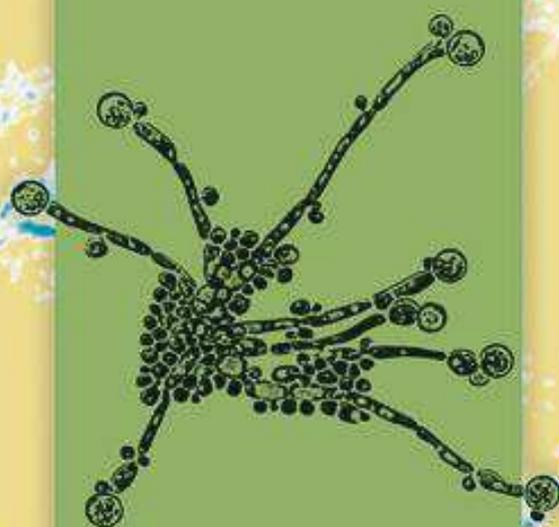


ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 19 №3



Problems in medical mycology

Vol.19 №3

2017

ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНГРЕСС ПО МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ, КЛИНИЧЕСКОЙ МИКОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

XXI КАШКИНСКИЕ ЧТЕНИЯ

6- 8 июня 2018 г., Санкт-Петербург

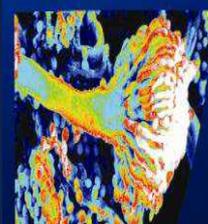
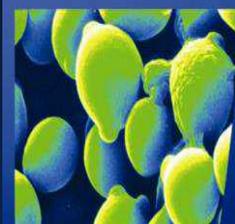
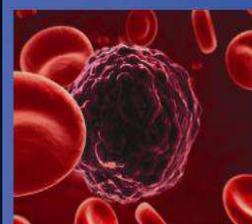
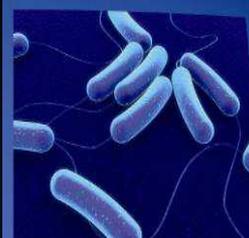
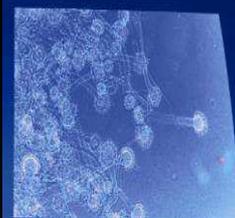
Место проведения:

Отель «Санкт-Петербург»
(Санкт-Петербург, Пироговская наб., 5/2)

Регистрация на сайте: <http://mycology.szgmu.ru>
Предварительная регистрация обязательна.

Оргкомитет Конференции:

ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России
НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина
e-mail: mycocongress@szgmu.ru,
тел./факс: +7 (812) 303-51-40



ЛОЦЕРИЛ®



ЛОЦЕРИЛ® СТИЛЬНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ГРИБКА НОГТЕЙ

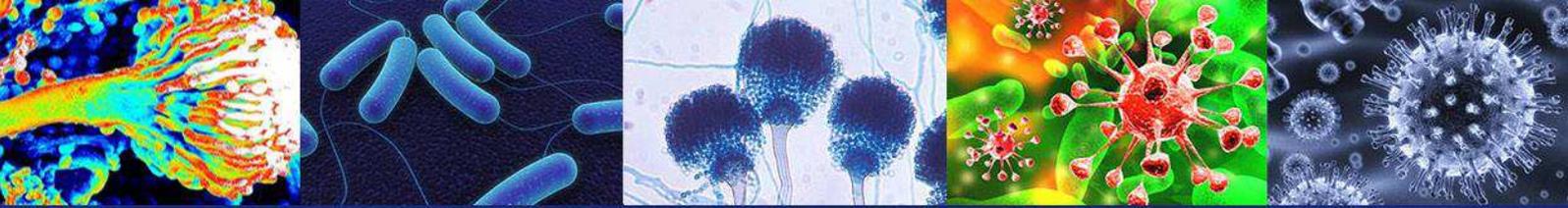


Рег. удостоверение П N012558/01

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

 GALDERMA

ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ. ПЕРЕД ПРИМЕНЕНИЕМ
НЕОБХОДИМО ПРОКОНСУЛЬТИРОВАТЬСЯ СО СПЕЦИАЛИСТОМ



РАСПИСАНИЕ ЦИКЛОВ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ МИКОЛОГИИ, БАКТЕРИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ

**КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ
СЗГМУ ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА
на 2017 год**

Наименования кафедр и циклов	№ цикла	Сроки проведения
Лабораторная микология (для врачей клинической лабораторной диагностики, врачей-бактериологов, паразитологов, микологов, эпидемиологов, инфекционистов, дерматовенерологов, биологов)	714	13.11 - 02.12
	717	04.12 - 23.12
Бактериология. Подготовка и прием экзамена на сертификат специалиста (для бактериологов ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии" и ЛПУ)	716	22.11 - 22.12
Бактериология» (для биологов микробиологических лабораторий)	884	22.11 - 13.12
Вирусология (для врачей лечебного и медико-профилактического профилей, биологов, научных сотрудников, работающих в сфере вирусологии)	715	20.11 - 08.12
ОКИ. Современные подходы к микробиологической диагностике (аккредитован в системе НМО МЗ РФ)	1860	14.12 - 20.12

Для врачей, работающих в медицинских учреждениях Минздрава России, обучение бесплатное.

Место проведения циклов:

Лабораторная микология:

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина
Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28

Бактериология:

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

Вирусология:

НИИ гриппа
Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17

Справки и прием заявок:

Лабораторная микология:

<http://mycology.szgmu.ru>
тел.:(812) 510-62-69, (812) 303-51-40, факс: (812) 510-62-77
e-mail: tatiyana.bogomolova@szgmu.ru

Бактериология:

тел.: (812) 275-19-04, (812) 275-19-46,
(812) 303-50-00, e-mail: natalya.kalyanova@szgmu.ru

Вирусология:

тел.: (812) 499-15-71,
e-mail: irina.zhilinskaya@influenza.spb.ru

РАСПИСАНИЕ ЦИКЛОВ ПО КЛИНИЧЕСКОЙ МИКОЛОГИИ

**КАФЕДРА КЛИНИЧЕСКОЙ МИКОЛОГИИ,
АЛЛЕРГОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ СЗГМУ
ИМ. И.И.МЕЧНИКОВА
на 2017 год**

Наименования кафедр и циклов	№ цикла	Сроки проведения
Клиническая микология (для врачей лечебного профиля и педиатров)	317	22.11 - 13.12

На циклах тематического усовершенствования могут обучаться врачи всех специальностей, желающие получить подготовку по вопросам аллергологии и иммунологии и клинической микологии, изучить особенности клинической картины и диагностики возбудителей инвазивных и поверхностных микозов: кандидоз, криптококкоз, аспергиллез, мукомицоз, дерматомикозы и др.; а также по актуальным вопросам аллергологии и иммунологии.

Для врачей, работающих в медицинских учреждениях Минздрава России, обучение бесплатное.

Место проведения циклов:

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина
Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, д. 1/28

Справки и прием заявок:

тел.: (812) 303-51-46
Зав. учебной частью: Мелехина Юлия Эммануиловна
e-mail: ulia.melekhina@szgmu.ru

EDITORIAL BOARD

Chief Editor —

N.P. Yelinov — Ph.D., prof. (Russia)

Deputies Chief Editor —

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

N.N.Klimko — M.D., prof. (Russia)

Responsible secretary —

T.S. Bogomolova — Ph.D. (Russia)

SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD

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

PROBLEMS IN MEDICAL MYCOLOGY

Vol. 19, № 3, 2017

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

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 19, № 3, 2017

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор —

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

Заместители главного редактора:

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

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

Ответственный секретарь —

Т.С. Богомолова — к.б.н. (Россия)

НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Н.А. Беляков — д.м.н., акад. РАМН, профессор (Россия),
Дж. Беннетт — доктор медицины (США), С.А. Бурова —
д.м.н., профессор (Россия), М.А. Вивiani — доктор
медицины (Италия), В.И. Голубев — д.б.н., вед.н.с.
(Россия), Б. Дюпон — доктор медицины (Франция),
З.О. Караев — д.м.н., профессор (Азербайджан),
К.П. Кашкин — д.м.н., академик РАМН, профессор
(Россия), В.Г. Корнишева — д.м.н., профессор
(Россия), В.Г. Кубас' — д.м.н., профессор (Россия),
А.В. Липницкий — д.м.н., профессор (Россия),
В.И. Мазуров — д.м.н., акад. РАМН, профессор
(Россия), Ю.А. Медведев — д.м.н., профессор (Россия),
С.М. Озерская — д.б.н. (Россия), И. Полачек —
доктор медицины (Израиль), Е.В. Пронина — д.м.н.,
профессор (Россия), К.И. Разнатовский — д.м.н.,
профессор (Россия), Ф.П. Романюк — д.м.н.,
профессор (Россия), А.В. Самцов — д.м.н., профессор
(Россия), А.В. Соболев — д.м.н., профессор (Россия),
А.А. Степанова — д.б.н. (Россия), Х.И. Титц — доктор
медицины (Германия), Т.Н. Трофимова — д.м.н.,
профессор (Россия), О.Г. Хурцилава — д.м.н., проф.
(Россия), В.А. Цинзерлинг — д.м.н., профессор
(Россия), Н.В. Шабашова — д.м.н., профессор (Россия),
М.А. Шевяков — д.м.н., профессор (Россия)

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ И ОБЗОРЫ

<i>Липницкий А.В., Маркин А.М., Шаров Т.Н., Топорков А.В., Викторов Д.В.</i> Внеклеточные иммунные ловушки при микозах (обзор) 3	
<i>Корнищева В.Г., Шепило С.А.</i> Лазеротерапия онихомикозов (обзор)	8
<i>Борзова Ю.В., Богомолова Т.С., Артемьева М.Н., Попова В.В., Тимирбаева О.Ю., Климко Н.Н., Васильева Н.В.</i> Менингиты, обусловленные <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> : клиническое наблюдение и обзор	13

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

<i>Хостелиди С.Н., Шадризова О.В., Богомолова Т.С., Игнатъева С.М., Тараскина А.Е., Мелехина Ю.Э., Трофимова О.А., Волкова А.Г., Попова М.О., Михайлова И.А., Колбин А.С., Бойченко Э.Г., Медведева Н.В., Подольцева Э.И., Климович А.В., Белогурова М.Б., Зюзгин И.С., Успенская О.С., Семелев В.Н., Зубаровская Л.С., Афанасьев Б.В., Климко Н.Н.</i> Внутрибольничный мукомикоз у онкогематологических больных в Санкт-Петербурге	18
<i>Иванова Ю.А.</i> Клинико-эпидемиологические особенности и эффективность терапии дерматомикозов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями	25
<i>Хисматулина И.М., Абдрахманов Р.М., Халдеева Е.В., Глушко Н.И., Лисовская С.А.</i> Анализ состава микробиоты при микотическом поражении паховой области	34

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

<i>Степанова А.А., Кост Г., Рексер К.-Х.</i> Сравнительный ультраструктурный анализ порового аппарата септ клеток плодовых тел у некоторых видов рода <i>Mycena</i>	37
<i>Царев В.Н., Ипполитов Е.В., Плахтий Л.Я., Подпорин М.С., Ильясова С.Т., Ахмедов Г.Д.</i> Оценка фотодинамического воздействия на рост популяций дрожжевых грибов <i>Candida</i> , выделенных из слизистой оболочки полости рта	45
<i>Степанова А.А., Ямагучи М., Чибана Х., Васильева Н.В.</i> Электронно-микроскопическое изучение динамики клеточных компонентов в ходе почкования <i>Rhodotorula minuta</i>	51
<i>Рябинин И.А., Лякишева Е.В., Васильева Н.В.</i> Биоинформационный анализ низкомолекулярной фракции протеома <i>Penicillium digitatum</i>	57
<i>Новикова В.В., Гейн В.Л., Бобровская О.В.</i> Антимикотическая активность новых серебряных солей пиразол-3-карбоксамидов	64

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

<i>Lipnitsky A.V., Markin A.M., Sharov T.N., Toporkov A.V., Victorov D.V.</i> Extracellular immune traps in the mycosis (review)	3
<i>Kornisheva V.G., Shepilo S.A.</i> Laser therapy of onychomycosis (review)	8
<i>Borzova Y.V., Bogomolova T.S., Artemieva M.N., Popova V.V., Timirbaeva O.Y., Klimko N.N., Vasilyeva N.V.</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> associated meningitis: a case report and review	13

CLINICAL MYCOLOGY

<i>Khostelidi S.N., Shadrivova O.V., Bogomolova T.S., Ignatyeva S.M., Taraskina A.E., Melekhina J.E., Trofimova O.A., Volkova A.G., Popova M.O., Mihailova I.A., Kolbin A.S., Boychenko E.G., Medvedeva N.V., Podoltseva E.I., Klimovich A.V., Belogurova M.B., Zuzgin I.S., Uspenskaya O.S., Semelev V.N., Zuborovskaya L.S., Afanasiev B.V., Klimko N.N.</i> Nosocomial mucormycosis in oncohaematological patients in Saint-Petersburg, Russia	18
<i>Ivanova Y.A.</i> Clinical and epidemiological features and effectiveness of dermatomycosis treatment in patients with autoimmune diseases	25
<i>Khismatulina I.M., Abdrakhmanov R.M., Khaldeeva E.V., Glushko N.I., Lisovskaya S.A.</i> Analysis of the microbiota in patients with mycotic lesions of the inguinal area	34

EXPERIMENTAL MYCOLOGY

<i>Stepanova A.A., Kost G., Rexer K.-H.</i> Comparative ultrastructural analysis of septal pore apparatus in the cells of fruit bodies in some species of the genus <i>Mycena</i>	37
<i>Tsarev V.N., Ippolitov E.V., Plachtiy L.Y., Podporin M.S., Ilyasova S.T., Ahmedov G.D.</i> Evaluation of photodynamic impact on the growth of populations of <i>Candida</i> yeast fungi extracted from the oral mucosa	45
<i>Stepanova A.A., Yamaguchi M.M., Chibana H., Vasilyeva N.V.</i> Electron-microscopic investigation of cell component dynamics during budding in the yeast <i>Rhodotorula minuta</i>	51
<i>Ryabinin I.A., Lyakisheva E.V., Vasilyeva N.V.</i> Bionformatical analysis of the low-molecular-weight fraction of <i>Penicillium digitatum</i> proteome	57
<i>Novikova V.V., Gein V.L., Bobrovskaya O.V.</i> Antimycotic activity of new silver salts of pyrazol-3-carboxamide	64

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ИММУННЫЕ ЛОВУШКИ ПРИ МИКОЗАХ (ОБЗОР)

Липницкий А.В. (г.н.с.)*, Маркин А.М. (и.о. зав. лаб.), Шаров Т.Н. (н.с.), Топорков А.В. (директор института), Викторов Д.В. (зам. директора)

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

© Коллектив авторов, 2017

В обзоре литературы приведены данные о нейтрофильных внеклеточных ловушках (NETs), осуществляющих захват и уничтожение некоторых патогенных грибов. Обсуждена роль кооперации NETs с классическим фагоцитозом в иммунном ответе человека. Представлен современный взгляд на механизмы образования и фунгицидный эффект внеклеточных ловушек нейтрофилов (нетоз) и других иммунных клеток при кандидозе, аспергиллезе, криптококкозе и паракoccидиоидомикозе.

