетом без ИАЛ [19]. Ранее мы не обнаружили связи SNPs G-135A (rs56061981) и A-1447G (rs 4508917) промоторной области гена *CXCL10* с риском развития ИАЛ у гематологических пациентов, получавших ПХТ [30]. В настоящем исследовании мы не выявили различий в содержании CXCL10 в сыворотке крови у гематологических больных с грибковой инфекцией и без нее, но установили достоверно более высокое содержание провоспалительного хемокина в БАЛ у пациентов с ИАЛ по сравнению с показателями в группе сравнения. Интересно, что в исследованиях, проведенных в течение последних лет, авторы попытались объяснить парадокс, заключающийся в том, что наиболее

мощный хемокин, привлекающий антиген-специфические Т-лимфоциты в очаг воспаления, не способствует защите от развития инфекционного процесса и может служить предиктором неудачного ответа на лечение [31, 32]. Casrouge A. и коллеги продемонстрировали, что высокие уровни CXCL10, обнаруживаемые у пациентов с хроническим гепатитом С, обусловлены наличием преимущественно антагонистической формы хемокина, возникающей после укорочения аминокислотного конца ферментом дипептидилдипептидазой 4 (DPP4) [31]. В более поздней работе авторы установили, что ингибирование DPP4 приводит к повышению уровня агониста CXCL10 в плазме как здоровых людей, так и пациентов с хроническим гепатитом С [32]. Проведенные на мышцах эксперименты показали, что ингибирование DPP4 приводит к уменьшению опухолевой массы за счет улучшения внутриопухолевой миграции эффекторных Th1 [33]. DPP4 представляет собой плеотропную протеазу, наиболее известную своей центральной ролью в метаболизме глюкозы, ответственной за деградацию инкретинов, таких как глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) [34]. В иммунной системе мембраносвязанная форма DPP4 (CD26) выполняет костимулирующие функции за счет прямого взаимодействия с CD45, а также регуляторные функции за счет инактивации провоспалительных медиаторов, включая хемокины и цитокины [32]. Укорочение молекулы CXCL10 протеазой DPP4 генерирует доминантно-негативную форму белка, которая способна связывать свой рецептор CXCR3 (CD183), но не индуцирует передачу сигналов [35]. В плазме больных туберкулезом были обнаружены более высокие уровни общей и антагонистической формы CXCL10, а также сниженная активность фермента DPP4 по сравнению с контрольной группой. Возможно, что CXCL10 был инактивирован вскоре после секреции, связанной с мембраной DPP4 (CD26), что снизило его хемотаксический потенциал. Известно, что DPP4 является мишенью для класса ингибиторов ферментов, используемых при лечении диабета. Авторы высказали предположение, что эти препараты можно использовать в качестве дополнительной иммунотерапии у пациентов с туберкулезом, особенно с мультирезистентной формой [36]. Мы допустили, что присутствием антагонистической формы CXCL10 можно объяснить существенный разброс индивидуальных значений провоспалительного хемокина в сыворотке и БАЛ у гематологических больных обеих групп в нашем исследовании.

Для более полной характеристики значения CXCL10 при аспергиллезной инфекции было необходимо оценить его связь с иммунокомпетентными клетками, которые играют важную роль в защите от ИА [9, 10]. При определении субпопуляционного состава лимфоцитов было установлено снижение

абсолютного числа CD4⁺Т-хелперов, NK-клеток на фоне повышения относительного числа цитотоксических CD8⁺Т-лимфоцитов и НКТ-клеток у гематологических больных по сравнению с контрольными показателями. Особенностью пациентов с ИАЛ было значимое снижение абсолютного числа CD4⁺Т-хелперов и способности клеток крови к продукции IFN γ в ответ на антиген *A. fumigatus* в сопоставлении с показателями группы сравнения. Полученные данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований и других авторов [13, 37, 38]. Так, Stuehler C. с соавт. установили, что число CD4⁺, CD8⁺Т-клеток и секреция антиген-специфического IFN γ были значительно снижены в течение 12 месяцев у пациентов после алло-ТГСК. Снижение количества NK-клеток ниже порога 200 кл/мкл было связано с риском развития вероятного/доказанного ИАЛ. Восстановление числа NK-клеток до нормативных показателей в течение 1 года произошло быстрее у больных с хорошо контролируемым ИАЛ по сравнению с пациентами с плохим исходом. Был сделан вывод, что количество NK-клеток может служить ориентиром для определения длительности назначения противогрибкового лечения [13]. В нашем исследовании установлена положительная корреляционная связь между уровнями CXCL10 и количеством NK-клеток, что подтверждает важную роль провоспалительного хемокина в защите от аспергиллезной инфекции. Таким образом, как и у больных после ТГСК, у пациентов, получающих ПХТ, необходимо провести длительное наблюдение для выявления иммунологических биомаркеров тяжести течения и исхода ИАЛ.

Важным компонентом врожденного иммунитета, участвующим в защите от различных микроорганизмов, является РТХ3. РТХ3 представляет собой растворимый рецептор распознавания образов (PRR), который продуцируется несколькими видами клеток, такими как нейтрофилы, дендритные клетки, макрофаги и эпителиальные клетки. Однако именно в нейтрофилах РТХ3 хранится в специфических гранулах в виде зрелых гликозилированных мономеров и собирается в полимер во внеклеточной среде [20]. Считается, что РТХ3 может играть важную роль в защите против грибов рода *Aspergillus*, так как участвует в распознавании, фагоцитозе и уничтожении конидий грибов [20]. Следовательно, определение уровней РТХ3 в различных биосубстратах может быть полезно для прогнозирования, обнаружения и лечения аспергиллезной инфекции. Кроме того, нельзя игнорировать сильную связь между SNPs гена РТХ3 и восприимчивостью к *Aspergillus* spp. [7, 8]. Отметим, что большинство генетических и иммунологических исследований сосредоточено на гематологических пациентах после ТГСК.

В нашей работе установлены значимо более высокие уровни РТХ3 в БАЛ у гематологических

больных с ИАЛ по отношению к показателям группы сравнения. Тесное взаимодействие РТХЗ с функциональной активностью нейтрофилов подтверждается положительной корреляционной связью содержания РТХЗ в БАЛ с результатами НСТ-теста, отражающего метаболическую активность фагоцитирующих клеток. Полученные данные совпадают с результатами других авторов. Kabbani D. с коллегами показали, что содержание РТХЗ в БАЛ было значительно выше среди больных ИАЛ. Авторы посчитали, что данный биомаркер может помочь в идентификации пациентов с колонизацией грибами рода *Aspergillus* и ложноположительным результатом теста на галактоманнан в БАЛ. [23]. Известно, что основная противогрибковая терапия ИАЛ включает вориконазол, липосомальный амфотерицин В, позаконазол [2, 3]. За последнее десятилетие в серии фармакологических исследований на экспериментальных моделях показано, что рекомбинантный гРТХЗ можно эффективно использовать для лечения легочной инфекции, вызванной грибами рода *Aspergillus* [39, 40]. Так, при исследованиях на экспериментальной модели ИАЛ выявлено, что совместное введение РТХЗ и вориконазола эффективно улучшает дыхательную функцию и снижает грибковую нагрузку на легкие [40]. Полученные данные указывают на благоприятные перспективы использования РТХЗ в качестве как маркера ИАЛ, так и новых подходов в лечении инфекционного процесса.

Таким образом, иммунологические маркеры демонстрируют перспективность в совершенствовании диагностики ИАЛ, в частности, у больных с отрицательными уровнями галактоманнана в БАЛ, а также могут быть полезными для мониторинга и прогнозирования эффективности антимикотической терапии. Однако необходимы многоцентровые исследования, чтобы подтвердить эти результаты, определить надежные пороговые уровни для изучаемых анализов и оценить, насколько легко и экономически эффек-

тивно измерять иммунологические маркеры с помощью простых в использовании методов с коротким временем выполнения, чтобы они были применимы в рутинной клинической практике. Кроме того, необходимы дополнительные исследования, чтобы определить, могут ли иммунологические маркеры быть включены в алгоритмы коррекции антимикотической терапии (например, применение комбинации антимикотиков или переход от внутривенных к пероральным противогрибковым препаратам) либо служить критериями отмены терапии.

ВЫВОДЫ

1. Установлено значимое повышение содержания СХСЛ10 и РТХЗ у больных ИАЛ в бронхоальвеолярном лаваже по отношению к показателям группы сравнения. Между показателями СХСЛ10 и РТХЗ выявлена положительная корреляционная связь.

2. Для гематологических пациентов было характерно снижение абсолютного числа CD4⁺Т-хелперов, НК-клеток и повышение относительного числа цитотоксических CD8⁺Т-лимфоцитов и НКТ-клеток, усиление метаболической активности нейтрофилов, а также снижение митоген-стимулированной продукции IFN γ и IFN α по сравнению с контрольными показателями.

3. Особенностью гематологических больных ИАЛ было значимое снижение абсолютного числа CD4⁺Т-хелперов и угнетение антиген-стимулированной продукции IFN γ по сравнению с показателями группы сравнения.

4. Установлена положительная корреляционная связь между уровнями СХСЛ10 в сыворотке крови и количеством НК-клеток, содержанием РТХЗ в БАЛ и метаболической активностью нейтрофилов у больных ИАЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gregg K.S., Kauffman C.A. Invasive aspergillosis: epidemiology, clinical aspects, and treatment. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2015; 36 (5): 662-672. doi: 10.1055/s-0035-1562893
2. Hachem R., Batista M.V., Kanj S.S., et al. International multicenter experience in the treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised cancer patients. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2019; 11 (1): e2019003. doi: 10.4084/MJHID.2019.003
3. Dib R.W., Hachem R.Y., Chaftari A.M., et al. Treating invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancy: diagnostic-driven approach versus empiric therapies. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18 (1): 656. doi: 10.1186/s12879-018-3584-9
4. Aguado J.M., Vazquez L., Fernandez-Ruiz M., et al. Serum galactomannan vs a combination of galactomannan and PCR-based aspergillus DNA detection for early therapy of invasive aspergillosis in high-risk hematological patients: a randomized controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* 2015; 60: 405-414. doi: 10.1093/cid/ciu833
5. Auberger J., Lass-Flörl C., Aigner M., et al. Invasive fungal breakthrough infections, fungal colonization and emergence of resistant strains in high-risk patients receiving antifungal prophylaxis with posaconazole: real-life data from a single-centre institutional retrospective observational study. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67: 2268-2273. doi: 10.1093/jac/dks189

6. Jenks J.D., Rawlings S.A., Garcia-Vidal C., et al. Immune parameters for diagnosis and treatment monitoring in invasive mold infection. *J. Fungi (Basel)*. 2019; 16; 5 (4):116. doi: 10.3390/jof5040116
7. Cunha C., Carvalho A. Genetic defects in fungal recognition and susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis. *Med. Mycol.* 2019; 57 (Suppl. 2): S211-S218. doi: 10.1093/mmy/myy057
8. White P.L., Price J.S. Incorporating the detection of single nucleotide polymorphisms associated with invasive aspergillosis into the clinic. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2022; 12: 860779. doi: 10.3389/fcimb.2022.860779
9. Camargo J.F., Husain S. Immune correlates of protection in human invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* 2014; 59 (4): 569-577. doi: 10.1093/cid/ciu337
10. 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:10.22625/2072-6732-2017-9-1-47-54
11. Potenza L., Vallerini D., Barozzi P., et al. Characterization of specific immune responses to different *Aspergillus* antigens during the course of invasive aspergillosis in hematologic patients. *PLOS One*. 2013; 8: e74326. doi: 10.1371/journal.pone.0074326
12. Jolink H., Meijssen I.C., Hagedoorn R.S., et al. Characterization of the T-cell-mediated immune response against the *Aspergillus fumigatus* proteins Crf1 and catalase 1 in healthy individuals. *J. Infect. Dis.* 2013; 208: 847-856. doi: 10.1093/infdis/jit237
13. Stuehler C., Kuenzli E., Jaeger V.K., et al. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and association with occurrence and outcome of invasive aspergillosis. *J. Infect. Dis.* 2015; 212 (6): 959-967. doi: 10.1093/infdis/jiv143
14. Schmidt S., Zimmermann S.Y., Tramsen L., et al. Natural killer cells and antifungal host response. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20: 452-458. doi: 10.1128/CVI.00606-12
15. Liu M., Guo S., Hibbert J.M., et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011; 22 (3): 121-130. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.06.001
16. Yang Y., Shen C., Li J., et al. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2020; 146 (1): 119-127.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2020.04.027
17. Blot M., Jacquier M., Aho Glele L.S., et al. CXCL10 could drive longer duration of mechanical ventilation during COVID-19 ARDS. *Crit Care*. 2020; 24 (1): 632. doi: 10.1186/s13054-020-03328-0
18. Li M., Chen Y., Li H., et al. Serum CXCL10/IP-10 may be a potential biomarker for severe *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *BMC Infect Dis.* 2021; 21: 909. doi.org/10.1186/s12879-021-06632-4
19. Mezger M., Steffens M., Beyer M., et al. Polymorphisms in the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell transplantation and influence CXCL10 expression in monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2008; 111 (2): 534-6. doi: 10.1182/blood-2007-05-090928
20. Kang Y., Yu Y., Lu L. The role of pentraxin 3 in aspergillosis: reality and prospects. *Mycobiology*. 2020; 48 (1): 1-8. doi: 10.1080/12298093.2020.1722576
21. Cunha C., Kurzai O., Carvalho A. PTX3 deficiency and aspergillosis. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370 (17): 1666-1667. doi: 10.1056/NEJMc1402787
22. Fisher C.E., Hohl T.M., Fan W., et al. Validation of single nucleotide polymorphisms in invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2017; 129 (19): 2693-2701. doi: 10.1182/blood-2016-10-743294
23. Kabbani D., Bhaskaran A., Singer L.G., et al. Pentraxin 3 levels in bronchoalveolar lavage fluid of lung transplant recipients with invasive aspergillosis. *J. Heart Lung Transplant.* 2017; 36 (9): 973-979. doi: 10.1016/j.healun.2017.04.007
24. Yu Y., Liu Ch., Zhu Ch., et al. A novel algorithm for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis based on pentraxin 3 gene polymorphisms and its adjusted value among autoimmune diseases patients. *Ann. Transl. Med.* 2022; 10 (1): 17. doi: 10.21037/atm-21-4017
25. He Q., Zhang M., Feng C. The role of pentraxin3 in plasma and bronchoalveolar lavage fluid in COPD patients with invasive pulmonary aspergillosis. *BMC Pulm. Med.* 2021; 21 (1): 414. doi: 10.1186/s12890-021-01793-z
26. 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: 10.1093/cid/ciz1008
27. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тоголян Арег 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 Areg A. Standardized technology "Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes with the use of flow cytometers-analyzers" (Project). Medical immunology. 2012; 14 (3): 255-268. (In Russ)]. doi:10.15789/1563-0625-2012-3-255-268
28. Wang J., Zhou M., Xu J., et al. Comparison of antifungal prophylaxis drugs in patients with hematological disease or undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and network meta-analysis. JAMA Netw Open. 2020; 3 (10): e2017652. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.17652
29. Barnes R.A., White P.L., Morton C.O., et al. Diagnosis of aspergillosis by PCR: clinical considerations and technical tips. Med. Mycol. 2018; 56 (suppl.1): 60-72. doi: 10.1093/mmy/mux091
30. Тараскина А.Е., Латыпова Е.М., Пчелин И.М. и др. Аминокислотный полиморфизм сур51а 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 сур51а polymorphism associated with azole resistance of fungi from the genus *Aspergillus*. Problems in Medical Mycology. 2019; 21(3): 39-45. (In Russ)].
31. Casrouge A., Decalf J., Ahloulay M. et al. Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. J. Clin. Invest. 2011; 121:308-17. doi:10.1172/JCI40594
32. Decalf J., Tarbell K.V., Casrouge A., et al. Inhibition of DPP4 activity in humans establishes its *in vivo* role in CXCL10 post-translational modification: prospective placebo-controlled clinical studies. EMBO Mol. Med. 2016; 8: 679-683. doi:10.15252/emmm.201506145
33. Barreira da Silva R., Laird M.E., Yatim N., et al. Dipeptidylpeptidase 4 inhibition enhances lymphocyte trafficking, improving both naturally occurring tumor immunity and immunotherapy. Nat. Immunol. 2015; 16: 850-858. doi:10.1038/ni.3201
34. Klemann C., Wagner L., Stephan M., von Hörsten S. Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system. Clin. Exp. Immunol. 2016; 185: 1-21. doi:10.1111/cei.12781
35. Proost P., Struyf S., Van Damme J. et al. Chemokine isoforms and processing in inflammation and immunity. J. Autoimmun. 2017; 85: 45-57. doi:10.1016/j.jaut.2017.06.009
36. Blauenfeldt T., Petrone L., Del Nonno F., et al. Interplay of DDP4 and IP-10 as a potential mechanism for cell recruitment to tuberculosis lesions. Front. Immunol. 2018; 9: 1456. doi: 10.3389/fimmu.2018.01456
37. 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 E.V., Filippova L.V. et al. Clinico-immunological features of invasive aspergillosis in patients with Hodgkin's disease. Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice. 2014; 7 (2): 233-238. (In Russ)].
38. 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)].
39. Salvatori G, Campo S. Current understanding of PTX3 protective activity on *Aspergillus fumigatus* infection. Med. Mycol. 2012; 50 (3): 225-233. doi:10.3109/13693786.2011.648215
40. Lo Giudice P., Campo S., De Santis R., et al. Effect of PTX3 and voriconazole combination in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis. Antimicrob. Agents Chemother. 2012; 56 (12): 6400-6402. doi: 10.1128/AAC.01000-12

Поступила в редакцию журнала 13.09.2022

Рецензент: В.С. Митрофанов



РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ КАНДИДОЗА СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК, ОНИХОМИКОЗА И ДЕРМАТОМИКОЗА У БОЛЬНЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СУСТАВОВ (ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ)

Баранова М.М. (аспирант), Муравьева Н.В. (с.н.с.)*, Белов Б.С. (зав. лаб.)

Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой, Москва, Россия

Цель исследования: изучить частоту и структуру микозов у больных воспалительными заболеваниями суставов (спондилоартритами – SpA и ревматоидным артритом – RA), получавших различную антиревматическую терапию.

Материал и методы. В одномоментное ретроспективное исследование были включены 411 пациентов. У 247 из них диагностирован SpA, у 164 – RA. Все больные были опрошены врачом-исследователем, дополнительную информацию получали из медицинской документации.

Результаты. Документированы 147 случаев микозов у 134 человек: 62 случая у 61 больного SpA и 85 – у 73 пациентов с RA. При этом у 35 (57,4%) больных SpA и 39 (53,4%) пациентов с RA грибковые инфекции диагностированы впервые после дебюта ревматического заболевания. В структуре микозов лидирующее место занимали кандидоз слизистых оболочек и кожи, а также онихомикоз – 89,8% случаев. У 13 больных отмечено более одной локализации инфекции. Большинство пациентов (86%), сообщивших о развитии грибковых инфекций на фоне воспалительных заболеваний суставов, получали иммуносупрессивную терапию.

Выводы. Проблема микозов у больных SpA и RA представляется достаточно актуальной. Необходимы дальнейшие исследования для уточнения факторов риска этой патологии у данной категории пациентов.

Ключевые слова: микозы, кандидоз, онихомикоз, воспалительные заболевания суставов, спондилоартриты, ревматоидный артрит, иммуносупрессивная терапия

PREVALENCE OF MUCOSAL CANDIDIASIS, ONYCHOMYCOSIS AND DERMATOMYCOSIS IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY DISEASES OF THE JOINTS (PRELIMINARY DATA)

Baranova M.M. (graduate student), Muravyeva N.V. (senior scientific researcher), Belov B.S. (head of the laboratory)

V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia

The objective of the study was to study the frequency and structure of mycoses in patients with inflammatory diseases of the joints (spondyloarthritis – SpA and rheumatoid arthritis – RA) receiving various anti-rheumatic therapy.

Materials and methods. 411 patients were included in a single-stage retrospective study. 247 of them were diagnosed with SpA, 164 – RA. All patients were interviewed by a research doctor, additional information was obtained from medical records.