Ключевые слова: внеклеточные ловушки, нетоз, патогенные грибы, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*

EXTRACELLULAR IMMUNE TRAPS IN THE MYCOSIS (REVIEW)

Lipnitsky A.V. (chief scientific collaborator), Markin A.M. (head of laboratory), Sharov T.N. (scientific collaborator), Toporkov A.V. (head of the institute), Victorov D.V. (deputy director)

Volgograd Research Institute for Plaque Control, Volgograd, Russia

© Collective of authors, 2017

In the literature review data of neutrophil extracellular traps (NETs) carrying out capture and killing of some pathogenic fungi has been presented. The role of NETs cooperation with classic phagocytosis in human immune response is discussed. A contemporary view on mechanisms of formation and fungicidal effect of extracellular traps of neutrophils (netosis) and other immune cells in candidosis, aspergillosis, cryptococcosis and paracoccidioidomycosis is given.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, netosis, neutrophil extracellular traps, *Paracoccidioides brasiliensis*, pathogenic fungi

В 2004 году в журнале «Science» была опубликована работа Бринкманн с соавт. [Brinkmann V., et al. Science. 2004. V.303], существенно изменившая наши представления об иммунном ответе человека. Авторы впервые представили ранее неизвестный механизм действия нейтрофильных гранулоцитов, связанный с высвобождением из них волокнистых структур, названных нейтрофильными внеклеточными ловушками – neutrophil extracellular traps (NETs). Эти структуры состоят из деконденсированной ДНК, а также гиалонина и антимикробных белков, таких как эластаза, миелопероксидаза и катепсин G. Механизм «запуска» NETs, обозначенный как «нетоз» (netosis) [1], является внеклеточным способом киллинга микроорганизмов. Он может инициироваться грамположительными и грамотрицательными бактериями, вирусами, простейшими и грибами. Предполагают, что этот процесс характерен для всех позвоночных – от рыб до человека [2] и играет важную роль в ограничении инфекционного процесса.

В ряде зарубежных и отечественных обзоров литературы достаточно широко освещены вопросы формирования и характеристики NETs при инфекционных заболеваниях бактериальной природы [3-8]. Однако систематизированные сведения о значении NETs при микозах отсутствуют.

В настоящей работе представлен анализ зарубежных публикаций, посвященных этой проблеме.

Долгое время полагали, что единственной антимикробной программой нейтрофилов являются фагоцитоз и дегрануляция [9, 10]. Открытие NETs показало, что нейтрофилы могут осуществлять антимикробное действие избирательно в отношении патогенов с различными свойствами. Так, по данным N. Branzk [11], в отличие от классического фагоцитоза, при котором в течение 30-40 минут нейтрофилы захватывают максимальное количество дрожжевых клеток *Candida albicans*, нетоз – более медленный процесс, который начинается приблизительно через 4 часа после контакта NETs с клетками гриба. Фагоцитоз стимулирует быстрое слияние азурофильных гранул нейтрофилов с фагосомой и высвобождение NETs. По мнению авторов, при контакте нейтрофилов с клетками, которые слишком велики для захвата фагоцитами, отсутствие фагосом позволяет NETs медленно высвободиться из цитозоля альтернативным путем, исключая слияние мембраны. Этот механизм помогает фагоцитам различать крупные и мелкие патогены. Поскольку клетки *C. albicans* и гифы *A. fumigatus* не способны подвергаться фагоцитозу в связи с их крупными размерами, полагают, что образование NETs является эффективной стратегией, позволяющей предотвратить диссеминацию этих грибов в организме.

При изучении кандидозной инфекции выявили, что продукция NETs активируется после распознавания β -глюкана, входящего в состав клеточной стенки гриба, при взаимодействии с рецептором комплемента (CR3), расположенного на поверхности фагоцитирующих клеток [12]. Не исключено участие в этом процессе рецептора дектин-1 или других паттерн-распознающих рецепторов (PRR3).

Нейтрофилы, завершившие фагоцитоз или осуществившие нетоз, погибают. Хроматин остается конденсированным при контакте с небольшими дрожжевыми

* Контактное лицо: Липницкий Анатолий Васильевич, e-mail: microgrib.lab@yandex.ru

клетками, но деконденсируется при взаимодействии с более крупными гифами *C. albicans* и других грибов. Возможно, содержимое некоторых азурофильных нейтрофилов «просачивается» во внеклеточное пространство в период фагоцитоза. Однако большинство NETs остаются внутри нейтрофилов и не секретируются, т.е. азурофильные гранулы не сливаются с плазматической мембраной во время этого длительного процесса. Таким образом, небольшие микробы, которые образуют зрелую фаголизосому, не являются достаточными стимулами для нетоза. Как указывают исследователи [11], «фагоцитоз действует как контрольно-пропускной пункт (checkpoint), который определяет, действительно ли нейтрофилы будут разворачивать NETs», и размер микроба – критический фактор, регулирующий нетоз в ответ на инфицирование грибами и бактериями.

NETs могут обеспечить иммунную защиту человека в ответ на внедрение патогенов, способных «уклониться» от фагоцитоза путем образования крупных агрегатов [13-15] или волокнистых форм, препятствующих фагоцитозу [16]. Некоторые авторы полагают, что существуют и другие механизмы, запускающие нетоз. Так, после фагоцитоза *Mycobacterium tuberculosis* не происходит слияния внутриклеточных органелл с фагосомой или имеет место даже разрушение фагосомы [17, 18], что приводит к индукции нетоза.

Известно, что *C. albicans* входит в состав микробиоты человека. Гриб колонизирует желудочно-кишечный и урогенитальный тракты, ротовую полость, кожу. Однако при иммуносупрессии он может диссеминировать в различные ниши организма, вызывая кандидоз – опасное для жизни инвазивное заболевание. Получены данные о роли при кандидозе внеклеточных иммунных ловушек, стимулированных не только нейтрофилами, но и другими клеточными элементами. Так, отмечают, что тучные клетки (mast cells) первыми в организме входят в контакт с *C. albicans*. Они мигрируют из крови в кожу, где происходит их окончательная дифференциация путем быстрой дегрануляции и образования цитоплазматических везикул. Имеются сведения об участии тучных клеток в киллинге бактерий [19-22]. Однако их роль в защите от кандидоза и других микозов почти не изучена [23]. Тучные клетки экспрессируют молекулы, в частности воспалительные цитокины, хемокины и включаются в иммунную защиту организма. Толл-подобные рецепторы (TLRs) участвуют в распознавании патогенных грибов и в очищении от них организма человека [24]. Активация рецепторов лектина С-типа, а частности дектина 1, компонентами грибов также стимулирует защитное действие тучных клеток. Специфические лиганды таких рецепторов способны стимулировать тучные клетки путем высвобождения активных форм кислорода (reactive oxygen species – ROS) [25] и таких медиаторов, как гистамин, простагландин, лейкотриен и триптозан. Тучные клетки в состоянии уменьшить на 30% жизнеспособность *C. albicans* в течение 3 часов после инфицирования. При этом они высвобождали провоспалительные цитокины, такие как IL-8, а позднее – IL-16 [26].

Образование тучными клетками внеклеточных иммунных ловушек наблюдают при аутоиммунных, кожных и бактериальных инфекциях [27]. Однако су-

ществует мнение, что образуемые тучными клетками внеклеточные ловушки, хотя и захватывают клетки *C. albicans*, но не убивают их [28]. В отличие от бактерий, жизнеспособность клеток *C. albicans* была лишь временно ограничена под действием ДНК-сети тучных клеток. Предполагают, что клетки *C. albicans* могли находиться внутри тучных клеток, которые затем разрушились грибом.

Основным этиологическим агентом оппортунистического микоза – криптококкоза является *Cryptococcus neoformans var. neoformans*. Другая разновидность гриба – *Cryptococcus neoformans var. gattii* вызывает заболевание реже, прежде всего, в странах с жарким климатом [29]. Единственная известная нам работа, характеризующая NETs при криптококкозе, выполнена с *C. gattii* [30]. Была исследована мышьяная модель, имитирующая легочный криптококкоз человека, путем интраназальной инокуляции гриба. Авторы показали, что образование NETs не коррелировало с киллингом возбудителя. Больше число внеклеточных ловушек наблюдали в препаратах с клетками гриба, менее чувствительными к киллингу нейтрофилами, в результате ингибирования или уклонения от их действия [31]. Была также подтверждена роль капсулы гриба в подавлении киллинга, инициированного NETs, что ранее было показано в отношении клеток *Streptococcus pneumoniae*, которые уклонялись от микробицидного действия NETs в легких и в последующем вызывали системную инфекцию [32].

Отмечено, что нейтрофилы играют основную роль в защите организма от микозов, вызванных *Aspergillus* spp. *A. fumigatus* – оппортунистический патоген, широко распространенный в мире. Инфицирование грибом обычно происходит при ингаляции спор (конидий). Инвазивный аспергиллез (ИА) встречается преимущественно у иммунокомпрометированных субъектов с нейтропенией или функциональными дефектами фагоцитов, обуславливающими, в частности, развитие хронической гранулематозной болезни. Относительно слабый фунгицидный эффект терапевтических средств приводит к высокой летальности пациентов с ИА [33].

Существенным для эффективной защиты против микоза является врожденный иммунный ответ. Толл-подобные рецепторы и лектиновые рецепторы С-типа (CLRs) на фагоцитах выявляют поверхностные лиганды *A. fumigatus* [34-36]. Однако механизмы, с помощью которых нейтрофилы человека узнают и уничтожают клетки *A. fumigatus*, оставались мало изученными. Лишь недавно были подробно представлены детали функционирования нейтрофилов, включая образование NETs и киллинг конидий и гиф *A. fumigatus* [37]. Rohm et al. [38] на модели легочного аспергиллеза установили, что для стимуляции NETs необходимо действие фагоцитарной NADPH-оксидазы (Rhox), осуществляющей запуск продукции метаболитов ROS. Тем не менее, по данным Gasendau et al. [39], индуцированные *A. fumigatus* NETs не принимают участие в киллинге гриба.

Впервые была показана роль плазматоидных дендритных клеток (pDCs) в связывании и подавлении роста гиф *A. fumigatus* [40]. Взаимодействие pDCs и *A. fumigatus* индуцировало образование внеклеточных ловушек, содержащих ДНК и гистон H3. Эти структуры соответствовали таковым у NETs. При этом рецеп-

тор рDCs дектин 2, но не дектин 1, участвовал в распознавании гиф гриба, высвобождении TNF- α , IFN- α и антимикотической активности.

Значительный интерес представляет изучение иммунных внеклеточных ловушек как механизмов защиты при инфицировании людей возбудителями особо опасных (эндемических) микозов (кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза, бластомикоза, паракокцидиоидомикоза). В отличие от оппортунистических грибов, они являются первичными патогенами, вызывающими заболевание иммунокомпетентных субъектов. Эти грибы обладают диморфной структурой в виде сапробной (мицелиальной) фазы во внешней среде и дрожжеподобной (тканевой, паразитической) фазы в организме инфицированных людей и животных. Тем не менее, лишь в 2015 г. появились работы, посвященные изучению NETs при паракокцидиоидомикозе (ПКМ) – системном микозе, эндемичном для большинства стран Латинской Америки с преобладанием в Бразилии, Колумбии, Венесуэле и Аргентине [41]. Спорадические случаи ПКМ описаны в странах Европы, США, Японии у индивидуумов, прибывших из эндемических регионов [42–44]. Заболевание возникает после вдыхания конидий, находящихся в почве, воде и на поверхности растений. В легких споры гриба трансформируются в тканевую фазу, которая распространяется в другие органы. Врожденный иммунный ответ играет существенную роль при ПКМ. На экспериментальных моделях показано, что острый воспалительный процесс возникает на ранних стадиях заболевания с включением фагоцитоза, в основном нейтрофилами и макрофагами [45–48]. При этом отмечали снижение количества грибных клеток в легких [49]. В процессе фагоцитоза выявлена высокая активность NADPH-оксидазы, эндогенной пероксидазы и кислой фосфатазы. Однако полагают, что эти механизмы недостаточны для киллинга гриба [50]. Обнаружено, что некоторые цитокины (IL-8, IL-15, IFN- γ), гранулоцито-макрофаго-колониобразующий фактор (GM-CSF), TNF- α повышают фунгицидную активность фагоцитов [51, 52]. S. Mejia et al. [53] впервые показали, что нейтрофилы человека могут образовывать NETs после взаимодействия с обоими морфотипами *P. brasiliensis* (конидии и дрожжевые клетки). Однако конидии стимулируют этот процесс независимо от продукции ROS, тогда как в дрожжевой фазе он в определенной степени зависит от ROS, связанной с активацией NADPH-оксидазы. В качестве контрзащиты гриб может продуцировать молекулы антиоксидантов, которые противодействуют оксидантам, продуцируемым иммунными клетками [54, 55]. Фермент АОХ (альтернативная оксидаза), недавно описанный у *P. brasiliensis*, может участвовать в подобном механизме защиты [56]. По данным авторов, ингибирование нетоза с помощью АОХ позволяет грибу

уклониться от иммунной защиты хозяина. Подтверждено, что под действием DPI (diphenyleiodonium chloride) происходит ингибирование NETs. По другим данным, механизм уклонения от действия NETs может быть также связан с продукцией микробных нуклеаз, способных деградировать NETs, а также экспрессией некоторых молекул на мембране или клеточной стенке, препятствующих их действию [53]. Отметим, что образование NETs было выявлено при использовании двух штаммов *P. brasiliensis* с различной вирулентностью, однако их характеристики отличались. Авторы заключают, что белки, присутствующие в NET-структурах, могут иметь фунгистатический эффект в отношении дрожжевых клеток *P. brasiliensis*, возможно, путем ограничения выработки железа или кальция (лактоферрин и калпротектин соответственно) [54]. Тем не менее, недостаточно известно о реальном участии NETs в патогенезе ПКМ и защите от микоза, как и в механизмах уклонения гриба от иммунной защиты [58].