Results. 147 cases of mycoses were documented in 134 patients: 62 cases in 61 patients with SpA and 85 cases in 73 patients with RA. At the same time, fungal infections were diagnosed in 35 (57,4%) patients with SpA and 39 (53,4%) patients with RA for the first time after the onset of rheumatic disease. In the structure of mycoses, the leading place was occupied by candidiasis of mucous membranes and skin and onychomycosis – 89,8% cases. In 13 patients, more than one localization of infection was noted. The majority of patients (86%) who reported the development of fungal infections against the background of inflammatory diseases of the joints received immunosuppressive therapy.

Conclusion. The problem of mycoses in patients with SpA and RA seems to be quite relevant. Further studies are needed to clarify the risk factors for this pathology in this category of patients.

Key words: mycoses, candidiasis, onychomycosis, inflammatory joint diseases, spondyloarthritis, rheumatoid arthritis, immunosuppressive therapy

ВВЕДЕНИЕ

В современной ревматологии важной клинической проблемой являются коморбидные инфекции в целом и микозы в частности. Полагают, что у больных ревматическими заболеваниями (PЗ) наиболее часто встречаются локальные грибковые инфекции,

* Контактное лицо: Муравьева Наталья Валерьевна, e-mail: n-muravjeva@mail.ru

реже – системные (инвазивные) микозы, которые характеризуются тяжелым течением и высокой летальностью. При этом диагностика грибковых инфекций нередко представляет собой сложную задачу, что обусловлено неспецифической клинической картиной у иммунокомпрометированных пациентов и отсутствием серологических маркеров для ряда возбудителей.

Проблема микозов в ревматологии особенно актуальна в аспекте широкого применения иммуносупрессивной терапии – в первую очередь глюкокортикоидов (ГК), генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП), а также синтетических базисных противовоспалительных препаратов (сБПВП), главным образом метотрексата (МТ), и таргетных синтетических базисных противовоспалительных препаратов (тсБПВП), преимущественно тофацитиниба (ТОФА). Так, по данным испанского регистра биологических препаратов BIOBADASER, частота грибковых инфекций у больных ревматоидным артритом (РА), получавших ингибиторы фактора некроза опухоли- α (иФНО- α), составляла 6,2%, их них 70% случаев были обусловлены грибами рода *Candida* [1]. Вместе с тем, Aikawa N.E. и соавт. [2] зарегистрировали только один случай локального кандидоза у 194 пациентов с РА, анкилозирующим спондилитом (АС), псориатическим артритом (ПсА) и другими ревматическими заболеваниями, получавших иФНО- α (инфликсимаб – ИНФ, адалимумаб – АДА, этанерцепт – ЭТЦ) в комбинации (у 81% больных) с другими иммуносупрессивными препаратами.

Учитывая вышеизложенное, представляется актуальным проведение собственного исследования по проблеме грибковых инфекций у пациентов с воспалительными заболеваниями суставов.

Цель работы: изучить частоту и структуру микозов у больных спондилоартритами и ревматоидным артритом, получавших различную антиревматическую терапию.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В одномоментное ретроспективное исследование были включены 411 больных воспалительными заболеваниями суставов, наблюдающихся в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой». У 247 из них диагностирован СпА, у 164 – РА. Среди больных СпА преобладали мужчины (n=139), возраст пациентов составил $42,5 \pm 16,3$ лет, продолжительность заболевания – $10,8 \pm 8,9$ лет. 155 человек страдали АС, 71 – ПсА, 20 – недифференцированным спондилоартритом, 1 – СпА, ассоциированным с воспалительным заболеванием кишечника. Среди больных РА преобладали женщины (n=131), возраст пациентов составил $52,0 \pm 14,0$ лет, продолжительность заболевания –

$9,7 \pm 9,1$ лет. Большинство больных СпА и РА получали иммуносупрессивную терапию: ГК, МТ, ЛЕФ, ГИБП, один пациент с РА получал ТОФА (табл. 1 и 2).

Таблица 1
Антиревматическая терапия у больных СпА (n=247)

Препарат	Число больных	Доза препарата	Длительность терапии, мес. Ме [25-й, 75-й перцентили]
ГК	79 (31,9%)	<7,5 мг/сут. (n=30) 7,5-30 мг/сут. (n=48) >30 мг/сут. (n=1)	7 [2; 36]
МТ	134 (54,3%)	19,0 \pm 4,6 мг/нед.	12 [4; 36]
ЛЕФ	20 (8,1%)	20 мг/сут.	6 [2; 14]
Сульфасалазин (СУЛЬФ)	148 (59,9%)	2,0 \pm 0,6 г/сут.	9 [3; 25]
ГИБП: - иФНО- α - СЕК - иИЛ-12/23	63 (25,5%) 21 (8,5%) 4 (1,6%)		22 [9; 48] 9,5 [5,5; 15] 22 [7,5; 18]

Таблица 2
Антиревматическая терапия у больных РА (n=164)

Препарат	Число больных	Доза препарата	Длительность терапии, мес. Ме [25-й, 75-й перцентили]
ГК	109 (66,5%)	<7,5 мг/сут. (n=64) 7,5-30 мг/сут. (n=45)	21 [6; 84]
МТ	147 (89,6%)	19,3 \pm 4,6 мг/нед.	36 [12; 72]
ЛЕФ	71 (43,3%)	20 мг/сут.	11,5 [4,5; 33]
СУЛЬФ	30 (18,3%)	1,8 \pm 0,4 г/сут.	30 [12; 60]
Гидрохлорид хлорохин (ГХЛ)	44 (26,8%)	200 мг/сут.	9 [6; 36]
ТОФА	1 (0,6%)	10 мг/сут.	24
ГИБП: - иФНО- α - ТЦЗ - АБЦ - РТМ	22 (13,4%) 6 (3,6%) 8 (4,9%) 19 (11,6%)		11,5 [3; 24] 42 [36; 48] (у 4 – однократно) 4 [2; 10] 30,0 \pm 21,2 (у 15 – однократно)

У больных, сообщивших о развитии микозов на фоне РЗ, была документирована следующая коморбидная патология: сердечно-сосудистые заболевания – у 36%, язвенная болезнь желудка/двенадцатиперстной кишки – у 13%, бронхолегочные заболевания – у 11%, сахарный диабет – у 2,2%, хроническая болезнь почек – у 0,7%. 62%

больных СПА и 83% пациентов с РА никогда не курили, статус «активного курильщика» на момент включения в исследование имели 17% больных СПА и 16% пациентов с РА, ни один из больных не употреблял алкоголь на регулярной основе.

Все пациенты были опрошены врачом-исследователем с заполнением унифицированной анкеты, дополнительную информацию получали из медицинской документации.

Статистическую обработку материала проводили с использованием пакета программ Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США), включая методы параметрического и непараметрического анализа. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Документировано 146 случаев микозов у 133 (32,4%) пациентов: 62 случая у 61 больного СПА и 84 – у 72 пациентов с РА. При этом у 35 (57,4%) больных СПА и 39 (53,4%) пациентов с РА грибковые инфекции диагностированы впервые после дебюта РЗ. У 1 больного СПА и 12 пациентов с РА отмечено более одной локализации микоза. Структура микозов представлена на рисунках 1 и 2.

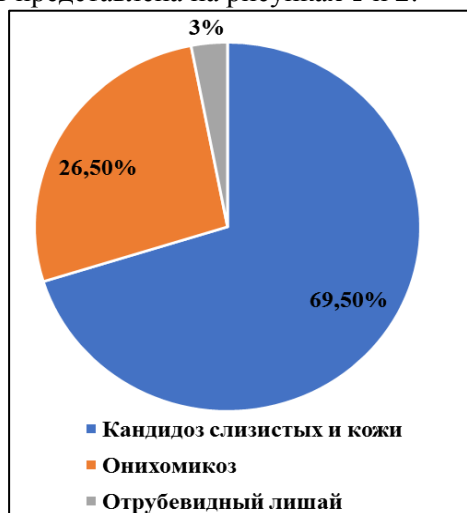


Рис. 1. Структура микозов у больных СПА (n=62).

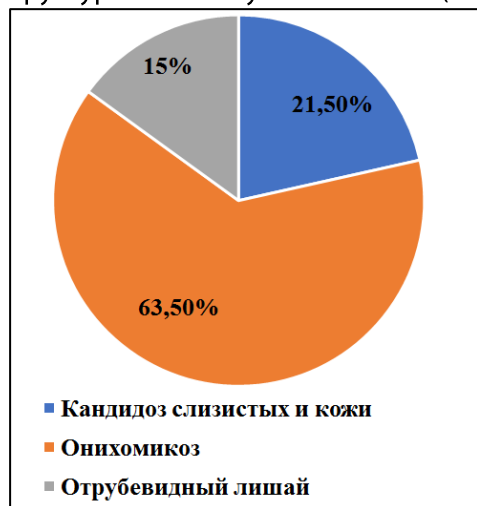


Рис. 2. Структура микозов у больных РА (n=85).

Как видно из представленных рисунков, в структуре микозов у больных СПА преобладал кандидоз слизистых оболочек и кожи (69,5%), тогда как у пациентов с РА – онихомикоз (63,5%). Второе место у больных СПА принадлежало онихомикозу (26,5%), напротив, у пациентов с РА – кандидозу слизистых оболочек и кожи (21,5%). В целом, по данным нашего исследования, у больных воспалительными заболеваниями суставов в структуре микозов лидирующее место занимали кандидоз и онихомикоз – 89,8% случаев.

Большинство пациентов (86%), сообщивших о развитии грибковых инфекций на фоне воспалительных заболеваний суставов, получали иммуносупрессивную терапию. Так, ГК принимали 66 человек, при этом 81% из них получали низкие (<7,5 мг/сут. по преднизолону) дозы ГК. 80 больных принимали МТ, 9 – ЛЕФ. ГИБП получали 53 пациента: иФНО-α м 35, РТМ – 8, СЕК – 5, ТЦЗ – 3, АБЦ – 2. Один больной принимал ТОФА. Вместе с тем, 19 пациентам с микозами иммуносупрессивную терапию не назначали, они получали монотерапию нестероидными противовоспалительными препаратами, СУЛЬФ, ГХЛ.

Данная работа представляет собой первичный анализ данных, не предполагает изучение ассоциаций и факторов риска развития микозов на фоне лечения различными антиревматическими препаратами (в том числе вследствие малочисленности некоторых групп). Этот вопрос является предметом дальнейшего исследования.

ОБСУЖДЕНИЕ

Большинство работ, посвященных распространенности микозов на фоне проводимой иммуносупрессивной терапии, свидетельствуют о достаточно высокой частоте развития этих инфекций, в том числе серьезных [3-6]. В то же время некоторые авторы не подтверждают эти сведения [2, 7]. Поэтому представлялось важным иметь собственное суждение по указанной проблеме.

Проведенное нами исследование показало, что частота развития микозов в когорте больных СПА и РА, находившихся под наблюдением в ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой, составляет 32,6% и может быть расценена как высокая, что сопоставимо с данными большинства зарубежных авторов. При этом лидирующее место в структуре грибковых инфекций у больных воспалительными заболеваниями суставов принадлежит кандидозу и онихомикозу, что совпадает (в отношении инфекций, вызванных грибами рода *Candida*) с показателями других авторов [1]. Сюрпризом для нас стало преобладание онихомикоза у больных РА, а не СПА, поскольку логичным является большая его частота у пациентов с ПСА, который относится к группе СПА. Литератур-

ные источники удостоверяют наше мнение в отношении этого вопроса: установлена более высокая распространенность онихомикоза именно при псориазе ногтей и ПСА, при этом иФНО-α и МТ усугубляют его развитие [8].

Следует еще раз подчеркнуть, что ГИБП, ГК, МТ являются факторами развития микозов у больных воспалительными заболеваниями суставов [3, 8-11], что подтверждено данными нашей работы – лишь 19 пациентов, перенесших грибковую инфекцию, не получали иммуносупрессивную терапию. Также об этом косвенно свидетельствует тот факт, что более чем у 50% больных микозы диагностированы впервые после дебюта РЗ, то есть после инициации иммуносупрессивной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проблема микозов при воспалительных заболеваниях суставов представляется акту-

альной и заслуживает серьезного внимания. Наши данные свидетельствуют о достаточно большой распространенности грибковых инфекций у больных СПА и РА, получавших различную антиревматическую терапию. Необходимы дальнейшие исследования на большей когорте пациентов с целью оценки влияния проводимого лечения на частоту развития микозов и поиска факторов риска их развития.

Статья подготовлена в рамках научно-исследовательской работы ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой». № Государственного задания 1021051503137-7.

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

ЛИТЕРАТУРА

1. Perez-Sola M.J., Torre-Cisneros J., Perez-Zafriilla B., et al. Infections in patients treated with tumor necrosis factor antagonists: incidence, etiology and mortality in the BIOBADASER registry. *Med Clint (Barc)*. 2011; 137 (12): 533-540. doi: 10.1016/j.medcli.2010.11.032
2. Aikawa N.E., Rosa D.T.A., Del Negro G.M.B. Systemic and localized infection by *Candida* species in patients with rheumatic diseases receiving anti-TNF therapy. *Rev. Bras. Reumatol. Engl. Ed.* 2016; 56 (6): 478-482. doi: 10.1016/j.rbre.2015.08.004
3. Davis M.R., Thompson G.R., Patterson T.F. Fungal infections potentiated by biologics. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2020; 34 (2): 389-411. doi: 10.1016/j.idc.2020.02.010
4. Hsu C-Y., Chi-Hua Ko C-H., Jiun-Ling Wang J-L., et al. Comparing the burdens of opportunistic infections among patients with systemic rheumatic diseases: a nationally representative cohort study. *Arthritis Res. Ther.* 2019; 21: 211. doi: 10.1186/s13075-019-1997-5
5. Atzeni F., Sarzi-Puttini P., Sebastiani M., et al. Rate of serious infections in spondyloarthropathy patients treated with antitumor necrosis factor drugs: a survey from the Italian registry GISEA. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2019; 37 (4): 649-55. PMID: 30767865
6. Mehta B., Pedro S., Ozen G., et al. Serious infection risk in rheumatoid arthritis compared with noninflammatory rheumatic and musculoskeletal diseases: a US national cohort study. *RMD Open*. 2019; 5: e000935. doi: 10.1136/rmdopen-2019-000935
7. Vaquero-Herrero M.P., Ragozzino S., Iriart X., et al. *Candida* bloodstream infection in patients with systemic autoimmune diseases. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2020; 50 (4): 372-376. doi: 10.1016/j.medmal.2020.01.014
8. Chularojanamontri L., Pattanaprichakul P., Leeyaphan C., et al. Overall prevalence and prevalence compared among psoriasis treatments of onychomycosis in patients with nail psoriasis and fungal involvement. *Biomed Res. Int.* 2021; 2021: 9113418. doi: 10.1155/2021/9113418
9. Tanaka M., Sakai R., Koike R., et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia associated with etanercept treatment in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective review of 15 cases and analysis of risk factors. *Mod. Rheumatol.* 2012; 22: 849-58. doi: 10.3109/s10165-012-0615-z
10. Shimada K., Yokosuka K., Nunokawa T., Sugii S. Differences in clinical Pneumocystis pneumonia in rheumatoid arthritis and other connective tissue diseases suggesting a rheumatoid-specific interstitial lung injury spectrum. *Clin. Rheumatol.* 2018; 37 (8): 2269-2274. doi: 10.1007/s10067-018-4157-4
11. Youssef J., Novosad S.A., Winthrop K.L. Infection risk and safety of corticosteroid use. *Rheum Dis. Clin. North Am.* 2016; 42 (1): 157-176, ix-x. doi: 10.1016/j.rdc.2015.08.004

Поступила в редакцию журнала 15.08.2022

Рецензент: Н.Н. Климко

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ПОРАЖЕНИЙ КОЖИ И СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК

¹Корнишева В.Г. (профессор кафедры)*,
²Гордя Н.А. (н.с.), ³Макарова Ю.К. (врач-
дерматовенеролог)

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра дерматовенерологии), Санкт-Петербург; ²Санкт-Петербургский государственный университет (кафедра энтомологии), Санкт-Петербург; ³Выборгская межрайонная больница, Выборг, Россия

Цель работы: оценить эффективность и безопасность местного противовирусного препарата, содержащего пептид аллостатинон, для лечения рецидивирующей герпетической инфекции (ГИ).

В рандомизированном контролируемом открытом исследовании участвовали 56 больных с хронической рецидивирующей ГИ по срокам наблюдения от момента обращения не менее 4-5 лет. Оценку эффективности лечения гелем с аллостатином проводили по срокам разрешения воспалительных явлений в очагах поражения в сравнении с 5% мазью ацикловир. В процессе терапии отмечали достоверно более быстрое уменьшение объективных проявлений герпеса: размера отека, степени гиперемии, скорости разрешения пузырьков, а также субъективных ощущений жжения и боли по сравнению с 5% мазью ацикловир. Препарат, содержащий аллостатинон, существенно ускорял эпителизацию, сокращая сроки образования и отпадения корочек.

При изучении катамнеза 18 пациентов выявили, что срок ремиссии через 2-3 года после лечения гелем с аллостатином увеличился примерно в 3 раза у 16 человек, а у 2 больных ГИ стала носить abortивный характер.

Безопасность препарата доказана его хорошей переносимостью и полным отсутствием каких-либо побочных эффектов.

Ключевые слова: простой герпес, аллостатинон, противовирусное действие, противорецидивное действие, ремиссия

NEW APPROACHES TO THE TREATMENT OF HERPESVIRUS LESIONS OF SKIN AND MUCOUS MEMBRANES

¹Kornisheva V.G. (professor of the department), ²Gordya N.A. (scientific researcher),
³Makarova Yu.K. (dermatovenereologist)

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Department of Dermatovenereology), St. Petersburg; ²St. Petersburg State University (Department of Entomology), St. Petersburg; ³Vyborg Interdistrict Hospital, Vyborg, Russia

The objective of the work was to evaluate the efficacy and safety of the local antiviral drug containing the peptide allostatin for the treatment of recurrent herpes simplex infection.

An open randomized controlled trial included 56 patients with chronic recurrent herpes simplex infection lasting at least 4-5 years. Evaluation of the effectiveness of treatment with allostatin preparation was carried out according to the timing of resolution of inflammation symptoms in comparison with 5% acyclovir ointment. During the treatment, there was a statistically faster decrease in the objective manifestations of herpes: the size of edema, the degree of hyperemia, the rate of resolution of blisters, as well as subjective burning sensations and pain compared with 5% Acyclovir ointment. A drug with allostatin significantly accelerated epithelialization, reducing the time of scabs formation and falling off.

The study of the catamnesis of 18 patients showed that the remission period in 2-3 years after allostatin containing drug treatment increased approximately 3 times in 16 patients, and in 2 patients herpes infection became abortive.

The safety of the drug has been proven by its good tolerability and the complete absence of any side effects.

Key words: herpes simplex, allostatin, antiviral effect, anti-relapse effect, remission

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции, вызываемые вирусами простого герпеса (ВПГ), представляют собой глобальную проблему. По последним данным ВОЗ, более 3,7 миллиардов человек (67%) инфицированы ВПГ-1, и еще 491 миллионов человек – ВПГ-2 [1].

Особенность герпетической инфекции (ГИ) заключается в пожизненной персистенции вируса в организме и, как следствие, возможности рецидивирования и прогрессирования. Из места первичного заражения вирус мигрирует в ганглии нервной системы, где может находиться долгое время в латент-

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

ном состоянии. Реактивация вируса под действием провоцирующих факторов приводит к перемещению вируса по аксонам и размножению в эпителиальных клетках кожи и слизистых оболочек. Этот циклический процесс повторяется, при этом периоды ремиссии сменяются острыми эпизодами с герпетическими высыпаниями. На развитие рецидивов большое влияние оказывает угнетение местного иммунитета, прежде всего Т-лимфоцитов и НК-клеток, поэтому применение местных противовирусных средств имеет важное значение в терапии ВПГ [2-4].

Чаще всего для лечения рецидивирующей ГИ назначают ациклические нуклеозиды – ацикловир и его аналоги. Клинический опыт применения этих химиотерапевтических средств показал, что, быстро и эффективно купируя острые проявления ГИ, они не предотвращают рецидивов ГИ, а в ряде случаев даже не снижают их частоту. При лечении ГИ ацикловиром и его аналогами возможно формирование резистентных штаммов, особенно у больных с иммунодефицитными состояниями [5, 6]. Наличие резистентных штаммов ВПГ представляет серьезную проблему при терапии данных категорий больных. Поэтому в настоящее время поиск новых противовирусных средств и совершенствование терапии ГИ продолжается.

Для лечения вирусных инфекций кожи и слизистых оболочек разработан новый препарат – гель для наружного применения, содержащий синтетический пептид аллостатин (аллоферон-3), представитель семейства аллоферонов с улучшенными характеристиками биологической активности. Терапевтическое действие аллостатина, как и других аллоферонов, направлено на усиление распознавания вирусных антигенов иммунокомпетентными клетками и уничтожение очагов вирусной инфекции [7]. В частности, в присутствии аллостатина значительно усиливаются способность НК-клеток распознавать и лизировать аномальные клетки, а также продукция интерферона лейкоцитами в ответ на стимуляцию вирусным антигеном. В том и другом случае аллостатин выступает в качестве кофактора активации иммунного ответа, для формирования которого необходимо участие основного сигнала – патологически измененной клетки или вирусного антигена. Эта особенность позволяет локализовать действие препарата в очаге поражения, избегая избыточных реакций иммунной системы за его пределами, характерных для других иммунотропных лекарственных средств. Кроме этого аллостатин отличается высоким уровнем безопасности применения, обусловленным полным отсутствием общей и специфической токсичности даже в дозах, в десятки тысяч раз превышающих терапевтические.

С целью повышения эффективности лечения и профилактики рецидивов ГИ было проведено кли-

ническое исследование геля, основным действующим веществом которого является пептид аллостатин, в качестве средства местной монотерапии. Для этого были поставлены следующие задачи: оценить снижение степени выраженности клинических симптомов инфекции, сроки заживления (эпителизации) очагов поражений, увеличение длины межрецидивных периодов и безопасность препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кафедрой дерматовенерологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова на базе Выборгской межрайонной больницы было проведено рандомизированное контролируемое открытое исследование в амбулаторных условиях. Изучали противогерпетическую эффективность геля с аллостатином в сравнении с 5% мазью ацикловир. Под наблюдением в течение 4-5-лет находились 56 больных в возрасте от 16 до 71 лет с хронической рецидивирующей ГИ. Эффективность геля с аллостатином исследовали у 41 пациента (женщин – 33, мужчин – 8) с ГИ различной локализации, в том числе: на коже – 2, на слизистых оболочках полости рта – 28, на слизистых оболочках носа – 10. У одного больного на коже имелись проявления опоясывающего лишая. В группе сравнения, получавшей лечение 5% мазью ацикловир, было 15 пациентов (женщин – 11, мужчин – 4) с ГИ различной локализации, в том числе: на коже – 2, на слизистых оболочках полости рта – 9, на слизистых оболочках носа – 4. Больные были распределены по группам лечения случайным образом с помощью процедуры рандомизации.

До начала терапии в течение 1 месяца пациенты не принимали каких-либо противовирусных или иммуномодулирующих препаратов. Из исследования исключались лица с проявлениями острой респираторной инфекции, беременные и кормящие женщины. Все больные проходили до лечения комплексное клинико-лабораторное обследование, включающее медицинский осмотр с характеристикой очагов локализации герпеса, клинические и биохимические анализы крови. Пациенты 1-й группы получали аппликации геля с аллостатином на пораженные участки 2-3 раза в день в течение 3-7 дней. В контрольной группе больные применяли мазь ацикловир местно в виде аппликаций 5 раз в день в течение 7 дней. Контрольное обследование выполняли после окончания лечения на 8-9 день. До начала терапии и на 1, 4, 7-й дни проводили оценку жалоб и клинической картины заболевания (наличие субъективных симптомов, локализацию процесса, размеры высыпаний, наличие в очаге пузырьков, гиперемии, отека, эрозий, корочек). Среднюю степень выраженности признака оценивали по 4х-балльной аналоговой шкале: 0 – отсутствие симптома, 1 – слабое проявление, 2 – среднее проявление, 3 – выраженное проя-

ление. В ходе и по окончании исследования регистрировали нежелательные явления, возникающие в процессе лечения.

Также изучали катамнез больных, получавших препарат с аллостатином по поводу хронической рецидивирующей ГИ. В данном исследовании участвовал 21 пациент (женщин – 16, мужчин – 5) в возрасте от 22 до 71 года с различной локализацией ГИ, в том числе: на коже – 5, на слизистых оболочка полости рта – 8, на слизистых оболочках носа – 5; проявления опоясывающего лишая наблюдали у 3. У всех больных в течение 1-3 года после терапии оценена частота рецидивов ГИ.

Результаты исследований анализировали методом вариационной статистики с помощью программы BioStat 5.9. Достоверность количественных различий между показателями определяли методом дисперсионного анализа по критерию Стьюдента (t).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценку эффективности лечения проводили по срокам разрешения воспалительных явлений в очагах поражения (таблицы 1-4).

Таблица 1

Изменение гиперемии и отечности в очагах герпетической инфекции при применении геля с аллостатином в сравнении с 5% мазью ацикловир

Осмотр	Гель с аллостатином (n=41)			5% мазь ацикловир (n=15)		
	N* (%)	Средняя выраженность признаков	P	N (%)	Средняя выраженность признаков	P
До лечения	100	2,5 ± 0,6		93	2,5 ± 0,8	
На 1 день	100	1,7 ± 0,6	>0,05	93	2,6 ± 0,8	>0,05
На 4 день	56	0,6 ± 0,6	<0,05	93	1,9 ± 0,9	>0,05
На 7 день	7	0,1 ± 0,1	<0,001	43	0,7 ± 0,7	>0,05

*N – количество пациентов, ** P – уровень статистической значимости

В первую очередь при лечении гелем с аллостатином разрешались гиперемия и проявления отечности. В первой группе пациентов уже после первого дня терапии явления гиперемии и отечность были слабо или умеренно выражены у 36 (89%) человек, полностью разрешились к 4 дню – у 18 (44%) и к 7 дню – у 38 (93%); во второй группе только после 4 дня лечения воспалительные явления были слабо или умеренно выражены у 9 (64%) и полностью разрешились к 7 дню только у 8 (57%). Из данных таблицы 1 видно, что средняя степень выраженности признаков гиперемии и отечности в очаге поражения статистически достоверно снижалась уже после 3 дней лечения гелем с аллостатином.

Ощущения жжения и болезненности в очагах поражения после первого дня применения препаратов уменьшились у большинства больных из обеих групп, однако только в первой группе они полно-

стью разрешились у 7 (17%) человек. К 4 дню терапии еще у 22 (54%) пациентов из первой группы и только у 3 (21%) из второй группы субъективные ощущения жжения и боли полностью исчезли. При применении геля с аллостатином средняя выраженность этих признаков достоверно снижалась к 4 дню (табл. 2). По окончании лечения на 7 день жалобы на жжение и боль отмечали только у 3 (7%) больных из 1 группы и у 9 (64%) из 2 группы.

Таблица 2

Динамика субъективных ощущений (жжение, боль) в очагах герпетической инфекции при применении геля с аллостатином в сравнении с 5% мазью ацикловир

Осмотр	Гель с аллостатином (n=41)			5% мазь ацикловир (n=15)		
	N* (%)	Средняя выраженность признаков	P	N (%)	Средняя выраженность признаков	P
До лечения	98	2,4 ± 0,7		100	2,5 ± 0,7	
На 1 день	83	1,2 ± 0,7	>0,05	100	1,6 ± 0,7	>0,05
На 4 день	29	0,4 ± 0,6	<0,05	79	1,1 ± 0,7	>0,05
На 7 день	7	0,2 ± 0,3	<0,05	64	0,7 ± 0,6	<0,05

В ходе терапии гелем с аллостатином наблюдали быстрый регресс пузырьковых образований: уже после 1 дня лечения у большинства пациентов отмечали только слабую и умеренную выраженность этого признака, а у 4 (10%) – пузырьки полностью исчезли. На 4 день пузырьки отсутствовали уже у 64% больных из 1 группы, а у остальных воспалительные явления были слабо выражены. Через 7 дней терапии гелем с аллостатином не было зарегистрировано ни одного пациента с пузырьковыми образованиями (табл. 3). Во 2 группе лиц, получавших мазь ацикловир, только к 7 дню лечения средняя тяжесть симптома несколько снижалась, и полное исчезновение признака наблюдали только у 4 (29%) человек.

Таблица 3

Динамика разрешения пузырьков в очагах герпетической инфекции при применении геля с аллостатином по сравнению с 5% мазью ацикловир

Осмотр	Гель с аллостатином (n=41)			5% мазь ацикловир (n=15)		
	N* (%)	Средняя выраженность признаков	P	N (%)	Средняя выраженность признаков	P
До лечения	88	2,0 ± 1,0		100	2,5 ± 0,7	
На 1 день	78	1,2 ± 0,7	>0,05	100	2,4 ± 0,8	>0,05
На 4 день	36	0,5 ± 0,6	>0,05	100	2,3 ± 0,9	>0,05
На 7 день	0	0,0 ± 0	<0,05	71	1,5 ± 1,2	>0,05

Эпителизирующее действие геля с аллостатином оценивали по скорости образования и разрешения корочек в очагах ГИ. Установлено, что формирование корочек началось уже после 1 дня лечения у 12 (29%) больных из 1 группы и у 1 (7%) пациента

из 2 группы. К 7 дню терапии корочки полностью разрешились у 33 (80%) человек из 1 группы и только у 1 (7%) из 2 группы (табл. 4). Средний срок эпителизации при лечении гелем с аллостатином составил $5,4 \pm 1,5$ дня.

Таблица 4

Динамика формирования и разрешения корочек в очагах герпетической инфекции при применении геля с аллостатином в сравнении с 5% мазью ацикловир

Осмотр	Гель с аллостатином (n=41)			5% мазь ацикловир (n=15)		
	N* (%)	Средняя выраженность признаков	P	N (%)	Средняя выраженность признаков	P
До лечения	10	$0,2 \pm 0,6$		7	$0,3 \pm 0,3$	
На 1 день	39	$0,7 \pm 0,8$	>0,05	14	$0,4 \pm 0,4$	>0,05
На 4 день	59	$0,9 \pm 0,8$	>0,05	86	$2,2 \pm 1,1$	>0,05
На 7 день	20	$0,2 \pm 0,5$	>0,05	93	$1,8 \pm 0,9$	>0,05

Таким образом, во всех случаях терапии гелем с аллостатином был достигнут очевидный эффект: уже после первого применения резко уменьшалась зона отека и гиперемии, вскоре после этого исчезало ощущение зуда и жжения. В среднем срок разрешения воспалительных явлений в очаге поражения сократился вдвое по сравнению со сроком на фоне лечения ацикловиром.

Курс терапии у 20 пациентов из первой группы, получавших гель с аллостатином, составил 7 дней, у 4 – 5 дней, у 17 – 3-4 дня. У 14 человек из второй группы, получавших мазь ацикловир, длительность лечения составила не менее 7 дней, одна больная прервала терапию из-за ее малой эффективности. Средняя длительность лечения у пациентов из первой группы составила $5,3 \pm 1,5$ дня и была короче, чем у лиц из второй группы (≥ 7 дней).

Результаты изучения противорецидивного действия геля с аллостатином в терапии ГИ приведены в таблице 5.

Таблица 5

Частота рецидивов герпетической инфекции у больных до и после лечения гелем с аллостатином

N*	Рецидив герпетической инфекции											
	До лечения				После лечения							
					через 1-2 года				через 2-3 года			
	12 мес.	5-6 мес.	2-3 мес.	1 мес.	12 мес.	5-6 мес.	2-3 мес.	1 мес.	12 мес.	5-6 мес.	2-3 мес.	1 мес.
9	-	4	4	1	4	4	1	-	6	3	-	-
7	-	3	3	1	-	3	3	1	1	6	-	-
2	-	-	2	-	-	-	2	-	-	2	-	-

*Количество больных

У 3 больных, у которых ранее отмечали проявления опоясывающего лишая, за весь срок наблюдения рецидива инфекции не было. Оставшихся 18 человек можно разделить на три группы. Первую

группу составили 9 пациентов, у которых срок ремиссии через 1-2 года после лечения гелем с аллостатином увеличился в два раза. В эту группу вошли больные как с умеренной (1 раз в 5-6 месяцев), так и с высокой (1 раз в 1-3 месяца) частотой рецидивирования ГИ. Во второй группе у 7 пациентов частота рецидивирования ГИ осталась такой же, как и до терапии, однако ГИ носила abortивный характер, то есть герпетические высыпания протекали с менее выраженными воспалительными явлениями, без отека и зачастую без образования пузырьков. И только 2 больных отмечали незначительное улучшение в течении дерматоза, хотя и они наблюдали более быстрое разрешение высыпаний при применении геля с аллостатином. Таким образом, уже через 1-2 года после применения геля с аллостатином для лечения хронической рецидивирующей ГИ у 50% (9 из 18) пациентов срок ремиссии увеличивался в два раза, а у 44% (7 из 18) больных ГИ носила abortивный характер.

Через 2-3 года после лечения гелем, содержащим аллостин, у 16 пациентов из 18 (89%) срок ремиссии увеличился в 2-6 раз, в среднем в 3 раза. У двух оставшихся больных ГИ стала носить abortивный характер.

В заключение отметим, что помимо высокой терапевтической эффективности для геля, содержащего аллостин, было характерно полное отсутствие каких-либо побочных эффектов, не отмеченных ни у одного пациента во время лечения.

ОБСУЖДЕНИЕ

В рандомизированном контролируемом открытом клиническом исследовании по оценке эффективности и безопасности геля с аллостатином для лечения рецидивирующей ГИ была установлена его высокая эффективность и хорошая переносимость. При нанесении геля, содержащего аллостин, на участки, инфицированные ВПГ, препарат быстро снимал внешние симптомы воспаления: ощущение боли и жжения, уменьшал размеры зоны отека, гиперемии и ускорял процесс эпителизации. В процессе терапии отмечали достоверно более быстрое уменьшение объективных проявлений, характерных для периода обострения герпеса: размера отека, степени гиперемии, скорости разрешения пузырьков, а также субъективных ощущений жжения и боли по сравнению с ацикловиром. Гель с аллостатином существенно ускорял эпителизацию, сокращая сроки образования и отпадения корочек. Продолжительность клинических симптомов острого эпизода ГИ в среднем сократилась вдвое по сравнению с его продолжительностью на фоне традиционного метода лечения ацикловиром.

При изучении частоты рецидивов ГИ после терапии гелем с аллостатином наблюдали значитель-

ное, до полугода и более, увеличение продолжительности безрецидивного периода. При этом внешние проявления ГИ стали носить абортивный характер, и заболевание протекало намного легче. В среднем срок ремиссии через 2-3 года после лечения увеличился в 3 раза. Длительное последствие составляет уникальное свойство аллоферонов, которое очень редко проявляется у противовирусных препаратов [8, 9].

Безопасность геля с аллостатином доказана отсутствием каких-либо аллергических реакций, побочных эффектов и других нежелательных явлений в процессе терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты и статистические данные, полученные при анализе клинической эффективности геля с аллостатином для лечения хронической ГИ, подтверждают, что гель с аллостатином является высокоэффективным противовирусным препаратом местного действия, который можно рекомендовать для лечения хронической рецидивирующей ГИ любой локализации. Его применение в комплексной терапии пациентов с ВПГ позволяет быстро снять острые симптомы любой степени тяжести, сократить сроки лечения и существенно продлить срок ремиссии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сайт Всемирной Организации Здравоохранения. Вирус простого герпеса. [Website of the World Health Organization. Herpes simplex virus (In Russ)]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
2. Rechenchoski D.Z., Faccin-Galhardi L.C., Linhares R.E.C., Nozawa C. Herpesvirus: an underestimated virus. *Folia Microbiol (Praha)*. 2017; 62 (2): 151-156. doi: 10.1007/s12223-016-0482-7
3. Cohen J.I. Herpesvirus latency. *J. Clin. Invest.* 2020; 130 (7): 3361-3369. doi: 10.1172/JCI136225
4. Kurt-Jones E.A., Orzalli M.H., Knipe D.M. Innate immune mechanisms and Herpes Simplex Virus infection and disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 2017; 223: 49-75. doi: 10.1007/978-3-319-53168-7_3.
5. Акулич Н.Ф., Семенов В.М. Вирус простого герпеса: резистентность к противовирусным препаратам. Материалы 70-ой научной сессии сотрудников университета. Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации. 2015: 24-25. [Akulich N.F., Semenov V.M. Herpes simplex virus: resistance to antiviral drugs. Materials of the 70th scientific session of the University staff. Achievements of fundamental, clinical medicine and pharmacy. 2015: 24-25 (In Russ)].
6. Kukhanova M.K., Korovina A.N., Kochetkov S.N. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry*. 2014; 79 (13): 1635-52. doi: 10.1134/S0006297914130124
7. Chernysh S.I., Kim S.I., Bekker G. et al. Antiviral and antitumor peptides from insects. *PNAS*. 2002; 99 (20): 12628-12632. doi.org/10.1073/pnas.192301899
8. Шульженко А.Е., Зуйкова И.Н. Новое поколение противовирусной терапии при рецидивирующем простом герпесе. Эффективная фармакотерапия. Акушерство и гинекология. 2012; 1: 36-43. [Shulzhenko A.E., Zuikova I.N. A new generation of antiviral therapy for recurrent herpes simplex. Effective pharmacotherapy. Obstetrics and gynecology. 2012; 1: 36-43 (In Russ)].
9. Якубович А.И., Черныш С.И. Применения геля Алломедин в терапии вирусных инфекций кожи и слизистых. Дерматология в России. Тезисы XI съезд, Екатеринбург. 2010: 71-72. [Yakubovich A.I., Chernysh S.I. Applications of Allomedin gel in the treatment of viral infections of the skin and mucous membranes. Dermatology in Russia. Theses of the XI Congress, Yekaterinburg, 2010: 71-72 (in Russ)].

Поступила в редакцию журнала 09.07.2022

Рецензент: Н.Н. Климко



ЗНАЧИМОСТЬ УРОВНЯ ПРОКАЛЬЦИТОНИНА У БОЛЬНЫХ АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КОЖИ

Мавлянова Ш.З. (зав. лаб.), Есионова Е.В. (н.с.)*, Мирзакулова Ш.Н. (аспирант), Муминова С.Р. (зав. лаб.), Извекова О.В. (н.с.)

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр дерматовенерологии и косметологии МЗ, РУз, Ташкент, Узбекистан

В статье приведены показатели уровня прокальцитонина у больных аллергодерматозами, который был повышен в 45,9% случаев и имел прямую корреляционную связь со Staphylococcus aureus ($r=+0,8$), Staphylococcus saprophyticus ($r=+0,5$), Staphylococcus haemolyticus ($r=+0,6$).

Ключевые слова: аллергодерматозы, атопический дерматит, аллергодерматит, прокальцитонин

VALUE OF PROCALCITONIN IN PATIENTS WITH ALLERGIC SKIN DISEASES

Mavlyanova Sh.Z. (head of the laboratory), Esiyeva E.V. (scientific researcher), Mirzakulova Sh.N. (postgraduate student), Muminova S.R. (head of the laboratory), Izvekova O.V. (scientific researcher)

Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Dermatovenerology and Cosmetology of the Ministry of Health, Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

The article presents indicators of the level of procalcitonin in patients with allergic dermatoses, which was increased in 45,9% of cases and had a direct correlation with Staphylococcus aureus ($r=+0,8$), Staphylococcus saprophyticus ($r=+0,5$), Staphylococcus haemolyticus ($r=+0,6$).

Key words: allergodermatosis, atopic dermatitis, allergodermatitis, procalcitonin

* Контактное лицо: Есионова Елена Владимировна, e-mail: dermandven@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Прокальцитонин – прогормон весом 14,5 кДа, являющийся предшественником кальцитонина, вырабатывается главным образом в С-клетках щитовидной железы и нейроэндокринных клетках легких. Стимулирующее действие на выработку прокальцитонина оказывает липополисахарид бактериальной стенки. При тяжелой инфекции уровень прокальцитонина повышается достаточно быстро и сохраняется длительно, что делает его специфическим маркером сепсиса [1-3].