Таким образом, анализ современных публикаций свидетельствует о том, что нейтрофилы, а также некоторые другие типы иммунных клеток могут образовывать внеклеточные ловушки при инфицировании человека различными патогенными микроорганизмами, в том числе грибами. Наряду с действием факторов классического фагоцитоза, они участвуют в защите от распространения заболевания. Механизмы их протективности связаны с ДНК, антимикробными пептидами, ядерными и цитоплазматическими белками. Однако образование подобных структур *in vitro* и *in vivo* пока изучено лишь у нескольких грибных патогенов – *C. albicans*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *C. gattii* и *P. brasiliensis*. Они включаются в киллинг грибов, хотя последние обладают механизмом уклонения от их действия, т.е. после захвата в ловушки не погибают. Полагают, что за этот период происходит мобилизация других иммунных клеток, которые устремляются к месту инфицирования и подавляют рост грибов. Следовательно, две основные эффекторные функции внеклеточных ловушек – временный захват патогена, препятствующий его диссеминации в организме хозяина, и прямое антимикробное действие. В недавних работах показано, что в процесс образования внеклеточных ловушек при микозах включаются незначительное количество иммунных клеток – 1–5% [11, 40].

Несомненно, что процесс образования иммунными клетками человека внеклеточных иммунных ловушек как стратегия, дополняющая функции классического фагоцитоза, в настоящее время не подвергается сомнению. Тем не менее, многие вопросы относительно механизмов и эффективности их действия при микозах подлежат дальнейшему изучению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Steinberg B.E., Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci.* 2007; 379: 11.
2. Yipp B.G., Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013; 122: 2784–2794.
3. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann, C., et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2007; 176: 231–241.
4. Pilszczek F.H., Salina D., Poon K.K., et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 2010; 185:7413–7425.
5. Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010; 191: 677–691.

6. Воробьева Н.В., Пинегин Б.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, роль в норме и при патологии. Биохимия. 2014; №79: 1581-1591. [Vorobeva N.V., Pinegin B.V. Neytrofilnyie vnekletochnyie lovushki: mehanizmyi obrazovaniya, rol v norme i pri patologii. Biohimiya. 2014; №79: 1581-1591. (In Russ)]
7. Долгушин И.И., Маякова В.Б. Участие внеклеточных нейтрофильных ловушек в защитных и патологических реакциях организма. Российский иммунологический журнал. 2015; №9: 164-170. [Dolgushin I.I., Mayakova V.B. Uchastie vnekletochnyih neytrofilnyih lovushek v zaschitnyih i patologicheskikh reaktivnykh organizma. Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal. 2015; №9: 164-170. (In Russ)]
8. Кравцов А.Л. Роль нейтрофильных внеклеточных ловушек при особо опасных бактериальных инфекциях. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016; №4: 95-104. [Kravtsov A.L. Rol neytrofilnyih vnekletochnyih lovushek pri osobo opasnyih bakterialnyih infektsiyah. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. 2016; №4: 95-104. (In Russ)]
9. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010; 33: 657-670.
10. Amulic B., Cazalet C., Hayes G.L., et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30: 459-489.
11. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E., et al. Neutrophils sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nature immunology*. 2014; 15 (11): 1017-1025.
12. Byrd A.S., O'Brien X.M., Johnson C.M., et al. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J Immunol.* 2013; 190: 4136-4148.
13. Domenech M., Ramos-Sevillano E., Garcia E., et al. Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2013; 81: 2606-2615.
14. Walker J.N., Crosby H.A., Spaulding A.R., et al. The *Staphylococcus aureus* ArlRS two-component system is a novel regulator of agglutination and pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2013; 9 (12).
15. McAdow M., Kim H.K., DeDent A.C., et al. Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. *PLoS Pathog.* 2017; 10.
16. Prashar A., Bhatia S., Gigliozi D., et al. Filamentous morphology of bacteria delays the timing of phagosome morphogenesis in macrophages. *The Journal of Cell Biology*. 2013; 203 (6): 1081-1097.
17. Deretic V. Autophagy, an immunologic magic bullet: *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation block and how to bypass it. *Future Microbiol.* 2008; 3 (5): 517-524.
18. Simeone R., Bobard A., Lippmann J., et al. Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog.* 2012; 8 (2).
19. von Kockritz-Blickwede M., Goldmann O., Thulin P. et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*. 2008; 111: 3070-3080.
20. Cruse G., Fernandes V.E., de Salort J., et al. Human lung mast cells mediate pneumococcal cell death in response to activation by pneumolysin. *J. Immunol.* 2010; 184: 7108-7115.
21. Rodriguez A.R., Yu J.J., Guentzel M.N., et al. Mast cell TLR2 signaling is crucial for effective killing of *Francisella tularensis*. *J Immunol.* 2012; 188: 5604-5611.
22. Scheb-Wetzel M., Rohde M., Bravo A., Goldmann O. New insights into the antimicrobial effect of mast cells against *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 2014; 82: 4496-4507.
23. Urb M., Sheppard D.C. The role of mast cells in the defense against pathogens. *PLoS Pathog.* 2012; 8.
24. Inoue M., Shinohara M.L. Clustering of pattern recognition receptors for fungal detection. *PLoS Pathog.* 2014; 10.
25. Yang Z., Marshall J.S. Zymosan treatment of mouse mast cells enhances dectin-1 expression and induces dectin-1-dependent reactive oxygen species (ROS) generation. *Immunobiology*. 2009; 214: 321-330.
26. Wernersson S., Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14: 478-494.
27. Lin A.M., Rubin C.J., Khandpur R., et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *Journal of immunology*. 2011; 187 (1): 490-500.
28. Lopes J.P., Stylianou M., Nilsson G., Urban C.F. Opportunistic pathogen *Candida albicans* elicits a temporal response in primary human mast cells. *Scientific Reports*. 2015; 5.
29. Springer D.J., Chaturvedi V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16: 14-20.
30. Springer D.J., Ren P., Raina R., et al. Extracellular fibrils of pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions. *PLoS ONE*. 2010; 5 (6).
31. Urban C.F., Lourido S., Zychlinsky A. How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol.* 2006; 8: 1687-1696.
32. Wartha F., Beiter K., Albiger B., et al. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol.* 2007; 9: 1162-1171.
33. Hohl T.M., Feldmesser M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot Cell*. 2007; 6: 1953-1963.
34. Rubino I., Coste A., Le Roy D., et al. Species-specific recognition of *Aspergillus fumigatus* by Toll-like receptor 1 and Toll-like receptor 6. *J. Infect Dis.* 2012; 205: 944-954.
35. Sun H., Su X., Wu X.D., et al. Dectin-2 is predominately macrophage restricted and exhibits conspicuous expression during *Aspergillus fumigatus* invasion in human lung. *Cell Immunol.* 2013; 284: 60-67.
36. Carrion S.J., Shao H.T., Leal S.M., et al. The RodA hydrophobin on *Aspergillus fumigatus* spores masks dectin-1- and dectin-2-dependent responses and enhances fungal survival in vivo. *J. Immunol.* 2013; 191: 2581-2588.
37. Bruns S., Kniemeyer O., Hasenberg M., et al. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog.* 2010; 29.
38. Röhm M., Grimm M.J., D'Auria A.C., et al. NADPH oxidase promotes neutrophil extracellular trap formation in pulmonary aspergillosis. *Infect Immun.* 2014; 82: 1766-1777.
39. Gazendam R.P., Hamme J.L., Tool A.T., et al. Human neutrophils use different mechanisms to kill *Aspergillus fumigatus* conidia and hyphae: evidence from phagocyte defects. *Journal of Immunology*. 2016; 196 (3): 1272-1283.
40. Loures F.V., Röhm M., Lee C.K., Santos E., et al. Recognition of *Aspergillus fumigatus* hyphae by human plasmacytoid dendritic

- cells is mediated by dectin-2 and results in formation of extracellular traps. PLoS Pathog. 2015; 11 (2).
41. Colombo A.L., Tobón A., Restrepo A., et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America // Med Mycol. - 2011. - Vol. 49. - P. 785-798.
 42. Bousquet A., Dussart C., Drouillard I., et al. Imported mycosis: a review of paracoccidioidomycosis. Med Mal Infect. 2007; 3: 210-214.
 43. Mayayo E., López-Aracil V., Fernández-Torres B., et al. Report of an imported cutaneous disseminated case of paracoccidioidomycosis. Rev. Iberoam. Micol. 2007; 24 (1): 44-46.
 44. Alsharif M., Martin A.U., Shelton J.B., Pambuccian S.E. *Paracoccidioides brasiliensis* in a liquid-based Papanicolaou test from a pregnant woman: report of a case. Diagn Cytopathol. 2008; 36 (8): 557-560.
 45. Nicola A.M., Casadevall A., Goldman D.L. Fungal killing by mammalian phagocytic cells. Curr. Opin. Microbiol. 2008; 11 (4): 313-317.
 46. Bordon-Graciani A., Dias-Melicio L.A., Acorci-Valerio M.J., et al. Inhibitory effect of PGE 2 on the killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by human monocytes can be reversed by cellular activation with cytokines. Med Mycol. 2012; 50 (7): 726-734.
 47. Rodrigues D.R., Fernandes R.K., Balderramas H.A., et al. Interferon-gamma production by human neutrophils upon stimulation by IL-12, IL-15 and IL-18 and challenge with *Paracoccidioides brasiliensis*. Cytokine. 2014; 69 (1): 102-109.
 48. Balderramas H.A., Penitenti M., Rodrigues D.R., et al. Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1. Cytokine. 2014; 67 (1): 36-43.
 49. González A., Restrepo A., Cano L.E. Pulmonary immune responses induced in BALB/c mice by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. Mycopathologia. 2008; 165: 313-330.
 50. Dias M.F., Mesquita J., Filgueira A. L., De Souza W. Human neutrophils susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis*: an ultrastructural and cytochemical assay. Med Mycol. 2008; 46: 241-249.
 51. Rodrigues D.R., Dias-Melicio L.A., Calvi S.A., et al. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN- γ , TNF- α and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. Med Mycol. 2007; 45: 27-33.
 52. Tavian E.G., Dias-Melicio L.A., Acorci M.J., et al. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. Cytokine. 2008; 41: 48-53.
 53. Mejia S.P., Cano L.E., Lopez J.A., et al. Human neutrophils produce extracellular traps against *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbiology. 2015; 161: 1008-1017.
 54. Dantas A.S., Andrade R.V., de Carvalho M.J., et al. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*: assessing catalase and cytochrome c peroxidase. Mycol. Res. 2008; 12: 747-756.
 55. Maricato J.T., Batista W.L., Kioshima E.S., et al. The *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 antigen is encoded by a putative member of the flavoproteins monooxygenase family. Fungal Genet Biol. 2010; 47:179-189.
 56. Ruiz O.H., Gonzalez A., Almeida A.J., et al. Alternative oxidase mediates pathogen resistance in *Paracoccidioides brasiliensis* infection. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5.
 57. Urban C.F., Ermert D., Schmid M., et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. PLoS Pathog. 2009; 5.
 58. Della Coletta A.M., Bachiega T.F., de Quaglia J.C., et al. Neutrophil extracellular traps identification in tegumentary lesions of patients with paracoccidioidomycosis and different patterns of NETs generation in vitro. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2015; 9 (9).

Поступила в редакцию журнала 15.04.2017

Рецензент: Н.В. Шабашова



ЛАЗЕРОТЕРАПИЯ ОНИХОМИКОЗОВ (ОБЗОР)

**Корнишева В.Г. (профессор кафедры)*,
Шепило С.А. (аспирант)**

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

© Корнишева В.Г., Шепило С.А., 2017

Онихомикоз – распространенная инфекция ногтевых пластин, вызываемая в 89% случаев дерматомицетами. Применение системных антимикотиков ограничено риском серьезных побочных явлений. Необходимость в неинвазивной, эффективной альтернативной терапии привела к заинтересованности в исследовании лазерных методов лечения онихомикоза. В статье рассмотрены различные методы лазеротерапии этого заболевания.

Ключевые слова: лазеротерапия, онихомикоз, Nd: YAG-лазеры, длинноимпульсные Nd: YAG-лазеры, Q-switched лазеры, короткоимпульсные лазеры 1064 нм-Nd

LASER THERAPY OF ONYCHOMYCOSIS (REVIEW)

Kornisheva V.G. (professor of the chair), Shepilo S.A. (postgraduate student)

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

© Kornisheva V.G., Shepilo S.A., 2017

Onychomycosis is a common infection of the nail plates in 89% caused by dermatomycetes. The use of systemic antimicrobials is limited by the risk of serious side effects. The need for non-invasive, effective alternative therapy led to an interest in investigating of laser treatments of onychomycosis. The various laser methods of the onychomycosis treatment have been considered in this article.