Нарастает очевидность для использования прокальцитонина как при назначении, так и при отмене антибиотикотерапии [4].

Цель исследования: оценить значимость прокальцитонинового теста в качестве специфического маркера генерализованной и локальной инфекции у пациентов с аллергодерматозами, а также определить его роль в оценке активности воспалительного процесса при различных аллергодерматозах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовали 74 больных в возрасте от 3 до 74 лет с аллергическими заболеваниями кожи, которые были разделены на группы: I группу составили 57 пациентов с диагнозом «атопический дерматит» (АД), II группу – 17 лиц с диагнозом «аллергический дерматит» (АлД), в контрольную группу (III) вошли 23 здоровых человека соответствующего возраста без кожных заболеваний.

По возрастной категории в I группе больных АД до 18 лет было 15 человек, от 19 до 28 лет – 13, от 29 до 39 лет – 10, от 40 до 50 лет – 7 и свыше 50 лет – 12. II группу с аллергодерматитами в основном составили пациенты в возрасте от 29 до 39 лет – 6 человек, от 40 до 50 лет – 8 и свыше 50 лет – 3; лиц в возрасте до 18 лет и от 18 до 28 лет не было.

Согласно рабочей классификации Гребенюка В.Н. и Маннанова А.М. (1987), были выявлены следующие клинические формы АД: эритематозно-сквамозная – у 11 больных, эритематозно-сквамозная с лихенификацией – у 14, экссудативная – у 7, пруригинозная и лихеноидная – у 13 и 12 соответственно.

Клинические формы аллергодерматита определяли с учетом степени сенсибилизации: моновалентная отмечена у 6 пациентов, поливалентная – у 11.

У всех больных проводили клинические (определение степени тяжести по индексу SCORAD, ДИШС), культуральные исследования степени тяжести колонизации (по методу Мавляновой Ш.З., Максудова М.Р., 2022 г.), иммуноферментный анализ (ИФА), изучение статистических данных. Уровень

прокальцитонина до и после лечения определяли у всех пациентов методом ИФА согласно грантовским исследованиям ФЗ-202010282.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам иммуноферментного анализа уровня прокальцитонина, наблюдали увеличение его концентрации у 34 из 74 пациентов по сравнению с показателями здоровых лиц, что составило 45,9% случаев. Уровень прокальцитонина в среднем составил $0,13 \pm 0,005$ нг/мл, тогда как в группе здоровых лиц – $0,1009 \pm 0,0003$ нг/мл. Уровень прокальцитонина в зависимости от клинической формы аллергических заболеваний кожи представлен в таблице 1.

Таблица 1

Сравнительная характеристика уровня прокальцитонина у больных с аллергическими заболеваниями кожи (М±м) нг/мл

Группа больных	I группа (больные АД), N=57	II группа (больные АлД), N=17	III (контрольная) группа, N=23
Прокальцитонин	$0,14 \pm 0,005^*$	$0,11 \pm 0,006^*$	$0,1009 \pm 0,0003$

Примечание: * показатель достоверности по отношению к здоровым лицам ($P > 0,05$).

Уровень прокальцитонина у больных АД в среднем составил $0,14 \pm 0,005$ нг/мл, т.е. в 1,4 раза превышал показатели здоровых лиц ($0,1009 \pm 0,0003$ нг/мл) и имел статистически недостоверный характер ($P > 0,05$), тогда как в группе больных с АлД он в среднем составил $0,11 \pm 0,006$ нг/мл, в 1,09 раз превышал показатели здоровых и также имел статистически недостоверный характер.

В связи с тем, что одним из факторов рецидивности аллергических заболеваний кожи являются условно-патогенные микроорганизмы, нам было интересно дать оценку состоянию микробиоты кожи у обследованных больных (табл. 2).

Таблица 2

Характер колонизации *Staphylococcus* spp. у обследованных больных (КОЕ/см²)

Группа	S. aureus	S. epidermidis	S. saprophyticus	S. haemolyticus
I группа (больные АД), N=57	$66,2 \pm 1,3$	$54,5 \pm 1,02^*$	$47,3 \pm 0,8$	$34,02 \pm 0,2$
II группа (больные АлД), N=17	$77,7 \pm 2,9^*$	$51,3 \pm 1,1^*$	$36,2 \pm 0,7$	$75,9 \pm 1,04$
III (контрольная) группа, N=23	$1,5 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,4$		

Примечание: * - показатель достоверности по отношению к показателям здоровых лиц ($P < 0,05$).

Как следует из таблицы, у обследованных больных на коже очагов поражения отмечается повы-

шенная колонизация стафилококками, что статистически достоверно отличается от показателей контрольной группы ($P < 0,05$).

В ходе корреляционного анализа полученных результатов по колонизации условно-патогенных микроорганизмов *Micrococcaceae* с уровнем прокальцитонина установлено, что патогенные виды *S. aureus* ($r = +0,8$), *S. saprophyticus* ($r = +0,5$), *S. haemolyticus* ($r = +0,6$) имели прямую высокую корреляцию ($P < 0,05$), условно-патогенная биота *S. epidermidis* имела заметную корреляцию ($r = +0,4$).

Полученные результаты свидетельствует о взаимозависимости степени колонизации условно-патогенными микроорганизмами с уровнем прокальцитонина. На наш взгляд, при повышенной колонизации условно-патогенной микробиотой продуцируемые бактериальной пленкой липополисахариды (токсины) способствуют увеличению экстрацеллюлярного синтеза прокальцитонина клетками печени, почек, легких, мышечной ткани, адипоцитами, макрофагами и моноцитами, что приводит к повышению его уровня в сыворотке крови.

Уровень прокальцитонина исследовали по давности заболевания, которая составила: в I группе у 11 больных – до 1 года, у 29 – с 1 до 5 лет, у 17 – свыше 5 лет; во II группе: у 5 – до 1 года, у 7 – от 1 до 5 лет и у 5 – свыше 5 лет (Рис. 1).

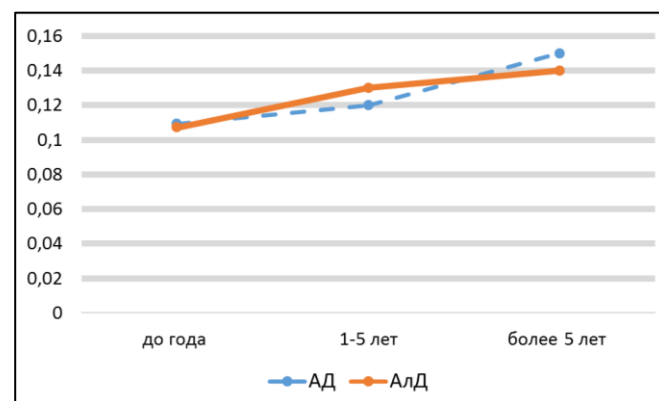


Рис. 1. Уровень прокальцитонина в I и II группах больных в зависимости от давности заболевания (нг/мл).

Как следует из рисунка 1, прокальцитонин у больных аллергическими заболеваниями кожи с давностью заболевания более 5 лет был увеличен в 2 раза по сравнению с пациентами с давностью до 1 года.

Полученные данные также были проанализированы с учетом степени тяжести SCORAD у больных аллергическими заболеваниями кожи (Рис. 2).

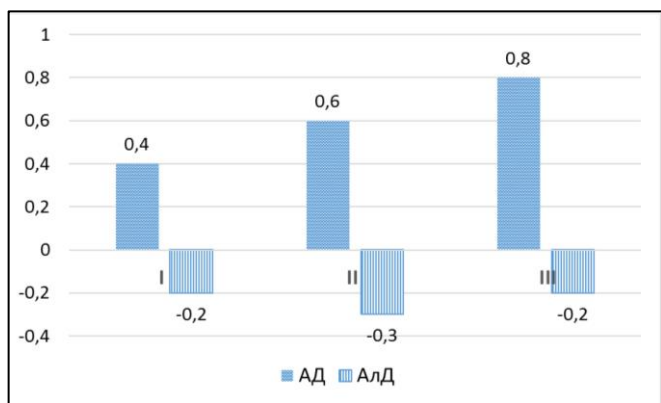


Рис. 2. Показатель корреляционной связи прокальцитонина со степенью тяжести аллергических заболеваний кожи по индексу SCORAD, ДИШС (r).

В I группе уровень прокальцитонина имел прямую корреляцию со степенью тяжести заболевания по индексу SCORAD: I степень тяжести ($r=+0,4$), II степень ($r=+0,6$), III степень ($r=+0,8$), $P<0,05$. Во II группе уровень прокальцитонина имел обратную корреляционную связь со средней степенью тяжести заболевания ($r=-0,3$), а в остальных случаях – такую же обратную, но не достоверную связь ($P>0,05$).

Такое явление, возможно, связано с тем, что заболеваемость АД имеет генетически детерминированный характер с иммунологической реактивностью организма. При этом большое значение придается барьерной функции кожи, где в первую очередь участвует основной белок – филаггрин, задействованный в дифференцировке клеток эпидермиса как основной компонент естественного увлажняющего фактора кожи. Высокому уровню обсемененности кожи микроорганизмами способствуют особенности структуры и функции эпидермального барьера при хронических дерматозах: увеличение трансэпидермальной потери воды, изменения функции кислотной мантии, нарушение десквамации и другие

факторы.

Таким образом, из полученных результатов следует, что уровень прокальцитонина отражает степень тяжести воспалительного процесса и может явиться прогностическим критерием прогноза заболевания. Повышение концентрации прокальцитонина с учетом микробиоты кожи и давности заболевания у больных аллергодерматозами свидетельствует о развитии хронической поверхностной инвазивной формы бактериальной инфекции на коже, что может явиться провоспалительным медиатором определения инфекционного процесса.

ВЫВОДЫ

1. Результаты исследования методом ИФА уровня прокальцитонина у обследованных больных показали увеличение его концентрации у 34 из 74 больных аллергодерматозами по сравнению с показателями здоровых лиц, что составило 45,9% случаев. Уровень прокальцитонина в среднем составил $0,13 \pm 0,005$ нг/мл и имел недостоверный характер.

2. У пациентов с аллергическими заболеваниями кожи отмечали недостоверное повышение уровня прокальцитонина в сыворотке крови, однако выявили прямую корреляционную связь с условно-патогенными микроорганизмами: *S. aureus* ($r=+0,8$), *S. saprophyticus* ($r=+0,5$), *S. haemolyticus* ($r=+0,6$) имели прямую высокую корреляцию ($P<0,05$), *S. epidermidis* – заметную корреляцию ($r=+0,4$).

3. Повышение концентрации прокальцитонина с учетом микробиоты кожи и давности заболевания у больных аллергодерматозами свидетельствует о развитии хронической поверхностной инвазивной формы бактериальной инфекции на коже, что может явиться провоспалительным медиатором определения инфекционного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцев А.А., Овчинников Ю.В., Кондратьева Т.В. Биологические маркеры воспаления при внебольничной пневмонии. Consilium Medicum. 2014; 11: 36-41. [Zaitsev A.A., Ovchinnikov Yu.V., Kondratieva T.V. Biological markers of inflammation in community-acquired pneumonia. Consilium Medicum. 2014; 11: 36-41 (In Russ)].
2. Briel M., Schuetz P., Mueller B., et al. Procalcitonin-guided antibiotic use vs a standard approach for acute respiratory tract infections in primary care. Arch. Intern. Med. 2008; 168 (18): 2000-2007. doi:10.1001/archinte.168.18.2000
3. Meynaar I.A., Droog W., Batstra M., et al. In critically ill patients, serum procalcitonin is more useful in differentiating between sepsis and SIRS than CRP, IL-6, or LBP. Crit. Care Res. Pract. 2011; 2011: 594645. doi: 10.1155/2011/594645
4. Schuetz P., Christ-Crain M., Müller B. Procalcitonin and other biomarkers to improve assessment and antibiotic stewardship in infections: hope for hype? Swiss Med. Wkly. 2009; 139 (23-24): 318-26. PMID: 19529989

Поступила в редакцию журнала 25.08.2022

Рецензент: А.В. Соболев

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* LINK. В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР *IN VITRO*

¹Мухаммадиев Рин.С. (н.с.)*, ¹Бирюля В.В. (в.н.с.), ¹Мухаммадиев Риш.С. (н.с.), ²Тимербулатова Л.М. (аспирант), ¹Скворцов Е.В. (в.н.с., зав. сектором)

¹Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Представлены данные по исследованию цитотоксических свойств экстрактов микроскопических грибов рода *Fusarium* в отношении клеточных линий рака молочной железы (MCF-7), рака простаты (PC-3), рака шейки матки (Hela), почек эмбриона (HEK-293) и фибробластов кожи человека (HSF). Методами МТТ-теста и окрашивания трипановым синим с применением культур клеток изучена прямая цитотоксическая активность экстрактов из мицелия микромицетов *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. redolens*, *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. solani*, *F. moniliforme* *F. equiseti*. Установлено, что экстракты мицелия микромицетов обладают различной степенью цитотоксической активности на культуры клеток. Наиболее высокой цитотоксической активностью в отношении исследуемых культур клеток обладал экстракт штамма *F. sporotrichioides* (IC_{50} 4,7-6,5 мкг/мл). Данная концентрация экстракта была в 1,1-1,5 раза ниже величины IC_{50} экстракта, который оказывал действие на нормальные клетки. Полученные результаты позволили выявить штамм гриба *F. sporotrichioides*, который способен стать биопродукентом для выделения биологически активных веществ с цитотоксическим действием для их дальнейшего изучения в качестве средств лекарственного назначения.

Ключевые слова: микромицеты, *Fusarium*, экстракт, культура клеток, цитотоксическая активность

* Контактное лицо: Мухаммадиев Ринат Салаватович, e-mail: tanirtashir@mail.ru

CYTOTOXIC ACTIVITY OF EXTRACTS FROM *FUSARIUM* LINK. FUNGI AGAINST HUMAN CELLS LINES *IN VITRO*

¹Muhammadiev Rin.S. (scientific researcher), ¹Biryulya V.V. (leading scientific researcher), ¹Muhammadiev Rish.S. (scientific researcher), ²Timerbulatova L.M. (postgraduate student), ¹Skvortsov E.V. (leading scientific researcher, head of the sector)

¹Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety; ²Kazan Federal University, Kazan, Russia

Data on the study of the cytotoxic properties of extracts of fungi of the genus *Fusarium* against human breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3), cervical cancer (Hela), embryonic kidney (HEK-293) and skin fibroblast (HSF) cell lines are presented. Based on the MTT assay and the trypan blue staining cytotoxic effect of extracts of fungi *F. sporotrichioides*, *F. redolens*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. graminearum* was determined. All extracts showed varying degree of cytotoxic effect against human cells lines. Isolate of *F. sporotrichioides* showed strong cytotoxic activity (IC_{50} 4,7-6,5 μ g/ml). This extract concentration was 1.1-1.5 times lower than IC_{50} of the extract, which had an effect on normal cells. The obtained results made it possible to detect a strain of the fungus *F. sporotrichioides*, capable of becoming a bioproducer for the isolation of biologically active substances with a cytotoxic effect for the purpose of their further study as a medical agent.

Key word: micromycetes, *Fusarium*, extract, cell culture, cytotoxic activity

ВВЕДЕНИЕ

Среди большого количества исследуемых биологических объектов в последнее время микромицеты вызывают немалый интерес исследователей. В первую очередь это связано с тем, что большинство микромицетов способно к синтезу различных биологически активных веществ [1]. Описаны свойства более чем тысячи метаболитов микроскопических грибов, таких как аминокислоты, фитогормоны, витамины, гидролитические ферменты, антибиотики и токсины, широко применяющиеся в различных отраслях промышленности [1, 2]. Показаны противовирусные, антибактериальные, противогрибковые, антиоксидантные, иммуномодулирующие, противо-

малярийные и многие другие свойства экстрактов микромицетов [1, 3-5]. Микроскопические грибы обладают значительным видовым потенциалом и способностью к активному росту и размножению [1]. Их потенциал огромен, постоянно обнаруживаются новые вещества с уникальными биологическими и терапевтическими свойствами.

В настоящее время особое внимание исследователи уделяют способности микромицетов к биосинтезу биологически активных соединений, обладающих цитотоксической активностью в отношении различных опухолевых клеток [4, 5]. В литературных источниках о противоопухолевых свойствах веществ микромицетов показано выраженное токсическое действие экстрактов и отдельных полученных их соединений в отношении культур раковых клеток [2, 4, 5]. Ряд веществ микромицетов, полученных в чистом виде, проходят клинические испытания как противоопухолевые средства [3]. Однако клинические исследования некоторых препаратов были остановлены из-за их высокой токсичности или отсутствия эффективности. В связи с этим актуальным становится поиск новых веществ грибкового происхождения, которые могут найти применение в качестве потенциальных противоопухолевых агентов.

Цель исследования: оценить способность различных видов грибов рода *Fusarium* к синтезу веществ с цитотоксической активностью в их мицелиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись микроскопические грибы рода *Fusarium*, находящиеся в музеях культур микроорганизмов лаборатории пробиотических препаратов и ферментов отдела биотехнологии Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности (ФГБНУ ФЦТРБ-ВНИВИ) и кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Казанского (Приволжского) федерального университета (ФГАОУ ВО КФУ). Клеточные линии были предоставлены из коллекции клеточных культур Научно-образовательного центра фармацевтики К(П)ФУ. Мицелий изучаемых микромицетов получали культивированием штаммов на жидкой картофельно-глюкозной питательной среде, содержащей (г/л) картофель – 200,0, глюкозу – 20,0, с перемешиванием, при температуре 28 °С. Отбор проб мицелия микромицетов проводили на 8-ые сутки выращивания изолятов.

Грибной материал предварительно фильтровали через стерильную нейлоновую ткань, затем тщательно промывали стерильной дистиллированной водой и 20 mM Tris-HCl буфером (pH 7,2). Гомогенизацию биомассы мицелия осуществляли механическим измельчением его в 20 mM Tris-HCl буфере (pH 7,2) в соотношении 1:1. Для более полного из-

влечения веществ однородную массу оставляли при перемешивании в течение 6-7 часов при температуре 4 °С, осадок отделяли центрифугированием (3000 g, 4 °С, 15 минут). Супернатант анализировали на наличие белка методом спектрофотометрии и веществ, обладающих цитотоксической активностью.

Культивирование линий клеток, оценку цитотоксичности экстрактов штаммов микромицетов методами МТТ-теста и окрашивания трипановым синим проводили, как описано ранее [6, 7].

Влияние экстрактов микромицетов на клетки устанавливали через 72 часа совместной инкубации. Концентрация общего белка экстрактов в реакционных смесях составляла 2,4-10000 мкг/мл при использовании МТТ-теста и 10000 мкг/мл – метода окрашивания трипановым синим.

Цитотоксическое действие экстрактов на клеточные линии в условиях *in vitro* выражали через IC_{50} , наименьшая концентрация общего белка экстракта (мкг/мл), которая вызывает 50% ингибирование роста клеток. Контролем являлись клетки, инкубированные без добавления исследуемого экстракта.

Изучение морфологии культур клеток осуществляли после совместной инкубации тест-культуры и экстракта с использованием оптического микроскопа Zeiss Axio Vert.A1 («Carl Zeiss Microscopy GmbH», Германия).

Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики, используя программное обеспечение Microsoft Office Excel 2013. Статистическую достоверность разницы между группами определяли по t-критерию Стьюдента для независимых переменных. Достоверными считали различия показателей в сравниваемых группах при 95 % доверительной вероятности ($p \leq 0,05$). Значения IC_{50} определяли на основе дозозависимых кривых с применением программы Origin™.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки цитотоксической активности экстрактов из микромицетов использовали 5 клеточных линий: РС-3 (аденокарцинома простаты человека), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), Hela (аденокарцинома шейки матки), HSF (фибробласты кожи человека), НЕК-293 (почки эмбриона человека).

В таблице 1 представлены данные определения цитотоксической активности экстрактов из мицелия различных штаммов грибов рода *Fusarium*, полученные методом окрашивания трипановым синим, на культуры клеток. Тест предполагал выявление наличия или отсутствия культур-специфичного влияния экстрактов микромицетов.

Таблица 1

Цитотоксическая активность экстрактов грибов рода *Fusarium* к тест-культурам

Экстракты	PC-3	MCF-7	Hela	HSF	HEK-293
<i>F. sporotrichioides</i>	+	+	+	+	+
<i>F. sporotrichioides 1</i>	+	+	+	+	+
<i>F. sporotrichioides 2</i>	+	+	+	-	+
<i>F. sporotrichioides 3</i>	-	+	+	-	+
<i>F. redolens</i>	+	+	+	+	+
<i>F. redolens 1</i>	+	+	+	+	+
<i>F. redolens 2</i>	+	+	+	+	+
<i>F. redolens 3</i>	+	+	+	+	+
<i>F. redolens 4</i>	+	+	+	+	+
<i>F. solani</i>	+	+	+	+	+
<i>F. solani 1</i>	+	+	+	+	+
<i>F. solani 2</i>	+	+	+	+	+
<i>F. solani 3</i>	+	+	+	+	+
<i>F. solani 4</i>	+	+	+	+	+
<i>F. solani 5</i>	-	-	-	-	-
<i>F. solani 6</i>	+	+	+	+	+
<i>F. equiseti</i>	+	+	+	+	+
<i>F. equiseti 1</i>	+	+	+	+	+
<i>F. equiseti 2</i>	+	+	+	+	+
<i>F. oxysporum</i>	+	+	+	+	+
<i>F. oxysporum 1</i>	-	-	-	-	-
<i>F. oxysporum 2</i>	+	+	+	+	+
<i>F. culmorum</i>	-	+	-	-	-
<i>F. culmorum 1</i>	+	+	+	+	+
<i>F. moniliforme</i>	-	-	-	-	-
<i>F. graminearum</i>	+	+	+	+	+

Примечание: + - экстракт обладает токсичностью; - - экстракт не обладает токсичностью.

Проведение скрининга экстрактов грибов рода *Fusarium* на цитотоксическую активность методом окрашивания трипановым синим показало, что большинство штаммов были способны синтезировать вещества, обладающие цитотоксическим действием. Из 26 микроскопических грибов экстракты 2 штаммов не обладали токсическим эффектом на все изучаемые клеточные линии. Экстракты *F. sporotrichioides 2*, *F. sporotrichioides 3*, *F. culmorum* и *F. moniliforme* обладали избирательной токсичностью.

При оценке значений полуингибирующих концентраций экстрактов грибов методом МТТ-теста выявили, что наибольшей активностью обладал экстракт гриба *F. sporotrichioides*, для которого значения IC_{50} в отношении изучаемых культур клеток соответствовали концентрациям 4,8-6,1 мкг/мл (табл. 2).

Таблица 2

Показатели IC_{50} экстрактов наиболее активных штаммов грибов рода *Fusarium* к тест-культурам

Экстракты, IC_{50} , мкг/мл	PC-3	MCF-7	Hela	HSF	HEK-293
<i>F. sporotrichioides</i>	5,8±0,27*	4,7±0,25*	6,5±0,29	7,1±0,31	6,4±0,28
<i>F. sporotrichioides 1</i>	577,1±22,8	542,4±24,2	590,3±27,4	602,6±25,5	568,0±28,9
<i>F. redolens 4</i>	132,4±5,8	135,7±6,1	128,2±6,2	140,7±5,4	137,2±5,3
<i>F. solani</i>	161,9±6,8	153,9±7,4	185,2±9,1	181,3±8,6	174,7±8,5
<i>F. solani 1</i>	203,8±9,8	208,4±8,6	195,1±7,7	205,6±9,1	189,9±7,2
<i>F. solani 6</i>	65,1±2,3	58,4±2,3	59,2±2,7	63,0±2,6	58,7±2,1
<i>F. equiseti 2</i>	200,6±8,7	221,3±9,2	219,4±8,8	197,6±8,1	189,1±7,9
<i>F. oxysporum 2</i>	365,7±15,3	382,5±16,9	354,7±14,6	396,4±14,2	372,9±16,7
<i>F. culmorum 1</i>	643,2±29,9	591,2±26,0	583,4±24,9	634,5±22,7	637,8±28,2

Примечание: * - отличия статистические значимые по сравнению со значением показателя IC_{50} экстрактов в отношении линии нормальных клеток HSF и HEK-293 ($p < 0,05$).

При этом наибольшую чувствительность к экстракту *F. sporotrichioides* проявляла клеточная культура MCF-7 (рак молочной железы), для которой значение IC_{50} соответствовало концентрации 4,7±0,25 мкг/мл. Данная концентрация экстракта была в 1,5-1,4 раза ниже величины IC_{50} экстракта, который оказывал действие на нормальные клетки. Величина IC_{50} для нормальных клеток HEK-293 и HSF составила 6,4±0,28 и 7,1±0,31 мкг/мл соответственно. На ниже представленных микрофотографиях отчетливо наблюдается действие экстракта *F. sporotrichioides* на линию культур клеток рака молочной железы MCF-7 и нормальных клеток почек эмбриона (HEK-293) человека (Рис. 1, 2).

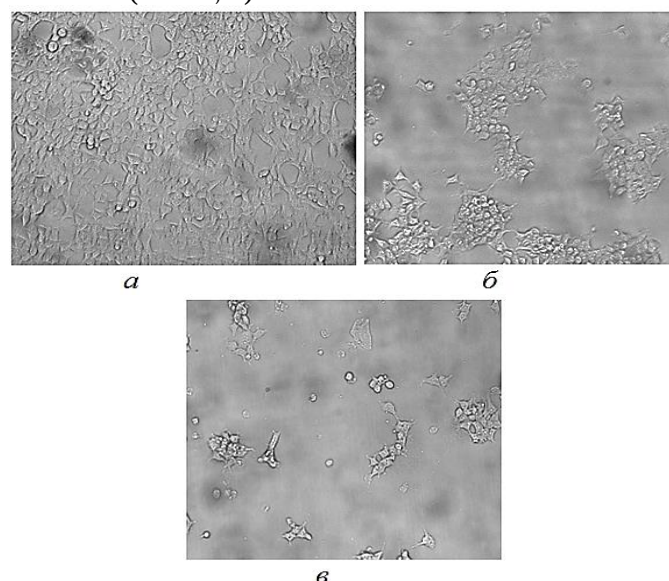


Рис. 1. Действие экстракта *F. sporotrichioides* на линию клеток рака молочной железы MCF-7: а) MCF-7 (контроль); б) MCF-7 + экстракт (4,9 мкг/мл); в) MCF-7 + экстракт (19,5 мкг/мл). Ув. ×1000.

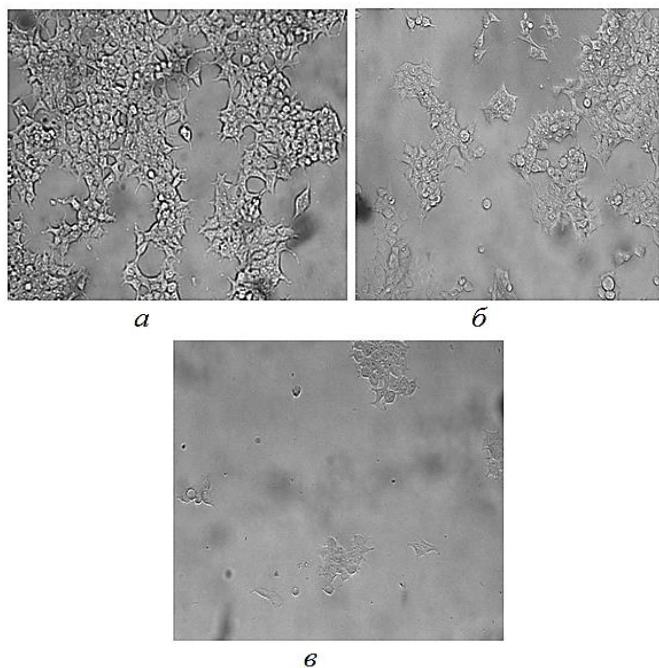


Рис. 2. Действие экстракта *F. sporotrichioides* на линию клеток почек эмбриона HEK-293: а) HEK-293 (контроль); б) HEK-293 + экстракт (4,9 мкг/мл); в) HEK-293 + экстракт (19,5 мкг/мл). Ув. ×1000

Ранее полученные нами данные и результаты проведенных исследований зарубежных авторов указывают на то, что экстракт *F. sporotrichioides* содержит вещества трихотеценовой природы, большинство из которых обладает способностью подавлять пролиферацию различных типов клеток рака и вызывать их апоптоз [6-8].

Остальные экстракты микромицетов имели более низкую степень цитотоксической активности по сравнению с экстрактом *F. sporotrichioides*. Среди них следует отметить экстракт *F. moniliforme*, не обладающий активностью в отношении всех изучаемых клеточных линий ($IC_{50} > 1500$ мкг/мл). Продукты синтеза данного вида гриба широко применяют в сельском хозяйстве [9, 10].

Полученные результаты согласуются с данными ряда зарубежных исследователей, где установлено, что экстракты грибов рода *Fusarium* проявляют цитотоксический эффект в отношении различных линий клеток [11, 12]. Так, в работе Tenguria R.K. с соавторами по изучению противоопухолевого действия экстракта микромицетов *Fusarium oxysporum* на культурах клеток MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), A549 (аденокарцинома легкого человека) методом МТТ-теста показано, что зна-

чения IC_{50} изучаемого экстракта составляют 31,5-55,3 мкг/мл [11].

В соответствии с данными Национального института онкологии США (National Cancer Institute, NCI) и Национального института здравоохранения США (National Institutes of Health, NIH) сырой экстракт считается активным, если значение IC_{50} соответствует ≤ 30 мкг/мл после совместного культивирования экстракта с исследуемой клеточной линией в течение 48-72 часов [13]. Данному критерию удовлетворяет экстракт одного изолята микроскопического гриба, а именно штамма *F. sporotrichioides*, в отношении всех исследуемых клеточных линий (IC_{50} 4,7-6,5 мкг/мл). Поэтому дальнейший интерес представляет получение индивидуальных веществ цитотоксического действия из экстракта *F. sporotrichioides*, сравнительное изучение полученных соединений цитотоксического эффекта на паре клеточных линий разных типов (опухолевого и нормального) одного генеза, а также их механизма действия.

ВЫВОДЫ

Поиск различных видов грибов рода *Fusarium* к биосинтезу соединений с противоопухолевым свойством методами МТТ-теста и окрашивания трипановым синим показал, что большинство микромицетов способны к синтезу веществ такого рода. Из 8 изученных видов грибов рода *Fusarium* можно выделить один штамм, а именно *F. sporotrichioides*, способный синтезировать в своих мицелиях вещества с высокой степенью цитотоксической активности в отношении линии клеток рака простаты (РС-3), молочной железы (MCF-7), шейки матки (Hela), нормальных клеток почек эмбриона (HEK-293) и фибробластов кожи человека (HSF). Методами МТТ-теста и окрашивания трипановым синим была выявлена менее выраженная цитотоксическая активность экстракта по отношению к нормальным клеткам человека HSF, HEK-293 по сравнению к раковым клеткам РС-3, MCF-7, Hela, что подтверждено результатами, полученными с использованием метода световой микроскопии.

Установлено, что экстракты микроскопических грибов рода *Fusarium* способны стать источником новых противоопухолевых соединений с целью их дальнейшего изучения и потенциального применения как средств медицинского назначения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Далинова А.А., Салимова Д.Р., Берестецкий А.О. Грибы рода *Alternaria* как продуценты биологически активных соединений и биогербицидов. Прикладная биохимия и микробиология. 2020; 56 (3): 223-241. [Dolinova A.A., Salimova D.R., Berestetsky A.O. Fungi of the genus *Alternaria* as producers of biologically active compounds and bioherbicides. Applied biochemistry and microbiology. 2020; 56 (3): 223-241. (In Russ)]. doi: 10.31857/S0555109920030022
2. Серба Е.М., Мочалина П.Ю., Римарева Л.В. и др. Исследование ионного состава биомассы *Aspergillus oryzae* – продуцента гидролитических ферментов. Микология и фитопатология. 2019; 53 (2): 95-100. [Serba E.M., Mochalina P.Yu., Rimareva L.V., et al. Investigation of the ionic composition of biomass of *Aspergillus oryzae* – producer of hydrolytic enzymes. Mycology and phytopathology. 2019; 53 (2): 95-100. (In Russ)]. doi: 10.1134/S0026364819020090
3. Kornienko A., Evidente A., Vurro M. Towards a cancer drug of fungal origin. Med. Res. Rev. 2015; 35 (5): 937-967. doi: 10.1002/med.21348
4. Bladt T.T., Frisvad J.C., Knudsen P.B., Larsen T.O. Anticancer and antifungal compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other filamentous fungi. Molecules. 2013; 18 (9): 11338-11376. doi: 10.3390/molecules180911338
5. Leylaie S., Zafari D. Antiproliferative and antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of endophytic *Trichoderma* species from Vinca plants. Frontiers in Microbiology. 2018; 9: 1484-1500. doi: 10.3389/fmicb.2018.01484
6. Мухаммадиев Рин.С., Мухаммадиев Рииш.С., Бирюля В.В. и др. Оценка цитотоксичности трихотецена *Fusarium sp.* на линию рака молочной железы *in vitro*. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (6): 90-95. [Mukhammadiev Rin.S., Mukhammadiev Rish.S., Biryulya V.V., et al.. Evaluation of cytotoxicity of trichothecene *Fusarium sp.* on the *in vitro* breast cancer line. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (6): 90-95 (In Russ)]. doi.org/10.21294/1814-4861-2019-18-6-90-95
7. Мухаммадиев Р.С., Мухаммадиев Р.С., Бирюля В.В. и др. Изучение избирательной чувствительности культур клеток *in vitro* к действию Т-2 токсина. Ветеринарный врач. 2018; 5: 24-27. [Mukhammadiev R.S., Mukhammadiev R.S., Biryulya V.V., et al. Study of the selective sensitivity of cell cultures *in vitro* to the action of T-2 toxin. Veterinari-an. 2018; 5: 24-27. (In Russ)].
8. Yuan Dong, Guixian Meng, Jian Guo, et al. Preparation of T-2 toxin containing pH-sensitive liposome and its anti-tumor activity. Molecular Medicine Report. 2020; 22 (5): 4423-4431. doi.org/10.3892/mmr.2020.11531
9. Чуксеев А.А., Якименко И.М., Благородова Е.Н., Барчукова А.Я. Использование регуляторов роста на культуре картофеля. Сб. Вестник научно-технического творчества молодежи Кубанского ГАУ. К., 2017; IV: 265- 269. [Chukseev A.A., Yakimenko I.M., Nobelova E.N., Barsukova A.Ya. The use of growth regulators on potato culture. Sb. Bulletin of Scientific and Technical creativity of the youth of the Kuban State University. K., 2017; IV: 265- 269. (In Russ)].
10. de Oliveira J., Rodrigues C., Vandenberghe L.P., et al. Gibberellic acid production by different fermentation systems using citric pulp as substrate/support. BioMed Research International. 2017; (3): 1-8. doi:10.1155/2017/5191046
11. Tenguria R.K., Firodiya A.D. Cytotoxic activities of endophytic fungi isolated from central region of Madhya Pradesh. Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences. 2016; 3: 29-38.
12. Abbas H.K., Yoshizawa T., Shier W.T. Cytotoxicity and phytotoxicity of trichothecene mycotoxins produced by *Fusarium spp.* Toxicon. 2013; 74: 68-75. doi: 10.1016/j.toxicon
13. Mitrović T., Stamenković S., Cvetković V. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. Int. J. Mol. Sci. 2011; 12 (8): 5428-48. doi: 10.3390/ijms12085428

Поступила в редакцию журнала 08.09.2022

Рецензент: И.А. Рябинин



АНАЛИЗ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ *CANDIDA ALBICANS*, *C. AURIS*, *C. GLABRATA* И *C. KRUSEI*

Александрова Н.А. (старший преподаватель), Заславская М.И. (профессор кафедры), Ипатова А.О. (магистр кафедры), Махрова Т.В. (доцент), Игнатова Н.И. (доцент)*

Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

Штаммы Candida albicans и C. auris обладают более выраженной способностью образовать биопленки по сравнению с C. glabrata и C. krusei. Установлена прямая корреляционная зависимость между интенсивностью гифообразования и формированием биопленок у C. albicans. Способность к образованию биопленок у C. auris, C. glabrata и C. krusei не зависит от возможности и интенсивности формирования ими гифальных элементов и, вероятно, связана с другими адгезивными факторами и составом межклеточного матрикса.

Ключевые слова: *C. auris*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, биопленки, гифы

BIOFILM FORMATION ANALYSIS OF *CANDIDA ALBICANS*, *C. AURIS*, *C. GLABRATA* AND *C. KRUSEI*

Alexandrova N.A. (senior lecturer), Zaslavskaya M.I. (professor of the department), Ipatova A.O. (master of the department), Makhrova T.V. (associate professor), Ignatova N.I. (associate professor)

Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

Candida albicans and C. auris strains have stronger biofilm formation in comparison with C. glabrata and C. krusei. A direct correlation was established between the hyphae formation intensity and C. albicans biofilm formation. Capacity to biofilm production of C. auris, C. glabrata and C. krusei does not depend on the possibility and intensity of hyphae formation and probably depends on other adhesive factors and the intercellular matrix components.

Key words: *C. auris*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, biofilms, hyphae

ВВЕДЕНИЕ

Candida spp. являются основной причиной нозокомиальных грибковых инфекций, что часто приводит к тяжелым последствиям, в том числе летальным исходам [1]. Например, инвазивный кандидоз приводит к высокому уровню (до 47%) смертности, что является одним из самых высоких показателей среди внутрибольничных патогенов. Наряду с *Candida albicans* – наиболее распространенным видом *Candida*, все чаще регистрируют заболевания, вызванные патогеном *C. auris* [2]. Этот новый вид *Candida* может обнаруживаться у больных, находящихся в палатах интенсивной терапии, и вызывать катетер-ассоциированные инвазивные микозы [3].

Вместе с тем, патогенный потенциал *C. auris* недостаточно изучен по сравнению с «традиционными» возбудителями кандидоза: *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. krusei*.

Одной из характеристик патогенности микроорганизмов является их способность к биопленкообразованию (биопленочная активность). Биопленкообразование у микроорганизмов связано как с гифальной активностью, так и с составом межклеточного матрикса [4].

Цель работы: провести сравнение способности разных видов *Candida*, включая *C. auris*, к формированию биопленок, а также изучение влияния гифообразования на этот процесс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штаммы из коллекции кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России: *Candida albicans* (127, 195, 258, 290, 601, 825D, M9620, 27/23), *Candida auris* (70, 78, 84, 95), *Candida glabrata* (44-1, 294, 584), *Candida krusei* (489, 583, 780). Все культуры были предварительно идентифицированы с помощью метода масс-спектрометрии. Микромицеты культивировали на декстрозном агаре Сабуро (HiMedia, India) (24 ч, 37 °С), смывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР, pH 7,2-7,4) и получали стандартизованную клеточную суспензию грибов с показателем мутности 0,5 по McFarland (DensiLaMeter II, ERBA Lachema, Чехия).

Для получения биопленок *Candida* spp. в лунки 12-луночных планшетов (Costar, США) вносили по 0,5 мл взвеси микромицетов (0,5 по McFarland). Затем добавляли по 2 мл питательной среды DMEM (ФГУП им. М.П. Чумакова РАМН, Московская обл.). Посевы инкубировали 48 часов при 37 °С. Зрелую биопленку трехкратно отмывали раствором Хенкса и высушивали при комнатной температуре. Определение биопленкообразующей способности

* Контактное лицо: Игнатова Надежда Ивановна, e-mail: n.i.evteeva@gmail.com

выполняли стандартным методом на основе оценки поглощения красителя (1%-ным раствором кристаллического фиолетового) микробной массой при помощи спектрофотометрических приборов (КФК-2-УХЛ 4.2, Россия). Результат выражали в относительных световых единицах (отн. свет. ед.) [5].