Key words: laser therapy, onychomycosis, Nd: YAG-lasers, long-pulse Nd: YAG-lasers, Q-switched lasers, short-pulse lasers 1064 nm-Nd

Онихомикоз – распространенная инфекция ногтевых пластин, которой подвержено примерно 10% населения [1, 2]. Поражают ногти дерматомицеты, дрожжи и нитчатые недерматомицеты. В 89% онихомикоз вызывают дерматомицеты, из них наиболее распространенными патогенами в Российской Федерации являются *Trichophyton rubrum* и *T. mentagrophytes* [3, 4]. Онихомикоз не всегда является косметической проблемой, например, у больных сахарным диабетом он может привести к серьезным осложнениям, таким как остеомиелит и целлюлит [5]. Лечение онихомикоза длительное, захватывает несколько месяцев и зависит, с одной стороны, от степени поражения ногтей, с другой – от скорости роста ногтевых пластин. Наиболее эффективный метод терапии – назначение пероральных антимикотиков. Определение излечения онихомикоза не всегда точно, например, по мнению R.K. Scher и соавторов [6], – это 100% отсутствие клинических признаков онихомикоза (без наличия отрицательных результатов микологического исследования); или отрицательные микологические данные исследования ногтевых чешуек в сочетании с одним из следующих клинических признаков: 1) дистальный подногтевой гиперкератоз или онихолизис, захватывающие менее 10% ногтевой пластины, или 2) утолщение ногтевой пластины, которое не разрешается после антимикотического лечения из-за наличия сопутствующего заболевания. Авторы отдают предпочтение клиническим данным перед результатами микологического исследования, учитывая частоту получения ложных отрицательных ответов. Критериями для «неизлеченного» онихомикоза считают наличие положительных микологических результатов или любой из следующих четырех клинических признаков, даже при наличии отрицательных микологических ответов: 1) вызванные дерматомицетами изменения ногтевой пластины, пораженной более чем на 10%; 2) бело-желтые или оранжево-коричневые пятна или полосы в теле ногтя или под ним; 3) боковой онихолизис с подногтевым гиперкератозом или 4) гиперкератоз с латерального края ногтевой пластины / ногтевого валика [6]. Применение системных антимикотиков ограничено риском серьезных побочных явлений, таких как гепатотоксичность и потенциальные лекарственные взаимодействия, особенно у пациентов с сопутствующими заболеваниями. При лечении онихомикоза антимикотики часто неэффективны в связи с их неспособностью проникать в ногтевую пластину [5]. Заболевание остается проблемой для терапии из-за потенциальных побочных эффектов системной терапии. Частота рецидивов колеблется от 21% для тербинафина до 39% для итраконазола в зависимости от схемы назначения антимикотика при наблюдении в течение 48 недель после излечения [7]. Необходимость в усовершенствовании местной терапии привела к применению аппаратных методов лечения онихомикоза. Есть четыре категории аппаратов для такого рода процедур: лазерные устройства, фотодинамическая терапия, электрофорез и ультразвук, которые используют в комбинации с местными антимикотическими средствами. Такое комбинированное лечение позволяет избежать побочных эффектов, связанных с системной антимикотической терапией [8]. Лазерные медицинские устройства основаны на ранее существовавших устройствах, применяемых в эстетической медицине

* Контактное лицо: Корнишева Вера Гавриловна, Тел.: (812) 303-51-47

при ониходистрофии, а не на основе данных клинических испытаний. Полученные положительные результаты были неверно истолкованы, поэтому нельзя считать, что лазеры являются вариантом лечения онихомикоза [9].

Небольшие исследования по применению лазеров в терапии онихомикоза показали многообещающие результаты [10-16] (табл.), но механизм действия остается неясным [5]. Фунгицидное действие лазеров обусловлено фототермическим нагреванием мицелия гриба путем выборочного фототермолиза [17].

В состав клеточной стенки мицелия входит хитин, который медленно рассеивает и накапливает тепло, вследствие чего в пределах грибов повышается температура, чем обеспечивается фунгицидное действие [17]. Наличие в клетке гриба хромофоров (хитин, ксантомегнин и меланин) – это дополнительный способ, который может быть использован лазерами для обеспечения фунгицидного действия [17, 18]. Температура, необходимая для создания фунгицидного эффекта, составляет 50 °С. Температура свыше 45 °С приводит к боли и некрозу тканей у человека [19, 20]. Чтобы эффективно происходило накопление тепла внутри грибной клетки и одновременно не нарастали боль и некроз окружающих тканей, длительность импульса должна быть короче, чем тепловое время релаксации гриба [9].

Длина волны лазера должна быть такой, чтобы, с одной стороны, воздействовать избирательно на воздействовать на грибы, с другой – быть в состоянии проникнуть в ногтевую пластину [9]. Длина волны 415 нм может соответствовать митохондриальному цитохрому С грибов и действовать на них губительно, но на этой длине проникновение луча через ногтевую пластину невозможно. Длины проникающих в ногтевую пластину волн лазеров – от 750 до 1300 нм [15].

Для получения селективного фототермолитического эффекта при лечении онихомикоза существует не-

сколько параметров лазера, которые должны быть откалиброваны для поддержания быстрого накопления и ограничения тепла в грибах, сохраняя при этом температуру в ногтевой пластине ниже болевого порога и не вызывая некроз кожи (45 °С) [27]. Эти параметры включают длину волны, формат пространственных и временных импульсов, пиковую и среднюю мощность, энергию импульса и размер пятна лазерного луча [9, 28].

Длина волны света – это первичный лазерный параметр, необходимый для успешного избирательного фототермолиза. При разработке лазеров для лечения онихомикоза требуется проведение изучения спектров поглощения света дерматомицетами [9].

Временной интервал между структурированными импульсами должен быть достаточно длинным, чтобы позволить рассеиванию тепла в коже, предотвратить некроз и боль, но достаточно коротким, чтобы обеспечить постепенное тепловое накопление в грибной мишени. Дермальные клетки обладают более теплопроводящей клеточной мембраной и более высоким содержанием воды, чем грибы, поэтому они имеют более высокие теплоемкость и теплопроводность, чем грибные клетки [9]. При правильном временном промежутке импульсов, по мере того, как наступают следующие компоненты импульсов, внутренняя температура гриба увеличивается кумулятивно, а температура окружающей ткани остается близкой к ее базовым показателям. Большинство лазерных систем, используемых в клинических исследованиях, имеют более длинные импульсы, чем время релаксации грибов [9]. Это приводит к объемному нагреву всей области обработки, что не оптимально для лечения онихомикоза, и является основной причиной, по которой эти лазерные устройства проявляют низкую эффективность и могут вызывать значительную боль [22-25].

Проанализирована антимикотическая эффективность лечения онихомикоза в зависимости от количе-

Таблица

Микологическая эффективность применения лазера при онихомикозе

Авторы	Тип лазера	Количество ногтевых пластин	T- длительность импульсов лазера	Плотность энергии (J/cm ²)	T x J/cm ² К-во тепла, выделенного лазером на см ² (Q/ cm ²)	К-во сеансов/ интервал между сеансами	Длительность наблюдения	% микологического выздоровления
Kozarev, et al [12]	Long pulse Nd: YAG Laser	162	35 мс	35-40	1400	4/1 нед.	12 мес.	100
Carney, et al [19]	submillisecond Nd: YAG	14	0,3 мс	16	4,8	1/0	4 нед.	29
Hollmig, et al [21]	Longpulse Nd: YAG Laser	27	0,3 мс	5	1,5	4/4-6 нед.	12 мес.	33
Hochman [13]	0.65-millisecond pulsed Nd: YAG	8	0,65 мс	223	145	3/3 нед.	4-6 мес.	87,5
Renner, et al [22]	1,064-nm diode laser	24	80 мс	5,1	408	2-3/8 нед.	1,8-7,2 мес.	25
Rivers, et al [23]	1064nm Nd: YAG	199	0,3 мс	14-17	5,1	2/4 нед.	1-3 мес.	0
Noguchi, et al [24]	long-pulsed Nd: YAG 1 064 nm	12	0,5 мс	10	5	3/4 нед.	6 мес.	0
Kaalokasidis, et al [14]	Q-switched Nd: YAG 1 064 nm	131	90 мс	14	1260	2/1 мес.	3 мес.	95,4
Li, et al [15]	long -pulse Nd: YAG	112	35 мс	50	1750	8/1 нед.	6 мес.	63,9
Hees, et al [25]	long-pulsed Nd: YAG 1 064 nm	10	40 мс	50	2000	2/4 нед.	-	20
Wanitaphakdeedecha, et al [26]	long-pulsed Nd: YAG 1 064 nm	64	35 мс	45	1225	4 или 8/1 нед.	7,2 мес.	51,9
Okan, et al [16]	long-pulsed Nd: YAG 1 064 nm	15	35 мс	60	2100	4/1 нед.	9 мес.	60

ства тепла, выделенного лазером на 1 см^2 (табл.). В 5 цитированных работах [12, 14-16, 26] из шести процент микологического излечения выше 50% соответствовал количеству тепла от 1225 до 2100 Q/cm^2 . Только у Н. Hees и соавторов [25] при использовании в терапии 10 ногтевых пластин длинноимпульсового неодимового лазера (2 сеанса через 4 недели) при 2000 Q/cm^2 микологическая санация составила 20%. После окончания терапии J.K.Rivers Н. Noguchic с соавторами [23, 24] при сроке наблюдения за больными до 6 месяцев не получили микологического излечения ни одной ногтевой пластины. Количество тепла, выделенного лазерами на 1 см^2 , было низким (5,1, 5,0). Таким образом, антимикотическая эффективность терапии достигалась объемным нагревом пораженных ногтей.

Глубина проникновения лазерного импульса, объем облученной ткани и уменьшение побочных эффектов обусловлены форматом пространственного луча. Эффективная глубина проникновения и объем облучаемой ткани зависят как от размера пятна, так и от формы луча. Энергетическая плотность – это интегрированная по времени мощность лазерного излучения на единицу площади обрабатываемого пятна, его единицы составляют J/cm^2 .

При исследованиях *in vitro* с использованием коммерчески доступных лазеров получены неоднозначные результаты. M.J. Choi и соавторы [29] изучали антимикотическую активность лазеров Nd:YAG на 1444 нм при ониомикозе с помощью сканирующей электронной микроскопии и выявили, что грибы в ногтевых пластинах разрушались после облучения.

Y.R. Kim и соавторы [30] после облучения пораженных ногтей Nd: YAG-лазером отмечали рост грибов *T. rubrum*. Авторы считают, что отсутствие антимикотического эффекта обусловлено низкой температурой (ниже $48\text{ }^\circ\text{C}$) в тканях.

Несмотря на то, что лазеротерапию применяют для лечения ониомикоза, однако механизм ее действия до конца не изучен, отчасти из-за отсутствия хорошо продемонстрированной фунгицидной активности в надежной модели *in vitro*. T.V. Vila и соавторы [31] разработали модель *in vitro* для определения фунгицидной активности лазеротерапии при ониомикозах с применением биопленок, образованных *in vitro*, на стерильных фрагментах человеческих ногтей. Авторы считают, что модель может стать важным инструментом для первоначального тестирования, проверки и «тонкой настройки» лазеров при лечении ониомикоза.

Дополнительные действия лазера могут включать фотохимические, фотоакустические и фотомеханические эффекты – полезные вторичные эффекты в дерматологических лазерах [9]. Под влиянием лазера повышается выработка NO_2 , что приводит к увеличению кровоснабжения в конечностях и активизирует иммунную систему [32]. После облучения в тканях повышается образование свободных кислородных радикалов, что создает токсичную среду для жизнедеятельности грибов [32]. Y.R. Kim и соавторы [30] получили 100% излечение при белом поверхностном ониомикозе и 50% – при дистально-латеральном поверхностном ониомикозе. При тотальной дистрофической форме заболевания микологическое излечение не было достигнуто ни в одном случае. Это является показателем того, что оценку эффективности терапии

следует проводить с учетом формы ониомикоза. В настоящее время для его лечения используют следующие неодимовые лазеры (Nd:YAG): 1) длинноимпульсные; 2) короткоимпульсные; 3) Q-switched Nd: YAG-лазеры.

Длинноимпульсные Nd: YAG-лазеры. Длительность импульса у этих лазеров находится в миллисекундном диапазоне. Этот тип лазеров может вызывать высокую степень неспецифического нагрева тканей, что требует использования системы охлаждения. В таблице из 12 приведенных статей в семи работах авторы применяли для лечения длинноимпульсные Nd: YAG-лазеры [12, 15, 16, 21, 24-26] со следующими характеристиками оборудования: длина волны 1064 нм, плотность энергии -35-60 [12, 15,16, 25, 26], 5 [21] и 10 [24] Дж/см^2 , разная длительность импульса (0,3 мс [21] 0,5 мс [24], 35 мс [12, 15, 16, 26], 40 мс [25]). Количество сеансов лазеротерапии было различным: 2 сеанса [25], 3 сеанса [24], 4 сеанса [12, 16, 21, 26], 8 [15] с интервалами в 1 неделю [12, 15, 16, 26] или 4 недели [21, 24, 25].

Микологическое излечение более чем половины пролеченных ногтевых пластин достигнуто в 4-х работах [12, 15, 16, 26] (у 57% исследователей). Отсутствие saniрующего эффекта лазера отмечено в одной работе [24].

Короткоимпульсные лазеры имеют длительность импульса в микросекундном диапазоне. Роль короткоимпульсного лазера 1064 нм-Nd:YAG в лечении ониомикоза остается предметом спорной дискуссии. S. Karsai и соавторы [33] провели проспективное рандомизированное контролируемое пилотное исследование, где проанализировали влияние короткоимпульсного 1064 нм-Nd:YAG-лазера на скорость микологической ремиссии. У 20 пациентов (82 пораженных ногтевых пластин стоп) выполнено четыре лазерных сеанса с интервалом от 4 до 6 недель. Срок наблюдения – 12 месяцев. Микологического излечения не получено ни у одного больного. Таким образом, короткоимпульсный лазер 1064 нм-Nd: YAG не проявляет эффективности, поэтому его целесообразно применять как монотерапию.

Q-switched Nd: YAG-лазеры имеют высокие энергии максимального импульса. E.Vural и соавт. [34] при исследовании *in vitro* выявили влияние различных длин волн лазера и энергетической плотности на *T. rubrum*. Авторы получили статистически значимое ингибирование роста колоний *T. rubrum*, обработанных Q-switched лазером (длина волны: 1064 нм, энергетическая плотность – 4 и 8 J/cm^2 и длина волны: 532 нм, энергетическая плотность – 8 J/cm^2 , размер пятна – 2 мм). При фотометрическом анализе установлено, что после 3 и 6 дней был значительно более медленный рост обработанных колоний, по сравнению с необработанными. K. Kaalokasidisk и соавторы [14] после клинического исследования, включающего лечение 131 ногтевой пластины с помощью Q-switched лазера 1064 нм/532 нм (2 сеанса через месяц) пришли к заключению, что ониомикоз можно эффективно и безопасно лечить с помощью этого типа лазера, так как через 3 месяца после окончания терапии микологическое излечение было достигнуто в 95,4% случаев.

Для усиления антимикотического эффекта в настоящее время при лечении ониомикоза используют две лазерные технологии: Q-Switched 1064/532 нм и длин-

ноимпульсный Nd:YAG: 1064 нм лазер. В начале процедуры проводят терапию Q-Switched 1064/532 нм лазером, затем подключают лазерную насадку с Nd:YAG: 1064 нм лазером, который вызывает неспецифический прогрев свыше 40 °C [11].