Гифальную форму грибов получали по собственной оригинальной методике. Для получения мицелиальной формы в микропробирки Eppendorf® 2ml (safe lock tubes, USA) вносили по 50 мкл клеточной суспензии микромицетов (0,5 по McFarland) и приливали среду DMEM. Посевы культивировали в течение 48 ч. при 37 °С, после чего определяли объем образовавшегося мицелия грибов в микропробирках. Все эксперименты проводили в 3-х повторях.

Статистическую обработку осуществляли с помощью компьютерной программы Statistica 10.0. Межгрупповые различия анализировали с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. Взаимосвязь параметров оценивали методом корреляционного анализа по Спирмену. Силу корреляционной связи определяли по значению коэффициента корреляции: ниже 0,3 считали слабой, от 0,3 до 0,7 – средней и от 0,7 до 1,0 – сильной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе изучения биопленочной активности *Candida* spp. было показано, что наиболее выраженной способностью образовывать биопленки обладали штаммы *C. albicans* и *C. auris* (табл.). При этом биопленочная активность *C. albicans* была в среднем в 1,5 раза выше, чем у *C. auris* ($p > 0,05$), и в 16,6 раз выше, чем у штаммов *C. glabrata* и *C. krusei* ($p < 0,05$).

Таблица

Биопленочная и гифальная активность *Candida*

Штамм	Показатель интенсивности биопленкообразования (D, отн. свет. ед.)	Показатель гифальной активности (мкл ³)
<i>C. albicans</i> 825D	0,042±0,002	263,33±31,80
<i>C. albicans</i> M9620	0,018±0,002	58,33±8,33
<i>C. albicans</i> 27/23	0,027±0,002	166,67±33,33
<i>C. albicans</i> 127	0,020±0,003	91,67±8,33
<i>C. albicans</i> 195	0,083±0,007	116,67±44,10
<i>C. albicans</i> 258	0,445±0,074	433,33±33,33
<i>C. albicans</i> 290	0,187±0,055	266,67±88,19
<i>C. albicans</i> 601	0,239±0,036	400,00±57,74
<i>C. auris</i> 70	0,096±0,018	0
<i>C. auris</i> 78	0,124±0,037	0
<i>C. auris</i> 84	0,080±0,015	0
<i>C. auris</i> 95	0,062±0,021	0
<i>C. glabrata</i> 44-1	0,007±0,001	0
<i>C. glabrata</i> 294	0,009±0,001	0
<i>C. glabrata</i> 584	0,008±0,001	0
<i>C. krusei</i> 489	0,009±0,001	0
<i>C. krusei</i> 583	0,007±0,001	16,67±1,67
<i>C. krusei</i> 780	0,009±0,001	16,67±1,67

Мы предположили, что степень биопленочной активности может быть связана с гифальной активностью микромицетов. При анализе корреляции гифо- и биопленкообразования у *C. albicans* и *C. krusei* – видов, обладающих выраженной способностью формировать мицелиальную форму, была выявлена прямая сильная зависимость ($r=0,907$; $p < 0,05$) между гифальной и биопленочной активностью для *C. albicans*. Таким образом, чем больше были скорость и объем гифообразования у штамма *C. albicans*, тем выше была его способность формировать биопленку. В то же время интенсивность формирования гиф у штаммов *C. krusei* не влияла на их способность образовывать биопленку. Это показывает, что гифы не являются обязательным атрибутом для формирования биопленок у *Candida*, поскольку биопленочная активность может быть связана с различными факторами адгезии [6]. Данное положение подтверждается также экспериментами с кандидами, не образующими гифы, – *C. glabrata* и *C. auris* (табл.). При этом штаммы *C. auris* в среднем имели интенсивность биопленкообразования, сравнимую со штаммами *C. albicans* (гифообразующие): $0,091 \pm 0,023$ и $0,132 \pm 0,023$ соответственно ($p > 0,05$).

Таким образом, формирование *Candida* биопленок является многофакторным процессом, на который влияет адгезивность поверхности клеток микромицетов, а также синтез и состав межклеточного матрикса. Согласно полученным результатам, у всех штаммов *C. albicans* (обладает высокой гифообразующей активностью) формирование мицелиальной формы способствовало биопленкообразованию. Известно, что гифальная форма *Candida* обладает большей гидрофобностью, чем дрожжевая [7], что помогает микромицетам адгезироваться на пластиковых поверхностях, включая катетеры [3]. При этом рост мицелия может послужить каркасом для дальнейшего формирования биопленки. В случае, если кандиды не способны образовывать гифальную форму, механизмами, поддерживающими образование биопленки, могут служить адгезины дрожжевой формы и межклеточный матрикс.

ВЫВОДЫ

1. *C. albicans* и *C. auris* имеют более выраженную способность к биопленкообразованию, чем *C. glabrata* и *C. krusei*.

2. Скорость и объем гифообразования у *C. albicans* положительно коррелирует с интенсивностью биопленкообразования.

3. Способность к биопленкообразованию у *C. auris*, *C. glabrata* и *C. krusei* не зависит от возможности и интенсивности формирования гифальных элементов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nett J.E., Andes D.R. Contributions of the biofilm matrix to *Candida* pathogenesis. *Journal of Fungi*. 2020; 6 (1): 21. doi.org/10.3390/jof6010021
2. Sardi J. de C.O., Silva D.R., Mendes-Giannini M. J. S., Rosalen P.L. *Candida auris*: Epidemiology, risk factors, virulence, resistance, and therapeutic options. *Microb. Pathog.* 2018; 125: 116-121. doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.014
3. Du H.J., Hu T., Ennis C.L., et al. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS pathogens*. 2020. doi.org/10.1371/journal.ppat.1008921
4. Kurakado S., Arai R., Sugita T. Association of the hypha-related protein pra1 and zinc transporter zrt1 with biofilm formation by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiol. Immunol.* 2018; 62 (6): 405-410. doi.org/10.1111/1348-0421.12596
5. Лисовская С.А., Халдеева Е.В., Глушко Н.И., Паршаков В.Р. Оценка способности к формированию биопленок клиническими штаммами *Candida albicans*, выделенными при острых и хронических формах кандидоза кожи и слизистых оболочек. *Проблемы медицинской микологии*. 2017; 19 (1): 31-33. [Lisovskaya S.A., Khaldeeva E.V., Glushko N.I., Parshakov V.R. Evaluation of biofilm formation ability of clinical strains of *Candida albicans* isolated at the acute and chronic forms of candidosis of the skin and mucous membranes. *Problems in Medical Mycology*. 2017; 19 (1): 31-33 (In Russ)].
6. Ahmad S., Alfouzan W. *Candida auris*: Epidemiology, diagnosis, pathogenesis, antifungal susceptibility, and infection control measures to combat the spread of infections in healthcare facilities. *Microorganisms*. 2021; 9 (4): 807. doi.org/10.3390/microorganisms9040807
7. Shiradhane A.B., Ingle S.S., Zore A.G.B. Microenvironment responsive modulations in the fatty acid content, cell surface hydrophobicity, and adhesion of *Candida albicans* cells. *J. Fungi (Basel)*. 2018; 4 (2): 47. doi.org/10.3390/jof4020047

Поступила в редакцию журнала 01.06.2022

Рецензент: Т.С. Богомолова



ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА И ВЫРАЖЕННОСТИ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИТОВ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* M-17

Игнатова Н.И. (доцент)*, Заславская М.И. (профессор кафедры), Ипатова А.О. (магистр кафедры), Лукова О.А. (старший преподаватель)

Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

Проведено исследование антагонистических свойств метаболитов пробиотического штамма *Escherichia coli* M-17 в отношении *Candida auris*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Для исследования микробицидного эффекта и ингибирования роста микроорганизмов метаболитами *E. coli* использовали метод совместного отсроченного культивирования. Метаболиты *E. coli* M-17 подавляли рост всех исследуемых видов: *C. auris*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Однако выраженный биоцидный эффект отмечен только в отношении штаммов *C. auris* и *S. aureus*.

Ключевые слова: *E. coli*, метаболиты, микробный антагонизм, биоцидность

THE STUDY OF SPECTRUM AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY INTENSITY OF THE PROBIOTIC STRAIN *ESCHERICHIA COLI* M-17 METABOLITES

Ignatova N.I. (associate professor), Zaslavskaya M.I. (professor of the department), Ipatova A.O. (master of the department), Lukova O.A. (senior lecturer)

Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

Antagonistic properties of probiotic strain *Escherichia coli* M-17 metabolites against *Candida auris*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were investigated. To study the microbicidal effect and inhibition of the microorganism growth by *E. coli* metabolites, the delayed co-culture method was used. *E. coli* M-17 metabolites inhibited the growth of all investigated species: *C. auris*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*. However, the manifest biocidal effect was observed only for *C. auris* and *S. aureus* strains.

Key words: *E. coli*, metabolites, microbial antagonism, biocidity

* Контактное лицо: Игнатова Надежда Ивановна,
e-mail: n.i.evtteeva@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы находятся в сложных межвидовых взаимоотношениях внутри организма хозяина, что особенно заметно при состоянии дисбиоза. Появление или доминирование минорных представителей, а также оппортунистических экзогенных видов в микробиоте человека может служить индикатором нарушения нормального микробиоценоза и являться риском развития госпитальных инфекций. Полагают, что использование пробиотических продуктов, содержащих метаболиты представителей облигатной микробиоты, способствует поддержанию видового баланса в микробиоме и снижает риск развития инфекционных заболеваний человека за счет элиминации потенциально опасных патогенов [1].

Одним из естественных представителей микробов-ингибиторов могут быть пробиотические штаммы *Escherichia coli*, используемые для межвидового антагонизма с условно-патогенной микробиотой [2]. Эксперименты на дрожжилах показали, что *E. coli* могут ингибировать рост *Pseudomonas aeruginosa* [3]. Выявлено, что пробиотический штамм *E. coli* M-17 обладает выраженной антагонистической активностью против патогенных кишечных палочек, шигелл и низкой – в отношении стафилококков, в том числе *Staphylococcus aureus*, а также *Candida albicans* и *Streptococcus* spp. [4]. Известно также о конкурентных взаимоотношениях *E. coli* и микромицетов, когда происходит с одной стороны угнетение роста грибов, а с другой – усиление продукции их факторов вирулентности [5]. Однако в исследованиях не проведено сравнение, насколько эффективно влияют пробиотические штаммы или их секреторные продукты на разные группы микроорганизмов: как бактерий, так и микромицетов. Между тем, подобное изучение чувствительности предполагаемых патогенов к метаболитам пробиотического штамма может способствовать выбору наиболее эффективного метабиотика.

Цель данного исследования: провести сравнение выраженности антагонистических свойств пробиотического штамма *E. coli* M-17 в отношении ряда условно-патогенных микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали *Escherichia coli* штамм M-17, *Candida albicans* (штаммы 195, 258, 290, 601), *Candida auris* (штаммы 70, 78, 84, 95), *Pseudomonas aeruginosa* (штаммы 333, 327), *Staphylococcus aureus* (штаммы 87, 5663) из коллекции кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины ПИМУ. Протеом штаммов был предварительно изучен с помощью метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF, Autoflex speed, Bruker Daltonik GmbH, Germany).

Грибы рода *Candida* предварительно выращивали на декстрозном агаре Сабура (HiMedia, India), *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* – на мясопептонном агаре (МПА) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) в течение 24-48 часов при 37 °С.

Для исследования влияния продуктов метаболизма *E. coli* М-17 на рост других микроорганизмов применяли метод совместного отсроченного культивирования [6]. Для этого *E. coli* штамм М-17 засеивали на поверхность МПА, инкубировали (24 ч, 37 °С), затем формировали второй слой агара путём наслаивания агара Сабура или МПА поверх выросшей культуры *E. coli*. В эксперименте для посева на верхний (второй) слой агара использовали стандартизированные клеточные суспензии *Candida*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* в концентрации 10⁴ кл/мл. Для контроля роста микробных культур применяли двухслойный агар без посева *E. coli* М-17. Затем посева инкубировали при 37 °С в течение 24 часов (культивирование бактерий) или 48 часов (культивирование микромицетов). Подсчитывали количество и измеряли диаметр колоний микроорганизмов (КОЕ), выросших в чашках Петри. Микробицидный эффект оценивали по уменьшению количества выросших колоний на поверхности верхнего слоя агара в эксперименте по сравнению с контролем, а бактериостатический/ фунгистатический эффект – по уменьшению размера колоний.

Статистическую обработку результатов выполняли в программе Statistica 9 с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для двух независимых выборок. Результаты представлены в виде М (средний диаметр колоний)±σ (стандартное отклонение). Различия считали значимыми при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Подавление роста микроорганизмов под действием метаболитов *E. coli* М-17 было отмечено для всех исследуемых видов: *C. auris*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* (табл. 1, 2).

Таблица 1

Количество колоний микроорганизмов, выросших на поверхности двухслойного агара, при совместном отсроченном культивировании с *E. coli* М-17

Вид/Штамм	Количество колоний, шт	
	Контроль	В присутствии <i>E. coli</i> М-17
<i>C. auris</i> 70	25,0±3,0	0 *
<i>C. auris</i> 78	15,5±1,5	0 *
<i>C. auris</i> 84	15,5±0,5	15,5 ±0,5
<i>C. auris</i> 95	13,0±2,0	0 *
<i>C. albicans</i> 195	25,0±3,0	24,0 ± 2,0
<i>C. albicans</i> 258	27,5±1,5	25,5 ± 1,0
<i>C. albicans</i> 290	25,5±0,5	26,5 ± 0,5
<i>C. albicans</i> 601	23,0±2,0	25,0 ± 2,0
<i>P. aeruginosa</i> 333	28,5±1,5	27,5 ± 1,5
<i>P. aeruginosa</i> 327	29,5±0,5	25,5 ± 1,5
<i>S. aureus</i> 87	27,5±1,0	0 *
<i>S. aureus</i> 5663	26,5±0,5	0 *

* - статистически значимые различия по сравнению с контролем (p < 0,05)

Таблица 2

Размер колоний микроорганизмов, выросших на поверхности двухслойного агара, при совместном отсроченном культивировании с *E. coli* М-17

Вид/Штамм	Размер колоний, мм	
	Контроль	В присутствии <i>E. coli</i> М-17
<i>C. auris</i> 70	1,85±0,07	0 *
<i>C. auris</i> 78	2,00±0,06	0 *
<i>C. auris</i> 84	1,79±0,06	0,46 ± 0,02 *
<i>C. auris</i> 95	2,53±0,07	0 *
<i>C. albicans</i> 195	4,25±0,25	0,75 ± 0,25 *
<i>C. albicans</i> 258	2,90±0,10	1,70 ± 0,13 *
<i>C. albicans</i> 290	2,70±0,11	0,83 ± 0,17 *
<i>C. albicans</i> 601	4,65±0,13	1,88 ± 1,14 *
<i>P. aeruginosa</i> 333	1,85±0,08	0,75 ± 0,06 *
<i>P. aeruginosa</i> 327	2,05±0,02	0,30 ± 0,02 *
<i>S. aureus</i> 87	0,66±0,04	0 *
<i>S. aureus</i> 5663	0,85±0,04	0 *

* - статистически значимые различия по сравнению с контролем (p < 0,05)

При этом выраженный (p<0,05) фунгицидный эффект наблюдали в отношении большинства представителей *C. auris*: отсутствие роста культуры выявили у штаммов 70, 78 и 95 (табл. 1). В то же время штамм *C. auris* 84 сохранял жизнеспособность в присутствии метаболитов кишечной палочки, хотя и обнаружили уменьшение размера колоний в 3,9 раз (p<0,05), что свидетельствовало о фунгистатическом эффекте (табл. 2) продуктов метаболизма *E. coli* М-17 в отношении данного штамма *Candida*. Вместе с тем метаболиты *E. coli* М-17 не проявляли фунгицидное действие в отношении *C. albicans* (табл. 1), хотя фунгистатический эффект продуктов метаболизма кишечной палочки был отчетливо виден в этих экспериментах. Так, в присутствии метаболитов *E. coli* М-17 размер колоний *C. albicans* существенно уменьшался в 1,7 - 5,7 раз (p<0,05) по сравнению с контролем (табл. 2).

В экспериментах с бактериями продукты метаболизма *E. coli*, присутствующие в среде для культивирования бактерий, проявляли выраженный (p<0,05) бактериостатический эффект в отношении всех исследуемых штаммов *P. aeruginosa* и *S. aureus* (табл. 1). Однако существенное (p<0,05) бактерицидное действие метаболитов кишечной палочки оказывали только на штаммы *S. aureus* (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Среди исследуемых микромицетов штаммы *C. auris* оказались более чувствительными к воздействию метаболитов *E. coli* М-17 по сравнению с *C. albicans*. Отсутствие у штаммов *C. auris* способности противостоять биоцидному действию метаболитов *E. coli* делает их менее конкурентноспособными при колонизации слизистых оболочек в сравнении с *C.*

albicans. Этим можно объяснить редкую персистенцию *S. auris* на слизистых оболочках (столь характерную для *S. albicans*) и, преимущественно, инвазивный характер инфекций [7].

Антибактериальное биоцидное действие метаболитов *E. coli* в отношении штаммов золотистого стафилококка продемонстрировало, что представители облигатной группы микробиоты кишечника, такие как *E. coli*, являются одним из существенных факторов, снижающих колонизацию слизистой оболочки *S. aureus* в биотопе. Взаимоотношения *E. coli* с *P. aeruginosa* имели иной характер: синегнойная палочка оказалась более устойчива к действию продуктов метаболизма пробиотического штамма, что проявлялось в уменьшении размера ее колоний без изменения количества. Наши результаты согласуются с данными других авторов, которые ранее показали, что *E. coli* и *P. aeruginosa* находятся в процессе динамического ингибирования [3] и, в зависимости от концентрации метаболитов кишечной палочки (уксусная и молочная кислоты) или синегнойной палочки (пиоцианин), бактериостатический эффект

может быть смещен в сторону того или иного вида. Также можно предположить, что устойчивости *P. aeruginosa* к действию метаболитов бактерий-конкурентов способствует наличие у данного микроорганизма объемного слизистого чехла, замедляющего диффузию различных органических субстанций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метаболиты пробиотического штамма *E. coli* М-17 подавляют рост широкого спектра микроорганизмов, включая бактерии *S. aureus* и *P. aeruginosa* и микромицеты *C. auris* и *C. albicans*. Однако существенный микробицидный эффект отмечен только в отношении штаммов *S. aureus* и *C. auris*. Эти данные следует учитывать при назначении пробиотических препаратов – метабиотиков, приготовленных на основе пробиотических штаммов *E. coli*, для таргетной коррекции нарушений микробиома человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шендеров Б.А., Ткаченко Е.И., Захарченко М.М., Синуца А.В. Метабиотики: перспективы, вызовы и возможности. Медицинский алфавит. 2019; 2 (13): 43-48. [Shenderov B.A., Tkachenko E.I., Zakharchenko M.M., Sinitsa A.V. Metabiotics: prospects, challenges and opportunities. Medical alphabet. 2019;2 (13): 43-48. (In Russ.)]. doi.org/10.33667/2078-5631-2019-2-13(388)-43-48
2. Hwang I.Y., Koh E., Wong A., et al. Engineered probiotic *Escherichia coli* can eliminate and prevent *Pseudomonas aeruginosa* gut infection in animal models. Nat Commun. 2017; 8: 15028. doi: 10.1038/ncomms15028
3. Christofi T., Panayidou S., Dieronitou I., et al. Metabolic output defines *Escherichia coli* as a health-promoting microbe against intestinal *Pseudomonas aeruginosa*. Scientific Reports. 2019; 9 (1):1-13. doi:10.1038/s41598-019-51058-3
4. Гайдеров А.А. Изучение свойств штаммов *Escherichia coli* М-17 b *Bacillus subtilis* 1719 на модели экспериментального дисбиоза: Автореф. дисс... к.б.н.: 03.00. 07. М., 2007. [Gaidarov A.A. Studying the properties of *Escherichia coli* М-17 b *Bacillus subtilis* 1719 strains on the experimental dysbiosis model: Abstract. diss... Candidate of Biological Sciences: 03.00. 07. М., 2007 (In Russ)].
5. Yeganeh Farrokhi, Batool Al-Shibli, Dumooa Falah-Joudah Al-Hameedawi, Zeinab Neshati, Ali Makhdoumi. *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.org/10.1016/j.resmic.2021.103849.
6. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С., Анкирская А.С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Изд-во "Лань", 2017. 2-е изд., испр. 608 с. [Labinskaya A.S., Blinkova L.P., Eschina A.S., Ankirskaya A.S. Private medical microbiology with microbiological research technique. Moscow: Publishing House "Lan", 2017. 2nd ed., ispr. 608 с. (In Russ)].
7. Du H., Bing J., Hu T., et al. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. PLoS Pathog. 2020; 16 (10): e1008921. doi.org/10.1371/journal.ppat.1008921

Поступила в редакцию журнала 07.06.2022

Рецензент: И.А. Рябинин



К ВОПРОСУ О ПРОБЛЕМАХ ИДЕНТИФИКАЦИИ *CANDIDA AURIS*

¹Оганесян Э.Г. (ассистент кафедры)*, ³Гордеева С.А. (зав. лаб.), ²Тараскина А.Е. (зав. лаб.), ²Чилина Г.А. (зав. лаб.), ²Босак И.А. (с.н.с.), ¹Мошкевич И.Р. (ассистент кафедры), ⁴Круглов А.Н. (зав. лаб.), ⁵Орлова О.Е. (зав. лаб.), ¹Богданова Т.В. (ассистент кафедры), ^{1,2}Богомоллова Т.С. (зав. лаб.), ¹Козлова О.П. (доцент), ¹Ковыршин С.В. (студент), ¹Алексеев А.Ю. (студент), ^{1,2}Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой)

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург; ²НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Санкт-Петербург; ³Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург; ⁴Московский многопрофильный клинический центр «Коммунарка», Москва; ⁵Городская клиническая больница №67 им. Л.А. Ворохобова, Москва, Россия

Представлены данные сравнительного исследования идентификации *Candida auris* фенотипическими (биохимическое профилирование), физико-химическими (MALDI-TOF-масс-спектрометрия) и молекулярно-генетическими методами (таргетное секвенирование). *C. auris* вызывает инфекционный процесс повышенной контагиозности, связанный с оказанием медицинской помощи, и обладает сниженной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам и дезинфектантам. Показаны преимущества таргетного секвенирования и MALDI-TOF-масс-спектрометрии для идентификации *C. auris* и необходимость ре-идентификации дрожжевых патогенов в случае использования методов, основанных только на биохимической идентификации, в лаборатории, оснащенной MALDI-TOF-масс-спектрометром или анализатором для секвенирования.