Лазерные системы для лечения онихомикозов включают, помимо неодимового лазера, СО₂-лазеры и лазеры с режимом блокировки (комбинацию 870/930 нм и фемтосекундные инфракрасные 800-нм лазеры) [35]. Лазеры с режимом блокировки – это фемтосекундные (fsec) инфракрасные титановые сапфировые лазеры, которые при фокусировании из-за нелинейных взаимодействий с биологическими средами способны избирательно доставлять энергию [36]. Они излучают 200-fs длины импульсы при частоте 76 МГц на ближней инфракрасной длине волны 800 нм и имеют самую высокую энергию и самую короткую длительность импульса. Z. Manevitch и соавторы [37] при использовании фемтосекундного инфракрасного титанового сапфирового лазера с режимом блокировки выявили его антимикотическое действие *in vitro* на *T. rubrum*.

Для лечения онихомикозов A.S. Landsman и соавторы [38] с успехом использовали двухдиапазонный ближне-инфракрасный диодный лазер, работающий при физиологических температурах, которые являются термически безопасными для ткани человека, и использующий только ближний инфракрасный свет с длиной волн 870 и 930 нм с фотоэффектным воздействием на грибы. При терапии онихомикоза применение в импульсном режиме диодного лазера с разрешением 1,064 нм обеспечивает приемлемые результаты с минимальным побочным действием [22] (табл.).

Разработанную фракционную технологию с использованием СО₂-лазера с максимальным аблятивным эффектом применяют в качестве первичного лечения онихомикоза или дополнения к наружным антимикотикам [36]. A.K. Bhatta и соавторы [39] для оценки клинической эффективности фракционной терапии СО₂-лазера в сочетании с местным тербинафиновым кремом провели 75 пациентам (356 пораженных гри-

бами ногтей) 3 сеанса лазерной терапии с 4-недельными интервалами в течение 3 месяцев и показали ее эффективность. Однако авторы считают, что прежде, чем этот метод широко использовать в клиниках, необходимы рандомизированные клинические исследования.

Побочными действиями лазеротерапии при онихомикозе являются ощущение жара, покалывания и боли во время сеанса [9, 40]. Цель лазерной терапии заключается в нагревании ногтевого ложа до температур, необходимых для разрушения роста грибов (приблизительно 40-50 °C) и, в то же время, нужно избежать боли и некроза окружающих тканей [9, 39]. Однако перегрев может привести к потере ногтей. Поэтому не рекомендуют применение анестезии, чтобы больной мог чувствовать повышенную температуру и боль, заставляя оператора остановиться на несколько секунд. Это позволит рассеять тепло [20]. Чтобы уменьшить боль и избежать повреждения кожи, формат лазерной энергии должен быть либо импульсным, чтобы расщеплять, либо доставляться на умеренном энергетическом уровне для предотвращения повреждения ткани [20]. Пациентам необходимо знать об этом побочном действии лазеротерапии, а клиницисты должны научиться минимизировать риск побочных эффектов, избавляя больного от возможного и необратимого повреждения ногтей. Требуются дальнейшие исследования для определения наиболее безопасных и наиболее эффективных параметров лечения.

Несмотря на наличие положительных результатов лазерных исследований, лазеротерапия не может быть рекомендована как первая линия лечения онихомикоза. Этот вид терапии временно способствует росту прозрачной ногтевой пластины, но не устраняет полностью грибы в теле ногтя. На сегодняшний день при онихомикозе стоп лазерные исследования предоставляют предварительные доказательства клинического улучшения и явный рост прозрачных ногтей. Дополнительные, хорошо проведенные клинические испытания должны быть выполнены для того, чтобы определить истинную эффективность лазеров в лечении онихомикоза [9, 20, 32, 39].

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева Н.В., Разнатовский К.И. и др. Этиология онихомикоза стоп в г. Санкт-Петербурге и г. Москве. Результаты проспективного открытого многоцентрового исследования. Проблемы мед. микологии. 2009; 11 (2): 14-18. [Vasileva N.V., Raznatovskiy K.I. i dr. Etiologiya onihomikoza stop v g. Sankt-Peterburge i g. Moskve. Rezultaty prospektivnogo otkryitogo mnogotsentrovogo issledovaniya. Problemy med. mikologii. 2009; 11 (2): 14-18. (In Russ)]
2. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. М.: ООО «Бином-пресс», 2008: 440 с. [Sergeev A.Yu., Sergeev Yu.V. Gribkovyie infektsii. Rukovodstvo dlya vrachev. M.: ООО «Binom-press», 2008: 440 s. (In Russ)]
3. Васенова В.Ю., Бутов Ю.С. Современный взгляд на терапию онихомикозов. Фарматека. 2017: 8-11. [Vasenova V.Yu., Butov Yu.S. Sovremennyy vzglyad na terapiyu onihomikozov. Farmateka. 2017: 8-11. (In Russ)]
4. Кубасова Н.Л. и соавт. Особенности диагностики и лечения онихомикоза стоп, обусловленного нитчатными недерматомицетами и дрожжами. Проблемы мед. микологии. 2010; 12 (3): 25-28. [Kubasova N.L. i soavt. Osobennosti diagnostiki i lecheniya onihomikoza stop, обусловленного нитчатными недерматомицетами и дрожжами. Problemy med. mikologii. 2010; 12 (3): 25-28. (In Russ)]
5. Ortiz A.E., et al. A Review of lasers and light for the treatment of onychomycosis. Lasers in Surgery and Medicine. 2014; 46: 117-124.
6. Scher R.K., et al. Onychomycosis: diagnosis and definition of cure. J. Am. Acad. Dermatol. 2007; 56 (6): 939-944.
7. Gupta A.K., Cooper E.A., Paquet M. Recurrences of dermatophyte toenail onychomycosis during long-term follow-up after successful treatments with mono- and combined therapy of terbinafine and itraconazole. J. Cutan. Med. Surg. 2013; 17 (3): 201-206.
8. Корнишева В.Г. Фотодинамическая терапия онихомикоза (обзор). Проблемы мед. микологии. 2015; 17 (1): 3-7. [Kornisheva V.G. Fotodinamicheskaya terapiya onihomikoza (obzor). Problemy med. mikologii. 2015; 17 (1): 3-7. (In Russ)]
9. Gupta A.K., Simpson F.C., Heller D.F. The future of lasers in onychomycosis. J. Dermatol. Treat. 2016; 27 (2): 167-172.
10. Олисова О.Ю., Пинсон И.Я., Акмаева А.Р. Лазерные технологии в лечении онихомикозов. рмж. 2014; 8: 635-636. [Olisova

- O.Yu., Pinson I.Ya., Akmaeva A.R. Lazernye tehnologii v lechenii onihomikozov. RMZh. 2014; 8: 635-636. (In Russ)]
11. Рубинова Е.И. Применение лазера длиной волны 1064 нм в условиях поликлинического приема. перспектива метода и показания к применению. Успехи медицинской микологии. 2014; XIII: 155-160. [Rubinova E.I. Primenenie lazera dlinoy volnyi 1064 nm v usloviyah poliklinicheskogo priema. perspektiva metoda i pokazaniya k primeneniyu. Uspehi meditsinskoj mikologii. 2014; XIII: 155-160.(In Russ)]
 12. Kozarev J. Clear Steps – laser onychomycosis treatment: assessment of efficacy 12 months after treatment and beyond. J. Laser Health Acad. 2011: S07.
 13. Hochman L.G. Laser treatment of onychomycosis using a novel 0,65-millisecond pulsed Nd:YAG 1064-nm laser. J. Cosmet. Laser Ther off Publ Eur Soc Laser Dermatol. 2011; 13 (1): 2-5.
 14. Kalokasidis K., et al. The effect of Qswitched Nd:YAG 1064 nm/532 nm laser in the treatment of onychomycosis in vivo. Dermatol. Res. Pract. 2013.
 15. Li Y., et al. Comparison of the efficacy of long-pulsed Nd:YAG laser intervention for treatment of onychomycosis of toenails or fingernails. J. Drugs Dermatol. 2014; 13 (10): 1258-63.
 16. Okan G., et al. The Effect of long-pulsed Nd:YAG Laser for the treatment of onychomycosis. J. Am. Podiatr. Med Assoc. 2017; 107 (1): 54-59.
 17. Lahiri K., De A., Sarda A. Textbook of lasers in dermatology. 1st ed. Jaypee Brothers Medical Publishers. 2016; 249-253.
 18. Vural E., et al. The effects of laser irradiation on *Trichophyton rubrum* growth. Lasers Med Sci. 2008; 23 (4): 349-53.
 19. Carney C., et al. Treatment of onychomycosis using a submillisecond 1064-nm neodymium: yttrium-aluminum-garnet laser. J. Am. Acad. Dermatol. 2013; 69 (4): 578-582.
 20. Helou J., et al. Laser treatment of onychomycosis: beware of ring block anesthesia. Lasers Med. Sci. 2015.
 21. Hollmig S.T., et al. Lack of efficacy with 1064-nm neodymium:yttrium-aluminum-garnet laser for the treatment of onychomycosis: A randomized, controlled trial. J. Am. Acad. Dermatol. 2014: 911-917.
 22. Renner R., Grüsser K., Sticherling M. 1,064-nm diode laser therapy of onychomycosis: results of a prospective open treatment of 82 toenails Dermatology. 2015; 230 (2):128-34.
 23. Rivers J. K., et al. Efficacy and safety of 1064-nm Nd:YAG laser in treatment of onychomycosis. J. of Cutaneous Medicine and Surgery. 2016.
 24. Noguchi H., et al. Treatment of onychomycosis using a 1064nm Nd:YAG laser Med Mycol J. 2013;54(4):333-9.
 25. Hees H., Jäger M.W., Raulin C. Treatment of onychomycosis using the 1 064 nm Nd:YAG laser: a clinical pilot study. J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. 2014; 12 (4): 322-9.
 26. Wanitphakdeedecha R., et al. Efficacy and safety of 1064-nm Nd:YAG laser in treatment of onychomycosis. J. Dermatolog. Treat. 2016; 27 (1): 75-9.
 27. Essien J.P., et al. Heat resistance of dermatophyte's conidiospores from athletes kits stored in Nigerian University Sport's Center. Acta. Microbiol. Immunol. Hung. 2009; 56: 71-9
 28. Patil U.A., Dhami L.D. Overview of lasers. Indian J. Plast. Surg. 2008; 41: S101.
 29. Choi M.J., et al. Antifungal effects of a 1444-nm neodymium:Yttrium-aluminum-garnet laser on onychomycosis: a pilot study. J. Dermatol. Treat. 2014; 25(4): 294-297.
 30. Kim Y.R. et al. Lack of antifungal effect of 1,064nm long pulse Nd:YAG laser on the growth of *Trichophyton rubrum*. Lasers Med. Sci. 2014; 30: 18-20.
 31. Vila T.V., Rozental S., de Sa Guimaraes C.M. A new model of in vitro fungal biofilms formed on human nail fragments allows reliable testing of laser and light therapies against onychomycosis. Lasers Med. Sci. 2015; 30 (3): 1031-1039.
 32. Francuzik W., Fritz K., Salavastru C. Laser therapies for onychomycosis - critical evaluation of methods and effectiveness. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2016: 937-942.
 33. Karsai S., et al. Treating onychomycosis with the short-pulsed 1064-nm-Nd:YAG laser: results of a prospective randomized controlled trial. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2017; 31(1): 175-180.
 34. Vural E., et al. The effects of laser irradiation on *Trichophyton rubrum* growth. Lasers Med. Sci. 2008; 23 (4): 349-53.
 35. Ledon J.A., et al. Laser and light therapy for onychomycosis: a systematic review. Lasers Med. Sci. 2014; 29 (2): 823-9.
 36. Bhatta A.K., et al. Laser treatment for onychomycosis: a review. Mycoses. 2014; 57 (12): 734-40.
 37. Manevitch Z., et al. Direct antifungal effect of femtosecond laser on *Trichophyton rubrum* onychomycosis. Photochem. Photobiol. 2010; 86: 476-9.
 38. Landsman A.S., et al. Treatment of mild, moderate, and severe onychomycosis using 870- and 930-nm light exposure. J. Am. Podiatr. Med. Assoc. 2010; 100: 166-77.
 39. Bhatta A.K. et al. Fractional carbon-dioxide (CO2) laser-assisted topical therapy for the treatment of onychomycosis. J. Am. Acad. Dermatol. 2016; 74(5): 916-23.

Поступила в редакцию журнала 28.08.2017

Рецензент: А.А. Степанова



МЕНИНГИТЫ, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ *RHODOTORULA* *MUCILAGINOSA*: КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ И ОБЗОР

¹ Борзова Ю.В. (зав. микологической клиникой, ассистент кафедры)*, ¹ Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ² Артемьева М.Н. (врач-инфекционист), ¹ Попова В.В. (студент), ¹ Тимирбаева О.Ю. (студент), ¹ Климко Н.Н. (зав. кафедрой), ¹ Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой)

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

© Коллектив авторов, 2017

Инфекции, обусловленные Rhodotorula spp., относят к редким микозам. Тем не менее, в последнее время все чаще выявляют данные осложнения у иммунокомпрометированных пациентов. В статье описан случай микотического менингита у ВИЧ-инфицированной больной.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, микотический менингит, *Rhodotorula spp.*

RHODOTORULA MUCILAGINOSA ASSOCIATED MENINGITIS: A CASE REPORT AND REVIEW

¹ Borzova Y.V. (head of the mycological clinic, assistant of the chair), ¹ Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ² Artemieva M.N. (infectiologist), ¹ Popova V.V. (student), ¹ Timirbaeva O.Y. (student), ¹ Klimko N.N. (head of the chair), ¹ Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the chair)

¹ North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology, Chair of Medical Microbiology, Chair of Clinical Mycology, Allergy and Immunology; ² Clinical hospital named after S.P. Botkin, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2017

Infections caused by Rhodotorula spp. carry to rare mycoses. However, in recent years, increasingly identify these complications in immunocompromised patients. The case of mycotic meningitis in HIV-infected patient has been described in the article.

Key words: HIV-infection, mycotic meningitis, *Rhodotorula spp.*

За последние десятилетия микотические заболевания (микозы) стали серьезной клинической проблемой, их количество прогрессивно возрастает во всем мире [1], основные возбудители – *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp. и *Candida* spp. [2]. Однако в последние годы наблюдают расширение спектра возбудителей тяжелых оппортунистических инфекций, появление новых этиологически значимых агентов, ранее считавшихся непатогенными для человека. Количество публикаций, посвященных проблеме редких микозов, ограничено.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Описан клинический случай менингита, вызванного *Rhodotorula* spp., у ВИЧ-инфицированной больной. Для постановки диагноза инвазивного микоза применяли клинические и лабораторные критерии, разработанные ESCMID и ЕСММ (2008) [2]. Авторы провели также анализ данных из научной литературы в базах PubMed (на май 2017 г.).

При поиске информации использовали следующие ключевые слова: *mycotic meningitis, fungal meningitis, central nervous system infection, Rhodotorula spp., immunosuppressed patient, AIDS.*

Описание клинического случая

Пациентка К., 32-х лет, поступила в инфекционную больницу в феврале 2017 г. Из анамнеза известно, что на момент госпитализации женщина в течение десяти лет употребляла психотропные вещества. В 2009 г. у нее была верифицирована ВИЧ-инфекция, уровень CD4+ на момент установления диагноза составил 79 клеток в мл. В связи с асоциальным образом жизни пациентка не наблюдалась у инфекциониста, антиретровирусную терапию не получала. В марте 2016 г. у больной диагностирован диссеминированный туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью, с поражением легких, периферических лимфоузлов и мочевыделительной системы. Лечение получала амбулаторно, не в полном объеме, самостоятельно прервала терапию туберкулеза и ВИЧ-инфекции в январе 2017 г.

Ухудшение состояния пациентка отмечала с января 2017 г. – повысилась температура тела до фебрильных значений, появилась головная боль, в связи с чем 09.02.17 г. больная была госпитализирована в инфекционную клинику.

При поступлении: состояние больной средней тяжести, сознание ясное, температура тела 38,6 °С, предъявляла жалобы на головную боль, тошноту, повторную рвоту, онемение левой половины лица. Объективно при осмотре имели место общая слабость, менингеальные симптомы – общая гиперестезия, ригидность затылочных мышц, положительный симптом Кернига, парез левой половины лица. Кожа обычной окраски, множественные следы инъекций на конечностях. На слизистой оболочке мягкого неба и полости рта наблюдали налеты белого цвета. Над легочными полями дыхание жесткое, проводится по всем полям, хрипов нет. ЧДД – 16 в 1 минуту. Тоны сердца звучные, ритм правильный. Артериальное давление – 120/80 мм рт. ст. Частота сердечных сокращений – до 96 в минуту. Живот при пальпации безболезненный. Печень и селезенка не увеличены.

При обследовании клинический анализ крови от 09.02.17 г.: Нб – 125 г/л, эр. – 4,4·10¹²/л, лейкоц. – 4,9·10⁹/л,

* Контактное лицо: Борзова Юлия Владимировна, e-mail: Yuliya.Borzova@s zgmu.ru

тр. – $170 \cdot 10^9/\text{л}$, лимф. – 40%, нейтроф. – 44,5%, мон. – 11,5%, СОЭ – 17 мм/час. Количество CD4+ клеток в периферической крови от 10.02.17 г. составляло 298 в мкл. Вирусная нагрузка HIV – 400 000 копий РНК вируса в мкл. Спинномозговая жидкость, полученная при люмбальной пункции от 11.02.17 г., была бесцветная, слабо мутная, белок – 3,0 г/л, цитоз – $720/3 = 240 \cdot 10^6/\text{л}$ (лимф. – 94%, нейтроф. – 2%, мон. – 2%, макрофаги – 2%), глюкоза – 1,81 ммоль/л.

При МРТ головного мозга от 13.02.17 г. данных за наличие острых ишемических, геморрагических или объемных поражений головного мозга не отмечено, выявлены начальные проявления внутренней заместительной гидроцефалии. КТ органов грудной полости от 15.02.17 г.: мелкоочаговая диссеминация по всем легочным полям, внутригрудная лимфаденопатия. При микроскопическом исследовании спинномозговой жидкости от 13.02.17 г. обнаружены дрожжевые почкующиеся клетки (Рис. 1). При посеве получен рост окрашенных дрожжеподобных грибов в титре 10^3 КОЕ/мл, идентифицированных с помощью MALDI-TOFF как *Rhodotorula mucilaginosa* (Рис. 2). Культура была резистентна к флуконазолу, умеренно чувствительна к вориконазолу.

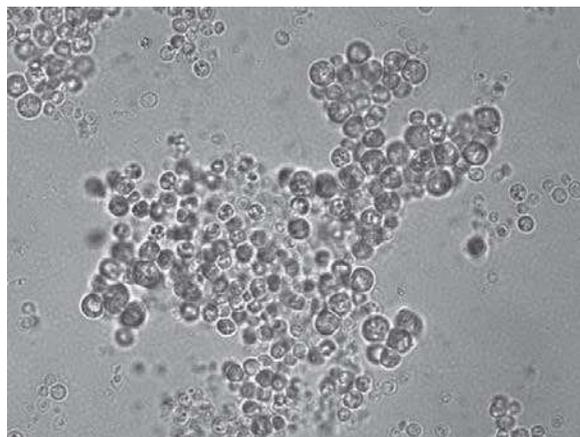


Рис. 1. Мазок из культуры. Показаны сферически почкующиеся дрожжевые клетки *Rhodotorula mucilaginosa* (окраска по Граму, $\times 400$)



Рис. 2. Мягкие оранжевые мукоидные колонии *Rhodotorula mucilaginosa* на декстрозном агаре Сабуро после 48 часов инкубации

Учитывая недостаточно эффективную схему противотуберкулезной химиотерапии на догоспитальном этапе, прекращение антиретровирусной терапии и данные компьютерной томографии органов грудной полости, клинические проявления были расценены как прогрессия туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью и развитием туберкулезного менингоэнцефалита. Наличие *R. mucilaginosa* квалифицировали как контаминацию. Восстановлены высокоактивная антиретровирусная (ВААРТ) и противотуберкулезная терапия в полном объеме – 4 противотуберкулезный режим: циклосерин, парааминосалициловая кислота, протионамид, пипразинамид, капреомицин, левофлоксацин, канамицин. Несмотря на проводимое лечение, у больной нарастали проявления менингоэнцефалита, сохранялись лихорадка, головная боль, менингеальные симптомы. По данным люмбальной пункции от 11.03.17 г.: спинномозговая жидкость – бесцветная, прозрачная, белок – 1,85 г/л, цитоз – $880/3 = 293 \cdot 10^6/\text{л}$ (лимф. – 87%, нейтроф. – 10%, мон. – 3%), глюкоза – 1,62 ммоль/л. При повторном посеве от 03.03.17 г. на среду обогащения (бульон Сабуро) получен рост *R. mucilaginosa*.

На основании данных анамнеза, клинической симптоматики, прогрессии инфекционного процесса на фоне высокоактивной антиретровирусной (ВААРТ) и противотуберкулезной терапии в полном объеме, результатов проведенного обследования был диагностирован менингоэнцефалит, обусловленный *R. mucilaginosa*, ВИЧ-инфекция 4 В стадия, прогрессия на фоне отсутствия противовирусной терапии, диссеминированный туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (туберкулез легких, бронхопневмонарных и периферических лимфоузлов, мочеполовой системы). Пациентке начато лечение Амфотерицином В 1 мг/кг/сут внутривенно в течение 14 дней. На фоне проводимой терапии нормализовалась температура, купированы болевой синдром, общая гиперестезия, менингеальные симптомы. Через две недели выполнена люмбальная пункция: спинномозговая жидкость – бесцветная, прозрачная, белок – 1,27 г/л, цитоз – $345/3 = 115 \cdot 10^6/\text{л}$ (лимф. – 97%, нейтроф. – 1%, мон. – 2%), глюкоза – 1,97 ммоль/л.

Выписана на амбулаторный этап лечения с рекомендацией продолжить антимикотическую терапию по месту жительства. В связи с асоциальным образом жизни пациентка к инфекционисту по месту жительства не обратилась.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Грибы рода *Rhodotorula* являются пигментированными базидиомицетовыми дрожжами, принадлежат к роду *Sporidiobolaceae* [3], семейству *Ballistosporomyces*, распространены повсеместно – от Арктики до экватора. Их находят в воздухе, почве, в пресных и морских водоемах, продуктах питания и предметах окружающей среды. Кроме того, *Rhodotorula* spp. являются непатогенными колонизаторами растений, животных и людей [4, 5]. У людей *Rhodotorula* spp. выделяют с ногтей, кожи, из респираторных биосубстратов, кала, мочи и, как правило, расценивают как комменсалов [6]. При нарушении правил забора биосубстратов для лабораторных исследований *Rhodotorula* spp. могут

контаминировать лабораторные образцы (Hagan M.E., et al., 1995).

Rhodotorula spp. свойственна яркая окраска – от розового, кораллового до оранжевого и красного на агаре среды Сабуро, обусловленная присутствием каротиноидов. Колонии грибов описывают как мягкие, гладкие, влажные, иногда слизеподобные. По своим питательным свойствам *Rhodotorula* spp. непритязательны, легко растут на большинстве питательных сред, характеризуются быстрым темпом роста. При микроскопии чистой культуры наблюдают круглые или овальные клетки, псевдомицелий встречается редко (Larone D.H., 2002).

В настоящее время известно 46 видов *Rhodotorula*, которые считали непатогенными до 1960 г., когда в впервые был описан случай эндокардита, обусловленного грибами *Rhodotorula* sp., у 47-летней женщины с ревматической болезнью сердца (Louria D.B., et al. 1960).

Наиболее частый возбудитель родоторулезной инфекции у человека – *R. mucilaginosa* (72% случаев), реже – *R. glutinis* (8%) и *R. minuta* (3%) [3]. В то же время, в части опубликованных клинических случаев определить возбудителя до вида не удавалось, что, вероятно, расширяет перечень возможных патогенов среди представителей рода *Rhodotorula*.

За прошедшие десятилетия в литературе описано более двухсот микозов, обусловленных *Rhodotorula* spp. [3, 7-20].

Увеличение частоты инфекций, обусловленной редкими дрожжами, является следствием роста числа иммунокомпрометированных пациентов, внедрением в практику новых агрессивных методов лечения с интенсивной терапией и трансплантацией, длительной постановкой центрального венозного катетера, парентеральным питанием, применением антибиотиков широкого спектра действия и цитотоксических препаратов, пандемией ВИЧ-инфекции [21, 22].

В 90% случаев инфекция, обусловленная *Rhodotorula* spp., развивается у пациентов с иммуносупрессией на фоне трансплантации органов и тканей, применения системных кортикостероидов, иммунодепрессантов, ВИЧ-инфекции, кахексии [18, 21, 23]. Основными факторами риска являются постановка центрального венозного катетера (CVC) [9, 12, 18, 19],

продолжительное пребывание в стационаре и длительное применение антибиотиков широкого спектра действия [21].

Наиболее распространенная форма – фунгемия, которая составляет 73% всех случаев инфекции, обусловленной *Rhodotorula* spp. Тем не менее, у этих грибов прослеживается тропность к центральной нервной системе (ЦНС).

В результате поиска специальной литературы мы обнаружили 15 публикаций, посвященных микозам ЦНС, обусловленным *Rhodotorula* spp. (табл.).

Мужчины составили 80% больных менингоэнцефалитом. В 47% это были ВИЧ-инфицированные пациенты в стадии СПИД, реже данная инфекция развивалась на фоне онкогематологических или онкологических заболеваний (26%). В двух случаях (13%) факторы риска выявлены не были. При родоторулезном венитрикулите основным фактором риска развития заболевания было использование внутривенного катетера [26].

В описанном нами случае менингит развился у женщины на фоне ВИЧ-инфекции в стадии СПИДа при отсутствии адекватной антиретровирусной терапии, снижении уровня CD4+ менее 300 в мкл и продолжения постоянных парентеральных введений опиатов.

Отметим, что клиника заболевания у иммунодефицитных пациентов сходна с таковой при других микозах ЦНС, таких как криптококкоз. Клинические проявления, согласно представленным данным, могут быть острыми [29, 34], подострыми [22, 32] или хроническими [16]. Симптомы включают лихорадку, головную боль, изменение чувствительности, менингеальные симптомы (общая гиперестезия, ригидность затылочных мышц, положительный симптом Кернига, парезы и параличи). В цереброспинальной жидкости обычно присутствует лимфоцитарный плеоцитоз с уменьшением глюкозы и увеличенного белка [32].

В нашем клиническом случае родоторулезный менингит сопровождался лихорадкой, головной болью, симптомами общей гиперестезии, ригидностью затылочных мышц, положительным симптомом Кернига, парезом левой половины лица; в спинномозговой жидкости отмечали лимфоцитарный лейкоцитоз со снижением глюкозы.

Основными методами, позволяющими диагности-

Таблица

Микозы ЦНС, обусловленные *Rhodotorula* spp.

Год	Автор	Возбудитель	Пол/ Возраст	Заболевание	Терапия	Исход
1976	Pore R.S. [24]	<i>R. mucilaginosa</i>	м/21	Острый лимфобластный лейкоз	амфотерицин В	умер
1996	Gyaurgieva O.H. [25]	<i>R. mucilaginosa</i>	м/39	СПИД	5-флуцитозин, итраконазол	умер
1988	Donald F.E. [26]	<i>R. mucilaginosa</i>	ж/32	Менингиома	5-флуцитозин	выжила
1998	Huttova M [27]	<i>R. mucilaginosa</i>	м/13	Нейробластома	миконазол	выжил
1998	Ahmed A. [28]	<i>R. mucilaginosa</i>	ж/65	СПИД	миконазол	умер
2001	Lanzafame M. [29]	<i>R. glutinis</i>	м/69	нет	амфотерицин В	выжил
2007	Pamidimukkala U. [14]	<i>R. glutinis</i>	ж/20	Системная красная волчанка	нет	умерла
2007	Thakur K. [22]	<i>R. mucilaginosa</i>	м/30	СПИД	5-флуцитозин	умер
2008	Baradkar V.P. [8]	<i>R. mucilaginosa</i>	м/36	СПИД, туберкулез	амфотерицин В, итраконазол	выжил
2008	Shinde R.S. [17]	<i>R. glutinis</i>	м/35	СПИД	амфотерицин В	выжил
2009	Elias M.L. [10]	<i>R. mucilaginosa</i>	м/53	нет	нет	умер
2011	Loss S.H. [30]	<i>R. mucilaginosa</i>	м/58	Гипертоническая болезнь, инсульт, почечная недостаточность	липидный амфотерицин В	выжил
2014	Menon S. [31]	<i>R. glutinis</i>	м/	СПИД, туберкулез	амфотерицин В	выжил
2014	Tsiodras S. [32]	<i>R. mucilaginosa</i>	м/28	Лимфома Хожкина	липосомальный амфотерицин В, 5-флуцитозин	умер
2015	Mohd Nor F. [33]	<i>R. mucilaginosa</i>	м/	СПИД	амфотерицин В, итраконазол	выжил

ровать инвазивные микозы, вызванные *Rhodotorula* spp., являются классические микологические исследования биосубстратов с обнаружением возбудителя при микроскопии патологического материала и в культуре (Larone D.H., 2002).