Ключевые слова: *Candida auris*, идентификация, MALDI-TOF-масс-спектрометрия, хромогенная среда, таргетное секвенирование, VITEK 2 YST, микробиологическая лаборатория

* Контактное лицо: Оганесян Элина Григорьевна, e-mail: Ellina.Oganesyan@szgmu.ru

ON THE QUESTION OF IDENTIFICATION PROBLEMS OF *CANDIDA AURIS*

¹Oganesyan E.G. (assistant of the department), ³Gordeeva S.A. (head of the laboratory), ²Taraskina A.E. (head of the laboratory), ²Chilina G.A. (head of the laboratory), ²Bosak I.A. (senior scientific researcher), ¹Moshkevich I.R. (assistant of the department), ⁴Kruglov A.N. (head of the laboratory), ⁵Orlova O.E. (head of the laboratory), ¹Bogdanova T.V. (assistant of the department), ^{1,2}Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ¹Kozlova O.P. (associate professor), ¹Kovyrshin S.V. (student), ¹Alekseev A.Yu. (student), ^{1,2}Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the department)

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg; ²Kashkin Research Institute of Medical Mycology, St. Petersburg; ³Clinical Infectious Hospital named after S.P. Botkin, St. Petersburg; ⁴Moscow Multidisciplinary Clinical Center "Kommunarka", Moscow; ⁵L.A. Vorokhobov Municipal Clinical Hospital №67, Moscow, Russia

The article presents data of a comparative study of the identification of *Candida auris* by phenotypic (biochemical profiling), physicochemical (MALDI-TOF-mass spectrometry) and molecular genetic methods (targeted sequencing). *C. auris* causes a highly contagious infectious process associated with medical care, and has a reduced susceptibility to antifungal drugs and disinfectants. The advantage of targeted sequencing and MALDI-TOF-mass spectrometry for the identification of *C. auris* and the need for re-identification of yeast pathogens in the case of using methods based only on biochemical identification in a laboratory equipped with a MALDI-TOF mass spectrometer or analyzer for sequencing are shown.

Key words: *Candida auris*, identification, MALDI-TOF-MS, chromogenic medium, sequencing, VITEK 2 YST, microbiological laboratory

ВВЕДЕНИЕ

Род *Candida* включал к концу XX в. около 200 видов, большинство из которых являются непатогенными [1]. Сегодня, в связи с внедрением молекулярно-генетических методов, эта цифра стремительно возрастает. Более 40 видов *Candida* spp. – возбудители инвазивного кандидоза (*Candida albicans*,

Candida glabrata, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* и др.) [2]. В XXI веке отмечают сдвиг в эпидемиологическом ландшафте инвазивного кандидоза: ранее преобладающий вид *C. albicans* стал уступать *Candida non-albicans* видам, среди которых преобладают виды со сниженной чувствительностью к противогрибковым лекарственным средствам (ПГЛС) [3].

Одним из таких видов является *C. auris*, который появился в мировой клинической практике в 2009 г., активно распространился на пяти континентах и представляет серьезную угрозу в области здравоохранения во всем мире [4, 5]. *C. auris* – контагиозный нозокомиальный патоген, ассоциированный с оказанием медицинской помощи, вызывает трудно устранимые внутрибольничные вспышки, устойчив к основным классам ПГЛС и ряду дезинфектантов, применяемых в клинической практике. В связи с этим точная видовая идентификация грибов рода *Candida* важна, так как, с одной стороны, будет способствовать эффективной терапии тяжелой грибковой инфекции, а с другой – предотвращению внутрибольничной передачи контагиозного дрожжевого патогена. Следует отметить, что лаборатории не всегда имеют возможность идентифицировать дрожжи рода *Candida*, выделенные из биосубстратов больных инвазивным кандидозом, надежными методами до вида и определить чувствительность к ПГЛС в соответствии с клиническими рекомендациями [6].

За последние годы совершен настоящий прорыв в методологии идентификации микроорганизмов: способы определения стали более точными и информативными. В настоящее время идентификация *C. auris* на основе секвенирования (внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) или большой субъединицы LSU рибосомной ДНК (рДНК)) является эталонной, однако применение ее в рутинной практике затруднительно из-за длительной пробоподготовки, необходимости дорогостоящего оборудования и соответствующей квалификации у специалиста лаборатории.

Использование в микробиологических лабораториях MALDI-TOF масс-спектрометрии как метода идентификации патогенов революционно расширило возможности точного определения этиологии заболевания, которые ранее были прерогативой узкоспециализированных центров, применяющих метод таргетного секвенирования для этих целей. Масс-спектрометры MALDI Biotyper (Bruker-Daltonics), Vitek MS (bioMérieux) могут надежно дифференцировать *C. auris* от других видов *Candida*, только если база данных содержит необходимую информацию. В данном случае фактором, ограничивающим использование этого метода в рутинной клинической практике, является, безусловно, высокая цена оборудования.

Поэтому по-прежнему самыми удобными и доступными методами идентификации клинических изолятов дрожжей для большинства лабораторий являются методы, основанные на фенотипических свойствах микроорганизмов (биохимические, характеризующие способность патогена к ассимиляции и ферментации субстратов). Отметим, что хромогенные среды длительное время были основным диагностическим инструментом для определения видов *Candida* [7]. Они позволяют идентифицировать виды *Candida* за счет образования видоспецифического цвета колоний. Большинство хромогенных сред дают возможность идентифицировать четыре наиболее распространенных в клинической практике возбудителя рода *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*. Между тем, пейзаж микромицетов – возбудителей микозов становится разнообразнее, и этот факт диктует новые задачи перед производителями сред и тест-систем для идентификации микроорганизмов. За последние годы были разработаны хромогенные среды для видовой идентификации *C. auris*. Однако у каждой из них есть свои определенные ограничения в применении для этих целей.

Показано, что использование только классических методов идентификации в случаях редких или новых видов дрожжевых патогенов с пониженной чувствительностью к ПГЛС, в том числе и *C. auris*, приводит к ошибкам в определении видовой принадлежности возбудителя в связи со сходными профилями ассимиляции и ферментации субстратов близкородственных видов *Candida* [8].

На сегодняшний день весьма перспективны методы идентификации дрожжей на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) с прямым выделением ДНК из биоматериала, полученного от пациента [9]. ПЦР – это относительно быстрый и доступный метод для большинства лабораторий, поэтому разработка таких тест-систем и внедрение в клиническую практику увеличивают возможности микробиолога точно идентифицировать грибковый патоген.

В связи с этим целью настоящего исследования было сравнительное изучение фенотипических (биохимических), физико-химических (масс-спектрометрических), молекулярно-генетических (таргетное секвенирование) методов для идентификации *C. auris* и определение оптимальных подходов при идентификации дрожжевых патогенов в практической деятельности микробиолога.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 60 клинических изолятов *C. auris*, выделенных из биологических субстратов пациентов с COVID-19 в период 2020-2021 гг. и депонированных в Российскую коллекцию патогенных грибов (РКПГ). Штаммы культивировали 24 часа при 35 °С на агаре Сабуро с добавлением

хлорамфеникола. Для сравнительной идентификации *C. auris* использовали таргетное секвенирование, MALDI-TOF-масс-спектрометрию, анализатор для идентификации / определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (Vitek 2), хромогенную среду CHROMID *Candida* (CAN2). Исследование проводили на базе НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» и Клинической инфекционной больницы им. С.П. Боткина (Санкт-Петербург).

Таргетное секвенирование. Эталонной идентификацией считали секвенирование ITS-региона рДНК [10]. ДНК микромицетов экстрагировали с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Таксономически информативный ITS-локус рДНК грибов *C. auris* был амплифицирован в результате ПЦР с использованием стандартных праймеров ITS4 [TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC] и ITS5 [GGA-AGT-AAA-AGT-CGT-AAC-AAG-G] (Синтол, Москва). Секвенирование ПЦР-фрагмента выполняли по методу Сэнгера на генетическом анализаторе ABI Prizm 3500 (Applied Biosystems, США). Реакцию проводили с помощью набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в объеме 10 мкл согласно рекомендациям производителя. Очистку от терминирующих аналогов нуклеотидов осуществляли набором BigDye XTerminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Секвенирование выполняли в обоих направлениях. Идентификацию микромицетов проводили с помощью алгоритма BLAST путем выравнивания анализируемой нуклеотидной последовательности с последовательностями, представленными в GenBank. Для видовой идентификации использовали показатель сходства > 98% в последовательностях ITS.

Культивирование *Candida spp.* с использованием хромогенной среды. Чистые культуры микромицетов засеивали на хромогенную среду CHROMID *Candida* (CAN2) (bioMérieux) для селективного выделения дрожжевых грибов и прямой идентификации *C. albicans*. В работе использовали чистые культуры *C. auris* (n=60) и другие клинически значимые виды (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*). Учет результатов обычно выполняли через 24, 48, 72 часа инкубации.

Интерпретацию результатов проводили по изменению цвета колоний согласно инструкции производителя:

- от голубого до темно-синего – *C. albicans*;
- розовый: *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* и *C. kefyr*;
- кремово-белый: нет прогностического значения.

C. auris на данной среде может образовывать розовые или кремово-белые колонии.

Анализатор для идентификации / определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (Vitek 2). Идентификацию до вида колоний дрожжей осуществляли с помощью автоматизированной системы ВИТЕК 2 версия 9.2 (BioMérieux, Франция), применяя карты для идентификации клинически значимых дрожжей и дрожжеподобных микроорганизмов Vitek 2 YST. Использовали суточные культуры *C. auris* на агаре Сабуро, которые стерильным тампоном вносили в 3,0 мл стерильного физиологического раствора в прозрачную пластиковую пробирку с плотностью от 1,9 до 2 по McFarland. Карта Vitek 2 YST содержит 46 биохимических тестов, позволяющих оценить утилизацию углерода и азота, а также ферментативную активность микроорганизма. Результат учитывали через 18 часов.

При сравнительном анализе профилей биохимической активности исследуемых штаммов дрожжей использована логарифмическая регрессия с регуляризацией. Статистическую обработку результатов проводили в системе R.

MALDI-TOF-масс-спектрометрия. Матрично-ассоциированную лазерную десорбцию/ионизацию – времяпролетную масс-спектрометрию (MALDI-TOF-MS) выполняли параллельно на двух анализаторах: Autoflex speed TOF/TOF Bruker Daltonics (Германия) с пакетом программного обеспечения flexControl v. 3.4, flex Analysis v. 3.4, MALDI Biotyper v. 3.1 с базами «Bruker Taxonomy» и ВИТЕК MS (BioMérieux, Франция) в автоматическом режиме). Изолированные колонии в двух повторностях наносили на ячейки мишени, экстрагировали муравьиной кислотой, после чего добавляли 2 мкл матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота и раствор, содержащий 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все штаммы микромицетов (n=60), включенные в исследование, были идентифицированы с помощью ITS-секвенирования как *C. auris*. В результате посева изолятов *C. auris* на агар CHROMID *Candida* через 24 часа не было выявлено изменения окраски, также как и других видов *Candida sp.* Изменение цвета колоний наблюдали через 48 часов культивирования, которое оставалось неизменным в дальнейшем при визуальной оценке через 72 часа. Так, штаммы *C. krusei* и *C. glabrata* имели кремовую окраску, *C. albicans* – синюю, *C. tropicalis* – розовую (Рис. 1).

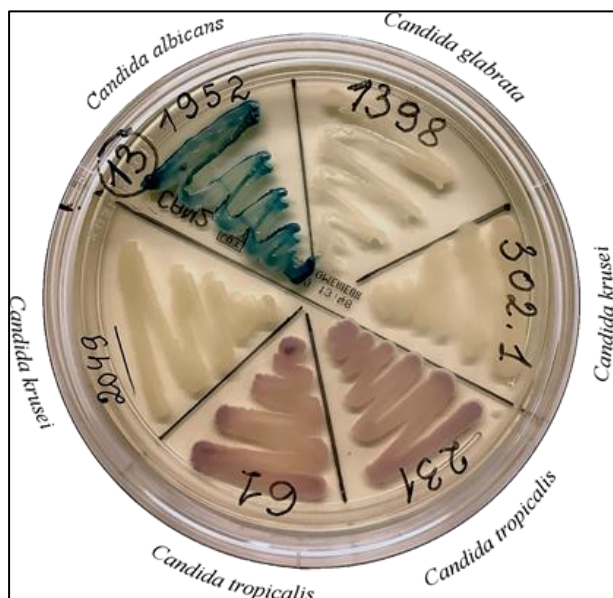


Рис. 1. Рост грибов *Candida* spp. на агаре CHROMID *Candida* (CAN2) через 48 часов культивирования при 35 °С.

Все протестированные изоляты *C. auris* (n=60) были окрашены в розовый цвет, что соответствовало инструкции (Рис. 2).

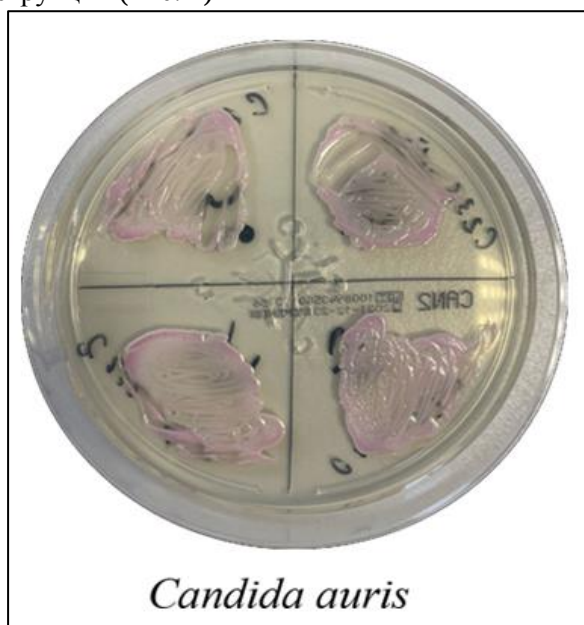


Рис. 2. Рост грибов *C. auris* на агаре CHROMID *Candida* (CAN2) через 48 часов культивирования при 35 °С.

При идентификации *C. auris* (n=60), ранее идентифицированных с помощью таргетного секвенирования, на анализаторе для идентификации микроорганизмов Vitek 2 YST 9.2 вид *C. auris* определялся с высоким уровнем точности (высокая дискриминация) в 47% случаев; 38% штаммов были идентифицированы до вида *C. auris* с низкой дискриминацией, 15% штаммов ошибочно идентифицированы в качестве других видов (*Candida duobushaemulonii*, *Candida pelliculosa*) (табл.1).

Таблица 1
Сравнительная характеристика биохимических, физико-химических и молекулярно-генетических методов идентификации *C. auris* (n=60)

Vitek 2 YST		MALDI-TOF MS		Секвенирование ДНК <i>C. auris</i> (ITS-регион)
Уровень идентификации	<i>C. auris</i> (%)	Bruker <i>C. auris</i> (%)	VITEK MS <i>C. auris</i> (%)	ITS –регион (98-100%)
Высокий уровень идентификации	<i>C. auris</i> – 47	100	100	100
Низкий уровень идентификации	<i>C. auris</i> – 38			
Ошибочная идентификация	<i>C. duobushaemulonii</i> – 13 <i>C. pelliculosa</i> – 2			

Мы провели анализ исходов всех 46 используемых для биохимической идентификации тестов и установили, что в большей степени на ошибочный результат влияют 6 параметров. (Рис 3).



Рис. 3. Влияние субстратов в карте Vitek 2 YST на результат идентификации *C. auris*.

При оценке результатов MALDI-TOF- масс-спектрометрии установлено, что видовая идентификация с высоким уровнем у всех штаммов *C. auris* (n=60) была получена как на Bruker Biotyper, так и на Vitek MS (табл. 1, 2). Таким образом, физико-химический метод (MALDI-TOF-масс-спектрометрия) для идентификации *C. auris* можно считать надежным способом идентификации *C. auris* наравне с генетическим методом (таргетное секвенирование).

Таблица 2
Идентификация *C. auris* (n=60) с помощью MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics GmbH, Германия)

Показатели	MALDI Bruker			
	≥ 2	≤1,9 -2,0	≤1,8-1,9	<1,8 -1,7
Score value				
Количество штаммов (%)	40%	20%	21,6%	18,3%

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании проведенного исследования было установлено, что полученные результаты при использовании хромогенной среды CHROMID *Candida* (CAN2) для идентификации *Candida* spp., в том числе *C. auris*, совпадают с интерпретацией, заявленной в инструкции. Однако можно заключить, что такой метод идентификации целесообразно применять только в качестве скрининга с учетом морфологических особенностей микромицетов при первичном посеве биоматериала от пациента. В дальнейшем для точной видовой идентификации дрожжей рекомендуется использовать дополнительные тесты, а в случае с *C. auris* все подозрительные (на данной среде – розовые через 48 ч. колонии) изоляты идентифицировать более надежными методами. Применяемые для этой цели обычно тест-системы (API 20C, API ID 32C, RapID Yeast Plus и др.) не относятся к таковым, так как биохимический профиль для идентификации *C. auris* в них отсутствует. Это относится и к картам для идентификации дрожжей с помощью микробиологических анализаторов, вследствие чего возможны ошибочные результаты при обнаружении *C. auris* (*C. haemulonii*, *C. famata*, *C. kefyr*, *C. duobushaemulonii*, *C. pseudohaemulonii*, *C. krusei*, *Rhodotorula glutinis* и др.) вместо *C. auris*. Следует отметить, что в 2017 г. программное обеспечение для идентификации Vitek 2 было обновлено до версии 8.01, в которую были добавлены следующие четыре вида: *C. auris*, *C. duobushaemulonii*, *C. haemulonii* var. *vulnera* и *Cryptococcus gattii*. Это позволило точно идентифицировать изоляты *C. auris* из клады IV (южно-американская), но этого обновления было недостаточно для точной идентификации изолятов из клады I (южно-азиатская) или III (африканская) [11]. Сейчас для анализатора Vitek 2 существует версия 9.2, но сведения об оценке обновленной версии всех пяти клад *C. auris* ещё ограничены. Результаты идентификации, полученные в настоящей работе с помощью Vitek 2 (версия 9.2), коррелируют с данными других авторов. В многоцентровом исследовании с участием трех микробиологических лабораторий определяли 35 изолятов *C. auris* на Vitek 2 (версия 8.01), и правильная идентификация (высокая дискриминация) была в 52% протестированных образцов. Результаты низкой дискриминации с невозможностью различить *C. auris*, *C. duobushaemulonii* и *C. famata* были отмечены в среднем в 27% образцов. Неправильные результаты идентификации отмечали в среднем в 21% образцов, большинство из которых

(91%) были идентифицированы как *C. duobushaemulonii*, а остальные 9% были зарегистрированы как *C. lusitaniae* [12].