В случаях менингита окрашивание тушью помогает выявлять заключенные в капсулу почкующиеся дрожжевые клетки [17, 22] в ликворе, что не позволяет морфологически дифференцировать криптококковый и родоторулезный менингиты. Характерная пигментация колоний при выделении чистой культуры, подтверждающие биохимические тесты (например, отсутствие ферментации инозита, производство уреазы) и отсутствие формирования бластоспор дают возможность идентифицировать возбудителя [2, 8, 22]. В нашем случае возбудителя идентифицировали с помощью MALDI-TOF MS.

О *Rhodotorula* spp. часто сообщают как о контаминантах при микробиологических исследованиях различных биосубстратов вследствие их широкого распространения в окружающей среде, колонизации кожи рук персонала и нарушений правил забора и транспортировки материала [6]. Выделение грибов *Rhodotorula* sp. из стерильных в норме биосубстратов, таких как кровь, перитонеальная жидкость или ликвор, является признаком инфекции. Тем не менее, выделение микроорганизма из биосубстрата иногда неверно расценивают как контаминацию, что приводит к ошибкам и задержке антимикотической терапии, как в нашем случае.

Rhodotorula spp. устойчивы ко многим противогрибковым препаратам *in vitro*.

В настоящее время встречается ограниченное количество публикаций, посвященных проблемам чувствительности возбудителя *Rhodotorula* spp. к антимикотическим препаратам с использованием методов серийных разведений в соответствии с международ-

ными стандартами (CLSI). Наиболее активными препаратами по отношению к *Rhodotorula* spp. являются флуцитозин и амфотерицин В. Современные международные руководства рекомендуют амфотерицин В и флуцитозин как препараты первой линии в лечении инфекции, обусловленной *Rhodotorula* spp. [3, 18].

В представленном клиническом случае чувствительность к антимикотическим препаратам полученной при посеве спинномозговой жидкости культуры *R. mucilaginosa* была определена методом серийных разведений в соответствии с международными стандартами CLSI. Выявленная культура оказалась резистентна к флуконазолу, что характерно для всех видов *Rhodotorula*.

В настоящем обзоре клинических случаев менингоэнцефалитов, обусловленных грибами *Rhodotorula*, антимикотическую терапию получили 87% пациентов, восемь человек (53%) – амфотерицин В, одному больному проведен курс терапии амфотерицином В в сочетании с флуцитозином (табл.). Семь из этих 15 пациентов погибли, летальность составила 46%.

Несмотря на небольшую задержку в трактовке полученных результатов микологического обследования, в представленном клиническом случае удалось своевременно диагностировать менингит, обусловленный *R. mucilaginosa*, и назначить лечение амфотерицином В с положительной клинико-лабораторной динамикой.

Таким образом, в последние десятилетия прогрессивно увеличивается количество микозов, расширяется спектр возбудителей, этиологически значимыми становятся ранее не патогенные виды микромицетов. У ВИЧ-инфицированных больных возможно развитие редких микозов. Своевременная диагностика и адекватная терапия позволяют достичь желаемых результатов в лечении заболеваний, вызванных, в частности, грибами рода *Rhodotorula*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Meletiadis J., Roilides E. Rare invasive fungal infections: epidemiology, diagnosis and management. *Curr. Fungal. Infect. Rep.* 2013; 4: 351.
2. Arendrup M.C., Boekhout T., Akova M., et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20: 76-98.
3. Ramos A., Redelman G.S., Brown A.E., Seo S.K. *Rhodotorula* species. *Antimicrob* 2015. <http://www.antimicrobe.org/fl16.asp>. 2015
4. Kutty S.N., Philip R. Marine yeasts-a review. *Yeast.* 2008; 25: 465-483.
5. Vishniac H.S., Takashima M. *Rhodotorula arctica* sp. nov., a basidiomycetous yeast from Arctic soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010; 60 (5): 1215-1218.
6. Khodavaisy S., Nabili M., Davari B., Vahedi M. Evaluation of bacterial and fungal contamination in the health care workers' hands and rings in the intensive care unit. *J. Prev. Med. Hyg.* 2011; 52: 215-218.
7. Alothman A. *Rhodotorula* species peritonitis in a liver transplant recipient: a case report. *Saudi. J. Kidney Dis. Transpl.* 2006; 17: 47-49.
8. Baradkar V.P., Kumar S. Meningitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in human immunodeficiency virus seropositive patient. *Ann. Indian. Acad. Neurol.* 2008; 11: 245-247.
9. De Almeida G.M., Costa S.F., Melhem M., et al. *Rhodotorula* spp. isolated from blood cultures: clinical and microbiological aspects. *Med Mycol.* 2008; 46: 547-556.
10. Elias M.L., Soliman A.K., Mahoney F.J., et al. Isolation of cryptococcus, *Candida*, *Aspergillus*, *Rhodotorula* and nocardia from meningitis patients in egypt. *J. Egypt. Public. Health. Assoc.* 2009; 84 (1-2): 169-181.
11. Garcia-Suarez J., Gomez-Herruz P., Cuadros J.A., et al. *Rhodotorula mucilaginosa* catheter-related fungemia in a patient with multiple myeloma. *Mycoses.* 2009.
12. Lunardi L.W., Aquino V.R., Zimerman R.A., Goldani L.Z. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 43: e60-3.
13. Neofytos D., Horn D., De Simone J.A., Jr. *Rhodotorula mucilaginosa* catheter-related fungemia in a patient with sickle cell disease: case presentation and literature review. *South Med. J.* 2007; 100: 198-200.
14. Pamidimukkala U., Challa S., Lakshmi V., et al. Sepsis and meningoencephalitis due to *Rhodotorula glutinis* in a patient with

- systemic lupus erythematosus, diagnosed at autopsy. *Neurol India*. 2007; 55: 304-307.
15. *Perniola R., Faneschi M.L., Manso E., et al.* *Rhodotorula mucilaginosa* outbreak in neonatal intensive care unit: microbiological features, clinical presentation, and analysis of related variables. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2006; 25: 193-196.
 16. *Riedel D.J., Johnson J.K., Forrest G.N.* *Rhodotorula glutinis* fungemia in a liver-kidney transplant patient. *Transpl. Infect. Dis.* 2008; 10: 197-200.
 17. *Shinde R.S., Mantur B.G., Patil G., et al.* Meningitis due to *Rhodotorula glutinis* in an HIV-infected patient. *Indian J. Med. Microbiol.* 2008; 26: 375-377.
 18. *Tuon F.F., Costa S.F.* *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Rev Iberoam. Micol.* 2008; 25: 135-140.
 19. *Tuon F.F., de Almeida G.M., Costa S.F.* Central venous catheter-associated fungemia due to *Rhodotorula* spp. – a systemic review. *Med. Mycol.* 2007; 45: 441-447.
 20. *Unal A., Koc A.N., Sipahioglu M.H., et al.* CAPD-related peritonitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Perit. Dial. Int.* 2009; 29: 581-582.
 21. *Capoor M.R., Aggarwal S., Raghvan C., et al.* Clinical and microbiological characteristics of *Rhodotorula mucilaginosa* infections in a tertiary-care facility. *Indian J. Med. Microbiol.* 2014; 32: 304-309.
 22. *Thakur K., Singh G., Agarwal S., Rani L.* Meningitis caused by *Rhodotorula rubra* in a human immunodeficiency virus infected patient. *Indian J. Med. Microbiol.* 2007; 25: 166-168.
 23. *Chitasombat M.N., Kofteridis D.P., Jiang Y., et al.* Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. *J. Infect.* 2012; 64: 68-75.
 24. *Pore R.S., Chen J.* Meningitis caused by *Rhodotorula*. *Sabouraudia*. 1976;14: 331-335.
 25. *Gyaurgieva O.H., Bogomolova T.S., Gorshkova G.I.* Meningitis caused by *Rhodotorula rubra* in an HIV-infected patient. *J. Med. Vet. Mycol.* 1996; 34 (5): 357-359.
 26. *Donald F.E., Sharp J.F., Firth J.L., et al.* *Rhodotorula rubra* ventriculitis. *J. Infect.* 1988; 16: 187-91.
 27. *Huttova, M., Kralinsky, K., Horn, J., et al.* Prospective study of nosocomial fungal meningitis in children – report of 10 cases (Article). *Scandinavian J. of Infect. Dis.* 1998; 30 (5): 485-487.
 28. *Ahmed A., Aggarwal M., Chiu R., et al.* A fatal case of *Rhodotorula* meningitis in AIDS. *Med. Health R. Isl.* 1998; 81 (1): 22-23.
 29. *Lanzafame M., De Checchi G., Parinello A., et al.* *Rhodotorula glutinis*-related meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 410.
 30. *Loss S.H., Antonio A.C., Roehrig C., et al.* Meningitis and infective endocarditis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in an immunocompetent patient. *Rev. Bras. Ter. Intensiva.* 2011; 23: 507-509.
 31. *Menon S., Gupta H.R., Sequeira R., et al.* *Rhodotorula glutinis* meningitis: a case report and review of literature. *Mycoses.* 2014; 57 (7): 447-51.
 32. *Tsiodras S., Papageorgiou S., Meletiadi J., et al.* *Rhodotorula mucilaginosa* associated meningitis: A subacute entity with high mortality. Case report and review. *Med. Mycol. Case Rep.* 2014; 6: 46-50.
 33. *Mohd N.F., Tan L.H., Na S.L., Ng K.P.* Meningitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in HIV-Infected patient: a case report and review of the literature. *Mycopathologia.* 2015; 180 (1): 95-98.
 34. *Mori T., Nakamura Y., Kato J., et al.* Fungemia due to *Rhodotorula mucilaginosa* after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* 2012; 14: 91-94.

Поступила в редакцию журнала 18.09.2017

Рецензент: Н.П. Елинов



ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫЙ МУКОРМИКОЗ У ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ В САНКТ- ПЕТЕРБУРГЕ

¹Хостелиди С.Н. (доцент кафедры), ¹Шадринова О.В. (ассистент кафедры), ¹Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ¹Игнатъева С.М. (в.н.с.), ¹Тараскина А.Е. (зав. лаб.), ¹Мелехина Ю.Э. (доцент кафедры), ¹Трофимова О.А. (старший лаборант), ²Волкова А.Г. (пульмонолог), ²Попова М.О. (гематолог), ²Михайлова И.А. (зав. отд.), ³Колбин А.С. (профессор), ³Бойченко Э.Г. (зав. отд.), ⁴Медведева Н.В. (зам. главного врача), ⁴Подольцева Э.И. (зав. отд.), ⁴Климович А.В. (зав. отд.), ⁴Белогурова М.Б. (зав. отд.), ⁵Зюзгин И.С. (зав. отд.), ⁶Успенская О.С. (зав. отд.), ⁷Семелев В.Н. (зав. отд.), ²Зубаровская Л.С. (зам. директора), ²Афанасьев Б.В. (директор института), ¹Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии и НИИ микологической микологии им. П.Н. Кашкина; ²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова (институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачёвой); ³Городская больница №31; ⁴Детская городская больница №1; ⁵НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова; ⁶Ленинградская областная клиническая больница; ⁷Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2017

Перспективно обследовали 58 больных мукоормикозом в 7 стационарах Санкт-Петербурга с 2004 по 2016 гг. У 93% пациентов это заболевание выявили после длительного пребывания в стационаре. Основные фоновые заболевания у больных внутрибольничным мукоормикозом – острые лейкозы (70%), факторы риска – агранулоцитоз (91%), лимфоцитопения (88%) и применение глюкокортикостероидов (70%); наиболее частая локализация – легкие (74%) и околоносовые пазухи (15%), поражение ≥ 2 органов отмечали у 46% пациентов. Основные возбудители нозокомиального мукоормикоза – *Rhizopus spp.* (42%) и *Rhizomucor spp.* (30%). Антифунгальную терапию применяли у 76% больных, хирургическое лечение – у 35%, выживаемость в течение 12 недель составила 60%. Положительные прогностические факторы – ремиссия основного заболевания ($p=0,013$) и комбинированная антифунгальная терапия ($p=0,05$).

Ключевые слова: антифунгальная терапия, внутрибольничный мукоормикоз, острый лейкоз, *Rhizopus spp.*, *Rhizomucor spp.*

NOSOCOMIAL MUCORMYCOSIS IN ONCOHAEMATOLOGICAL PATIENTS IN SAINT- PETERSBURG, RUSSIA

¹Khostelidi S.N. (associate professor of the chair), ¹Shadrivova O.V. (assistant of the chair), ¹Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ¹Ignatyeva S.M. (leading scientific collaborator), ¹Taraskina A.E. (head of the laboratory), ¹Melekhina J.E. (associate professor of the chair), ¹Trofimova O.A. (senior laboratory assistant),

²Volkova A.G. (pulmonologist), ²Popova M.O. (hematologist), ²Mihailova I.A. (head of the department), ³Kolbin A.S. (professor), ³Boychenko E.G. (head of the department), ⁴Medvedeva N.V. (deputy chief physician), ⁴Podoltseva E.I. (head of the department), ⁴Klimovich A.V. (head of the department), ⁴Belogurova M.B. (head of the department), ⁵Zuzgin I.S. (head of the department), ⁶Uspenskaya O.S. (head of the department), ⁷Semelev V.N. (head of the department), ²Zuborovskaya L.S. (deputy director), ²Afanasiev B.V. (director of the institute), ¹Klimko N.N. (head of the chair)

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: Chair of Clinical Mycology, Allergy and Immunology; Kashkin Research Institute of Medical Mycology; ²Saint Petersburg State Medical University named after I.P. Pavlov (Institute of children's Hematology and Transplantation named after R.M. Gorbacheva), ³Pediatric City Hospital №1; ⁴City Hospital №31; ⁵Institute of Oncology named after N.N. Petrov; ⁶Leningrad Regional Clinical Hospital; ⁷S.M.Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2017

A total of 58 cases with mucormycosis in oncohaematological patients in 7 hospitals of St. Petersburg from 2004 to 2016 years were studied (93% nosocomial). Major underlying diseases in oncohaematological patients with nosocomial mucormycosis were acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia (70%). The main risk factors were neutropenia (91%), lymphocytopenia (88%) and used glucocorticosteroids (70%). Lung was the most common localization (74%), followed by rhinocerebral nosocomial mucormycosis (15%). Two or more organs involvement was noted in 46% patients. The main etiological agents were *Rhizopus spp.* (42%) and *Rhizomucor spp.* (30%). Antifungal therapy was used in 76% patients, surgery – in 35%. In treated with antifungals patients 12 weeks overall survival was 60%. The positive prognostic factors were remission of underlying disease ($p=0,013$) and combination antifungal therapy ($p=0,05$).