В другом исследовании *C. auris*, в которое было включено 12 штаммов из 3 географических клад, верно было идентифицировано 7 изолятов (58,3%), остальные ошибочно определены как *C. duobushaemulonii* или *C. haemulonii* [11].

Следовательно, подозрительные изоляты, которые либо идентифицированы с помощью Vitek 2 YST как *C. auris* с низкой дискриминацией, либо как близкородственные виды, должны быть ретестированы экспертными методами.

Другие авторы показали, что автоматизированная система BD Phoenix (Becton Dickinson and Company) также может ошибочно идентифицировать *C. catenulata*, *C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii*, *C. famata* вместо *C. auris*. При исследовании двумя системами идентификации (API AUX 20C и Phoenix) штаммов *C. auris* были получены следующие результаты: анализатор Phoenix идентифицировал все изоляты дрожжей как *C. haemulonii*, тогда как системой API AUX 20C получено несколько вариантов идентификаций (*C. famata* – в большинстве, *Rhodotorula glutinis*, *C. haemulonii*) [13].

Есть сведения о том, что система API 20C AUX (bioMérieux) может ошибочно идентифицировать *C. auris* как *Candida sake*, *C. famata* и *Saccharomyces cerevisiae*. Кроме того, эта система может также ошибочно идентифицировать *C. auris* как *Rhodotorula glutinis* в изолятах с отрицательной уреазной реакцией, в которых отсутствуют характерные для *R. glutinis* колонии с розовым пигментом [10, 14].

Безусловно, если в системах API 20C AUX и в базе MicroScan (Beckman Coulter) не содержатся данные о *C. auris*, то ошибки неизбежны. Анализатор MicroScan ошибочно определяет вместо *C. auris* *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* [15, 16].

Таким образом, из-за схожего биохимического профиля *C. auris* с близкородственными видами затруднено или практически невозможно определение вида биохимическими методами с высокой точностью.

Опубликованы наиболее распространённые ошибки при идентификации *C. auris* биохимическим методом [17] (табл. 3). Эти данные могут помочь избежать ошибок при идентификации *C. auris*, а при необходимости – применить дополнительные тесты или отправить подозрительный на *C. auris* штамм на идентификацию в другую лабораторию.

Таблица 3
Возможные ошибки при идентификации *C. auris* с помощью биохимических систем

Способ идентификации	Возможные ошибки идентификации (вместо <i>C.auris</i>)
Vitek 2 YST	<i>Candida haemulonii</i> <i>Candida duobushaemulonii</i>
API 20C	<i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Candida sake</i>
API ID 32C	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida sake</i> <i>Saccharomyces kluyveri</i>
BD Phoenix	<i>Candida haemulonii</i> <i>Candida catenulata</i>
MicroScan	<i>Candida famata</i> <i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida lusitanae</i> <i>Candida parapsilosis</i>

Следовательно, сотрудники микробиологических лабораторий, идентифицирующие дрожжи только биохимическими методами, должны быть проинформированы о возможных ошибках идентификации *C. auris* на используемой системе и применять дополнительные тесты, позволяющие уточнить вид микромицета, или отправлять эти виды для ре-идентификации в лаборатории, оснащенные надежными методами.

Так, в качестве дополнительных тестов при идентификации биохимическими методами таких видов дрожжей, как *C. haemulonii* и *C. duobushaemulonii*, и отсутствии возможности быстрой ре-идентификации более надежными методами можно дополнительно использовать тест на рост культуры при 40 °С на агаре Сабура с высокой концентрацией хлорида натрия (>10%). *C. auris*, как правило, может хорошо расти при таких условиях в отличие от *C. haemulonii* и *C. duobushaemulonii* [18].

Несмотря на то, что другие исследователи предлагают для дифференциации *C. guilliermondii*, *C. lusitanae* и *C. parapsilosis* от *C. auris* делать посев культуры микромицета на агар с содержанием кукурузной муки, полученные результаты неоднозначны. С одной стороны, если гифы или псевдогифы выросшей культуры отсутствуют, это должно насторожить исследователя, поскольку *C. auris* обычно не образует гифы или псевдогифы. Однако, с другой стороны, есть сведения, что некоторые изоляты *C. auris* образовывали гифы или псевдогифы [10].

Что касается имеющихся в мировой практике ПЦР-тест систем для индикации *C. auris*, можно выделить мультиплексную ПЦР для идентификации нескольких родов/видов грибов (например, Fungiplex *Candida auris* (Bruker, Германия) и *Candida auris*-специфическую ПЦР (AurisID (OLM Diagnostics, Великобритания) [19].

Сравнительное исследование ПЦР тест-систем Auris ID (OLM Diagnostics, Великобритания) и Fungiplex *Candida auris* (Bruker, Германия) продемонстрировало высокую чувствительность наборов с пределом обнаружения (LoD) *C. auris* 1 копия генома/реакция и 9 копий/реакцию соответственно. Однако были получены ложноположительные результаты при большом количестве ДНК близкородственных видов *C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii* и *C. pseudohaemulonii* при использовании набора Auris ID [20]. Данные ПЦР-тест системы не зарегистрированы на территории России, поэтому не доступны для использования в клинической практике.

Недавно в РФ была зарегистрирована мультиплексная ПЦР панель BCID2 (Blood culture identification 2) для анализатора BioFire FilmArray (BioMerieux, Франция). Использование этой тест-системы, предназначенной для одновременной идентификации 33 возбудителей инфекций кровотока и/или их групп, включая Грам+/Грамм- бактерии и грибы, а также 10 генетических маркеров устойчивости к антибактериальным препаратам, позволяет получить результат за 60 минут из положительного флакона при гемокультивировании. Данная технология, в том числе, позволяет определить 6 видов *Candida*: (*C. albicans*, *C. auris*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*), что подтверждено рядом исследований [21-23].

Коммерческий набор «МикозоСкрин» (ДНК-технология, Россия), предназначенный для выявления и типирования возбудителей грибковых инфекций родов *Candida*, *Malassezia*, *Saccharomyces* и *Debaryomyces* в препаратах, полученных из биологического материала человека, позволяет детектировать *C. auris*. Вместе с тем, мы не нашли независимой оценки этого продукта относительно определения *C. auris* в рецензируемых публикациях [24].

В настоящее время сведения о других ПЦР-тестах, зарегистрированных в РФ, которые были бы валидированы для диагностики инвазивного кандидоза в многоцентровых исследованиях, ограничены, и практически нет убедительных доказательств преимуществ какого-либо коммерческого теста, несмотря на несомненный потенциал ПЦР-диагностики микозов за счет сокращения времени исполнения и стоимости проводимого исследования.

Точная идентификация *C. auris* играет важную роль для эффективного лечения инвазивного кандидоза, понимания эпидемиологии возбудителя и своевременного предотвращения внутрибольничных вспышек. Из-за недостатков различных коммерческих тест-систем, основанных на биохимической идентификации *C. auris*, определение этого вида может быть успешным только при применении дополнительных методов исследования. Это в значительной степени поможет избежать ошибочного

определения вида при отсутствии в лаборатории экспертных (MALDI-TOF-MS, секвенирование) методов идентификации *C. auris*.

Таким образом, из анализа приведенных данных (собственных и других исследований) следует, что существуют проблемы в идентификации *C. auris* – нозокомиального контагиозного возбудителя инвазивного кандидоза, и эти вопросы применительно к быстрому и точному его обнаружению еще ждут своего решения.

Хромогенная среда CHROMID Candida (CAN2) и карты для идентификации дрожжей Vitek 2 YST представлены ООО «bioMérieuxРус».

Исследование выполнено в рамках государственного задания Минздрава России на 2022-2024 гг. «Генетические биомаркеры и биологические особенности Candida auris – возбудителя инвазивного кандидоза» (№ НИОКТР 122012100283-8).

ЛИТЕРАТУРА

1. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А., Чулина Г.А. *Candida*. Кандидозы. Лабораторная диагностика: учебное пособие. СПб.: Коста, 2010: 5-6. [Elinov N.P., Vasilyeva N.V., Stepanova A.A., Chilina G.A. *Candida*. Candidiasis. Laboratory diagnostics: a textbook. St. Petersburg: Costa, 2010: 5-6. (In Russ)].
2. <http://indexfungorum.org/>
3. Vasilyeva N.V., Raush E.R., Rudneva M.V., et al. Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey. *Frontiers of Medicine*. 2018; 12 (1): 84-91. doi: 10.1007/s11684-017-0612-x
4. Rudramurthy S., Chakrabarti A., Paul R.A., et al. *Candida auris* candidaemia in Indian ICUs: Analysis of risk factors. *J. Antimicrob. Chemother.* 2017; 72: 1794-1801. doi.org/10.1093/jac/dkx034
5. Du H., Bing J., Hu T., et al. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathog.* 2020; 16: e1008921. doi.org/10.1371/journal.ppat.1008921
6. *Клинические рекомендации. Рекомендации МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам»*, 2021. [Clinical recommendations. Recommendations of the IACMAC "Determination of the susceptibility of microorganisms to antimicrobial drugs", 2021. (In Russ)].
7. Odds F.C., Bernaerts R.I.A. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Journal of clinical microbiology*. 1994; 32 (8): 1923-1929. doi.org/10.1128/jcm.32.8.1923-1929.1994
8. Chowdhary A., Sharma C., Meis J.F. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog.* 2017; 13: e1006290. doi.org/10.1371/journal.ppat.1006290
9. Mahmoudi S., et al. Methods for identification of *Candida auris*, the yeast of global public health concern: A review. *J. Mycol. Med.* 2019; 29 (2): 174-179. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.04.004
10. Centers for Disease Control and Prevention: https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/identification.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Ffungal%2Fcandida-auris%2Frecommendations.html
11. Tan Y.E., et al. *Candida auris* in Singapore: Genomic epidemiology, antifungal drug resistance, and identification using the updated 8.01 VITEK® 2 system. *International journal of antimicrobial agents*. 2019; 54 (6): 709-715. doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.09.016
12. Ambaraghassi G., et al. Identification of *Candida auris* by use of the updated Vitek 2 yeast identification system, version 8.01: a multilaboratory evaluation study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2019; 57 (11): e00884-19. doi.org/10.1128/JCM.00884-19
13. Mohsin J., Weerakoon S., Ahmed S., et al. A cluster of *Candida auris* blood stream infections in a tertiary care hospital in Oman from 2016 to 2019. *Antibiotics*. 2020; 9: 638. doi.org/10.3390/antibiotics9100638
14. Lone S.A., Ahmad A. *Candida auris* – the growing menace to global health. *Mycoses*. 2019; 62 (8): 620-637. doi.org/10.1111/myc.12904
15. Mizusawa M., et al. Can multidrug-resistant *Candida auris* be reliably identified in clinical microbiology laboratories? *Journal of Clinical Microbiology*. 2017; 55 (2): 638-640. doi.org/10.1128/JCM.02202-
16. Parra-Giraldo C.M., et al. First report of sporadic cases of *Candida auris* in Colombia. *International Journal of Infectious Diseases*. 2018; 69: 63-67. doi.org/10.1016/j.ijid.2018.01.034
17. Centers for Disease Control and Prevention: https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/pdf/Testing-algorithm_by-Method_508.pdf
18. Welsh R.M., et al. Survival, persistence, and isolation of the emerging multidrug-resistant pathogenic yeast *Candida auris* on a plastic health care surface. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017; 55 (10): 2996-3005. doi.org/10.1128/JCM.00921-17

19. Lockhart S.R., Lyman M.M., Sexton D.J. Tools for detecting a “Superbug”: updates on *Candida auris* testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2022: e00808-21. doi.org/10.1128/jcm.00808-21
20. Sattler J., et al. Comparison of two commercially available qPCR kits for the detection of *Candida auris*. *Journal of Fungi*. 2021; 7 (2): 154. doi.org/10.3390/jof7020154
21. Simor AE et al. Rapid Identification of *Candida* Species from Positive Blood Cultures by Use of the FilmArray Blood Culture Identification Panel. *J Clin Microbiol*. 2018 Nov 27;56(12):e01387-18. doi: 10.1128/JCM.01387-18.
22. Holma T., et al. Rapid molecular detection of pathogenic microorganisms and antimicrobial resistance markers in blood cultures: evaluation and utility of the next-generation FilmArray Blood Culture Identification 2 panel. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis*. 2022; 41 (3): 363-371. doi: 10.1007/s10096-021-04314-2
23. Timbrook T.T., et al. Epidemiology of antimicrobial resistance among blood and respiratory specimens in the United States using genotypic analysis from a cloud-based population surveillance network. *Open Forum Infect. Dis*. 2022; 9 (7): ofac296. doi.org/10.1093/ofid/ofac296
24. <https://www.dna-technology.ru/equipmentpr/nabory-reagentov-dlya-pcr-vozbuditeli-gribkovyh-infekciy/mikozoskrin>

Поступила в редакцию журнала 26.09.2022

Рецензент: Ю.В. Борзова





ПАМЯТИ ЗАСЛУЖЕННОГО ДЕЯТЕЛЯ НАУКИ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН, ПРОФЕССОРА АЙРАТА РАДИКОВИЧА МАВЗЮТОВА

28 июля 2022 г. после непродолжительной тяжёлой болезни на 61-м году ушёл из жизни замечательный человек, наш дорогой коллега – заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии, профессор кафедры лабораторной диагностики ИДПО федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, заслуженный деятель науки Республики Башкортостан, член секции по медицинской микробиологии Федерального учебно-методического объединения в сфере высшего образования по УГСН 32.00.00 Науки о здоровье и профилактическая медицина, член редакционного совета журнала «Клиническая лабораторная диагностика» академик РАМТН, доктор медицинских наук профессор **Айрат Радикович Мавзютов**.

Айрат Радикович родился в 1962 году в Уфе. В 1985 г. с отличием окончил Башкирский государственный медицинский институт имени XV-летия ВЛКСМ по специальности «Гигиена, эпидемиология, санитария», в 1988 г. – защитил кандидатскую диссертацию на тему: «Адгезивная и цитотоксическая активность кишечных и кишечноподобных иерсиний», а в 2001 году – диссертацию на соискание учёной степени доктора медицинских наук на тему: «Молекулярно-генетические основы токсигенности условно-патогенных представителей Enterobacteriaceae». В 1997 году ему было присвоено учёное звание доцента, в 2004 году – профессора.

На протяжении 33 лет Айрат Радикович трудился в БГМИ (впоследствии БГМУ): в должности ассистента, старшего преподавателя, доцента кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии; доцента и профессора кафедры лабораторной диагностики ИДПО БГМУ. В 2005 году А.Р. Мавзютов организовал кафедру фундаментальной и клинической микробиологии, которой бессменно руководил до конца жизни. На этой кафедре – в то время единственной среди медицинских вузов и факультетов страны – велась подготовка специалистов с высшим про-

фессиональным образованием по специальности 020209 – «Микробиология». С 2012 года сотрудники кафедры осуществляют подготовку студентов по направлению 06.03.01 – «Биология» в рамках программ бакалавриата, с 2018 г. – магистратуры. Кафедра неоднократно становилась лучшей в вузе по итогам научной и инновационной деятельности, студенты и аспиранты кафедры неоднократно награждались дипломами на конкурсах молодежных проектов и получали федеральные научные гранты.

Профессор Мавзютов А.Р. стоял у истоков организации в БГМУ ординатуры, переподготовки и повышения квалификации врачей по специальности «Бактериология» и биологов бактериологических лабораторий, будучи до последнего времени куратором этого направления на кафедре лабораторной диагностики ИДПО БГМУ.

Айрат Радикович был руководителем научной школы «Микробиология и молекулярная диагностика», вёл активную научную работу, воспитал плеяду научных и педагогических кадров. Он был внимательным, заботливым руководителем, человеком энциклопедических знаний. Область научных интересов Айрата Радиковича охватывала патологические и пограничные состояния, ассоциированные с липополисахаридами грамотрицательных бактерий, острые кишечные инфекции и заболевания мочевого тракта, вызванные условно-патогенными энтеробактериями, молекулярно-генетические и масс-спектрометрические аспекты детекции и идентификации возбудителей внебольничной пневмонии, урогенитального трихомониаза и других инфекций, совершенствование технологии ПЩР (селективная амплификация) и создание молекулярно-генетических тест-систем для ранней диагностики и оценки эффективности лечения воспалительных заболеваний и многое другое, связанное с патогенетически обоснованными методами лабораторной диагностики в клинической микробиологии. А.Р. Мавзютовым и его последователями была предложена оригинальная классификация вагинальных дисбиозов, разработаны клинические и лабораторные критерии дифференцировки и оценки эффективности терапии. Айрат Радикович автор более 550 научных работ, в том числе учебников, учебных пособий, руководств для врачей, монографий, 27 изобретений и рационализаторских предложений.

Много времени и сил профессор Мавзютов отдавал подготовке кадров высшей квалификации. Он работал заместителем директора по клинической ординатуре и интернатуре института последипломного образования, в 2006-2012 годах – деканом медико-профилактического факультета с отделением микробиологии. А.Р. Мавзютов был членом диссертационных советов по биотехнологии и нанобиотехнологии, экологии, микробиологии, аллергологии и клинической иммунологии, был научным руководителем 15 кандидатских диссертаций.

Профессор Мавзютов А. Р. являлся действительным членом Академии медико-технических наук России по отделению медицинской экологии, биотехнологии и промышленности, членом Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, членом Всероссийского научного общества биотехнологов им. Овчинникова, членом научно-практического общества бактериологов.

В 2009 году Айрат Радикович был приглашён про-

фессором Меньшиковым В.В. в редакционный совет журнала «Клиническая лабораторная диагностика» и стал его активным членом.

За успехи в педагогической, научной и научно-организационной работе профессор Мавзютов отмечен благодарностями Министра здравоохранения РФ. Он Лауреат премии имени Чижевского РАМТН, кавалер «Золотой звезды Вернадского» – высшей награды международного межакадемического союза, лауреат республиканского конкурса «Лучший врач года» в номинации «За вклад в развитие медицины, внесенный представителями фундаментальной науки». В 2009 году ему было присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки Республики Башкортостан».

Невозможно смириться с огромной утратой для отечественной микробиологии профессора Мавзютова Айрата Радиковича – Профессионала, для которого Отчизна, Честь, Любовь к своему Делу были не просто словами... Он очень радел о судьбе микробиологического направления и одним из первых 8 лет назад выступил против ликвидации специальностей микробиологического профиля и их объединения под эгидой КДЛ... С момента основания в 2014 году Федерального учебно-методического

объединения (ФУМО) в сфере высшего образования по УГСН 32.00.00 «Науки о здоровье и профилактическая медицина» Айрат Радикович являлся активным членом секции по медицинской микробиологии, внёс большой вклад в появление новой специальности «Медицинская микробиология», разработку профессионального стандарта и программ подготовки кадров.

У Айрата Радиковича было своё видение, планы и огромное желание в дальнейшем развивать новую специальность в стране... Нам будет очень трудно без него...

Редакция журнала «Проблемы медицинской микологии», коллективы НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина, кафедры медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, члены секции по медицинской микробиологии Федерального учебно-методического объединения в сфере высшего образования «Науки о здоровье и профилактическая медицина» глубоко скорбят о безвременном уходе из жизни высококвалифицированного специалиста – микробиолога и нашего Большого друга.

Светлая память об Айрате Радиковиче Мавзютове навсегда останется в наших благодарных сердцах и истории медицинской микробиологии в России!!!