Key words: acute leukemia, antifungal therapy, nosocomial mucormycosis, *Rhizopus spp.*, *Rhizomucor spp.*

ВВЕДЕНИЕ

Инвазивные микозы в настоящее время являются одними из наиболее частых инфекционных осложнений у онкогематологических больных. Это связано не только с совершенствованием методов диагностики микозов, но и с более «агрессивными» схемами цитостатической терапии, широким использованием трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и органов как «терапии спасения» [1]. Кроме того, микотические инфекции отличаются агрессивным течением и высокой летальностью. Одной из таких инфекций является мукоормикоз. Рост распространенности мукоормикоза у онкогематологических больных отмечен во всем мире и, именно, острые лейкозы становятся основным фоновым заболеванием для данной инфекции в развитых странах [2]. В проведенном Ibrahim A.S. исследовании показано, что осложнение мукоормикозом значительно удлиняет пребывание пациента в стационаре и увеличивает нагрузку на службы по оказанию экстренной терапии, а также стоимость лечения почти на 100 000 долларов на одного человека [3]. При этом летальность у данной категории больных в течение 90 дней составляет 20-78% [4, 5].

В настоящее время особенности течения внутрибольничного мукоормикоза у онкогематологических больных представлены на основании изучения относительно небольших когорт пациентов [2].

Цель данного проспективного исследования – ана-

лиз факторов риска, этиологии, клинических и диагностических особенностей, а также результатов лечения мукомикоза у онкогематологических больных в Санкт-Петербурге.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Настоящее исследование явилось проспективным, динамическим и наблюдательным. В ходе совместной научно-исследовательской работы создан регистр больных мукомикозом в Санкт-Петербурге на базе НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова. В течение 12 лет (2004-2016 гг.) наблюдали 84 пациентов с мукомикозом в 11 стационарах в возрасте от 3 месяцев до 74 лет (медиана – 34,5±15 лет). Мужчин – 56%, женщин – 44%. Дети составили 27%, взрослые – 73%. Кроме демографических данных, учитывали более 200 показателей, включающих данные об анамнезе заболевания и жизни пациентов, наличие факторов риска развития инвазивных микозов, результаты обследования и лечения.

Инструментальные методы обследования использовали для уточнения локализации и степени распространенности инфекционного процесса. Проводили компьютерную томографию легких и придаточных пазух носа (ППН) в режиме высокого разрешения, магнитную резонансную томографию, фибробронхоскопию, плевральные и люмбальные пункции, пункции придаточных пазух носа.

Лабораторная диагностика включала прямую микроскопию, культуральное исследование материала из очага поражения, а также биопсию тканей и патоморфологические исследования.

Для прямой микроскопии из образцов биосубстратов (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), отделяемое из околоносовых придаточных пазух и др.) 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 нитей несептированного мицелия, ветвящихся под углом 90°.

Посев патологического материала выполняли на чашки Петри с агаризованной средой Сабуро, содержащей хлорамфеникол (40 мг/л), и инкубировали при +37 °С и +28 °С в течение 14 дней. На каждый образец материала использовали две чашки Петри со средой Сабуро. Посевы просматривали ежедневно и отмечали появление роста грибов. Идентификацию культур проводили по морфологическим и физиологическим свойствам в соответствии с определителями грибов.

Биопсийный, операционный или секционный материал после фиксации формалином подвергали обезжелезиванию и заливали в парафиновые блоки, из которых изготавливали срезы толщиной 4 мкм. Полученные срезы окрашивали гематоксилином-эозином или проводили PAS-реакцию и окраску по методу Гомори-Грокотта.

Для уточнения диагноза с 2013 года применяли молекулярно-генетическую идентификацию мукомикозов из культур, а также из клинического материала (БАЛ, гистологических препаратов).

Диагностировали мукомикоз и оценивали эффективность антифунгальной терапии на основании критериев, предложенных Европейской организацией

по изучению и лечению рака (EORTC) и группы, исследующей микозы (MSG), Национального института аллергологии и инфекционных заболеваний (NIAID) США [6, 7]. Внутрибольничный мукомикоз диагностировали на основании критериев Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ, 1979 г.), а также дополнений, предложенных в 1993 г. Внутрибольничным мукомикозом считали, если инфекция развилась через 48 часов и более после поступления в лечебное учреждение или если пациент повторно поступал в стационар с установленной инфекцией, явившейся следствием предыдущей госпитализации [8, 9].

Статистический анализ данных выполняли с помощью Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 10.1 (StatSoft, Inc., США). Описательная статистика количественных признаков представлена средними и средне-квадратическими отклонениями (в формате $M \pm s$; в случае нормальных распределений) либо медианами и квартилями (в формате $Me [Q1]$). Описательная статистика качественных признаков представлена абсолютными и относительными частотами. Для сравнения двух несвязанных групп по количественным признакам применяли тест Манна-Уитни. Сравнение несвязанных групп по качественным признакам проводили с использованием теста Хи-квадрат и точного критерия Фишера. При проверке гипотез статистически значимыми результаты считали при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$. Анализ выживаемости осуществляли по методу Каплана-Мейера, с построением графических кривых.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В период с 2004 по 2016 гг. мы наблюдали 58 онкологических и гематологических больных в 7 стационарах Санкт-Петербурга, что составило 68% от общего числа лиц с мукомикозом. Возраст пациентов – от 3 до 74 лет (медиана – 27,5±15 лет), детей – 19 (33%, медиана возраста – 11±8 лет), взрослых – 39 (67%, медиана – 43±27 лет), мужчин – 33 (57%), женщин – 25 (43%).

Почти у всех больных мукомикоз развился после длительного пребывания в стационаре (93%, $n=54$). Отметим, что внутрибольничный мукомикоз развивался, в среднем, на 35 день госпитализации (медиана – 35±20 дней). У 7% пациентов наблюдали развитие внебольничного варианта мукомикоза.

Наиболее часто внутрибольничный мукомикоз развивался при острых лейкозах (70%). Реже фоновыми заболеваниями были нейробластома, лимфогранулематоз, неходжкинская лимфома, апластическая анемия, анемия Фанкони, миелодиспластический синдром, миелоидная саркома и миеломная болезнь (табл. 1). У пациентов с внебольничным мукомикозом фоновыми заболеваниями были лимфогранулематоз, волосатоклеточный лейкоз и миелофиброз.

Таблица 1

Фоновые заболевания у онкогематологических больных мукомикозом в Санкт-Петербурге

Нозология МКБ-10	n=58	%	Внутрибольничный мукомикоз (n=54), %	Внебольничный мукомикоз (n=4), %
Острый миелобластный лейкоз	24	41	44	0
Острый лимфобластный лейкоз	13	22	26	0
Лимфогранулематоз	4	7	4	50
Неходжкинская лимфома	3	5	2	0

Хронический лимфолейкоз	3	5	6	0
Нейробластома	3	5	6	0
Волосатоклеточный лейкоз	1	1,7	0	25
Апластическая анемия	1	1,7	2	0
Анемия Фанкони	1	1,7	2	0
Миелодиспластический синдром	1	1,7	2	0
Миелоидная саркома	1	1,7	2	0
Миелофиброз	1	1,7	0	25
Хронический миелолейкоз	1	1,7	2	0
Миеломная болезнь	1	1,7	2	0

При изучении факторов риска выявили, что мукормикоз развивался сразу после или во время проведения цитостатической полихимиотерапии (ПХТ), причем чаще после 4-5 курса ПХТ (табл. 2). Длительный агранулоцитоз в течение 1 месяца до диагностики мукормикоза отмечали у 91% больных, медиана продолжительности агранулоцитоза – 29 дней. Лимфоцитопению определяли у 88% пациентов (медиана – 30 дней). Особенности наличия факторов риска у больных внутрибольничным и внебольничным мукормикозом представлены в таблице 2.

Таблица 2

Факторы риска развития мукормикоза у онкогематологических больных в Санкт-Петербурге

Факторы риска и фоновые состояния	N=58		Внутрибольничный мукормикоз (n=54)	Внебольничный мукормикоз (n=4)
	Абс.	%		
Полихимиотерапия	54	93	93%	50%
Число курсов ПХТ	медиана – 4		медиана – 3,5	медиана – 5
Агранулоцитоз	50	85	91%	25%
Длительность агранулоцитоза	медиана – 29		медиана – 30	медиана – 12
Лимфоцитопения	44	75	88%	0
Длительность лимфоцитопении	медиана – 30		медиана – 30	медиана – 0
Глюкокортикостероиды	39	66	70%	100%
Длительность приема ГКС	медиана – 60		медиана – 50	медиана – 100
ТКСК	26	45	44%	50%
Дни после ТКСК до диагностирования мукормикоза	медиана – 127		медиана – 126	медиана – 306

Две трети больных получали глюкокортикостероиды (ГКС), причем 55% из них – длительно в составе иммуносупрессивной терапии, применяемой по поводу острой и/или хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). Медиана продолжительности приема глюкокортикостероидов – 60 дней.

Отметим, что длительные (более 30 дней) периоды агранулоцитоза и лимфоцитопении были факторами риска развития только для внутрибольничного мукормикоза, для внебольничного – длительное применение глюкокортикостероидов (медиана – 100 дней).

После аллогенной трансплантации стволовых клеток (ТКСК) мукормикоз развивался у 45% пациентов. Причем преимущественно в позднем посттрансплантационном периоде (медиана дней после трансплантации, до диагностирования мукормикоза – 127). ТКСК выполнили у 44% больных внутрибольничным и у 50% – внебольничным мукормикозом.

Кроме того, у 52% пациентов мукормикоз устанавливали через 1-225 дней после диагностики ин-

вазивного аспергиллеза. Инвазивный аспергиллез до выявления мукормикоза определяли у 48% больных внутрибольничным мукормикозом и у всех пациентов с внебольничным вариантом развития инфекции.

При исследовании отмечали, что первичный очаг поражения наиболее часто локализовался в легких (76%) и придаточных пазухах носа (14%), в единичных случаях – в костной ткани, кишечнике, коже и мягких тканях (табл. 3).

Таблица 3

Клинические варианты мукормикоза у онкогематологических больных в Санкт-Петербурге

Клинические варианты мукормикоза	n=58		Внутрибольничный мукормикоз (n=54)	Внебольничный мукормикоз (n=4)
	Абс.	%		
Поражение легких	44	76	74%	100%
Риноцеребральный мукормикоз	8	14	15%	0
Поражение ЖКТ	4	7	7%	0
Поражение кожи и мягких тканей	1	2	2%	0
Поражение почки	1	2	2%	0
Поражение 2 и более органов	25	43	46%	0

Дальнейшее распространение процесса и вовлечение других органов и систем развилось у 46% пациентов с внутрибольничным мукормикозом, при внебольничном мукормикозе мы наблюдали только локальную инфекцию без дальнейшего распространения.

Лихорадку выше 38,5 °С отмечали почти у всех больных (86%). При первичном поражении легких сухой кашель со скудной мокротой наблюдали у 61%. У 32% из них кашель сопровождался кровохарканьем. У чуть более половины больных имели место локальный болевой синдром (53%) и одышка (51%). Внутрибольничный мукормикоз протекал более тяжело: такие симптомы, как кровохарканье, легочное кровотечение и локальный болевой синдром выявили только у этой группы больных.

При первичном поражении придаточных пазух носа всех пациентов беспокоили локальные боли. Носовые кровотечения наблюдали у 73%, некроз тканей и характерный черный струп – у двух третей больных (Рис. 1). У пациентов с первичным поражением кишечника основными клиническими признаками были симптомы «острого живота», интенсивность которых постепенно нарастала.



Рис. 1. Некроз тканей («черный струп») при поражении придаточных пазух носа у пациентки с хроническим лимфолейкозом.

КТ легких проводили всем больным с поражением бронхолегочной системы (n=44). На начальных этапах заболевания у всех пациентов выявляли очагово-инfiltrативные изменения (100%), двустороннее пора-

жение легких диагностировали у 53%, наличие гидроторакса отмечали у 53%, междолевой плеврит – у 40%, симптом «серпа» – у 25%, симптом «обратного ореола» – у 7%. У больных внутрибольничным мукормикозом одинаково часто наблюдали одностороннее и двустороннее поражение легких. Только у этой когорты пациентов описаны гидроторакс, симптомы «серпа» и «обратного ореола».

КТ придаточных пазух носа выполнили 27 больных (47%). Признаки синусита определяли у 30% из них. МРТ головного мозга проводили у 33%, у пяти человек (26%) выявили очаговые поражения.

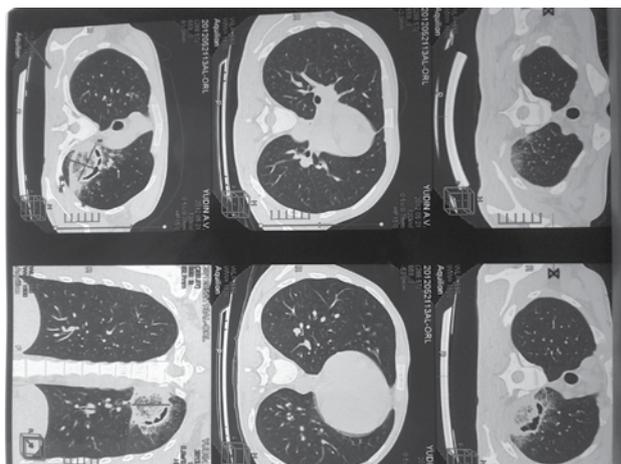


Рис. 2. КТ органов грудной полости больного мукормикозом на фоне ОМЛ.

С целью идентификации возбудителя заболевания проводили забор материала из очагов поражения для микологического изучения. Исследовали следующие биосубстраты: мокроту, промывную жидкость из бронхов, плевральную и спинномозговую жидкость, промывные воды придаточных пазух носа, биоптаты. Наличие несептированного мицелия, ветвящегося под прямым углом, при прямой микроскопии отмечали у 100% обследованных больных (Рис. 3).

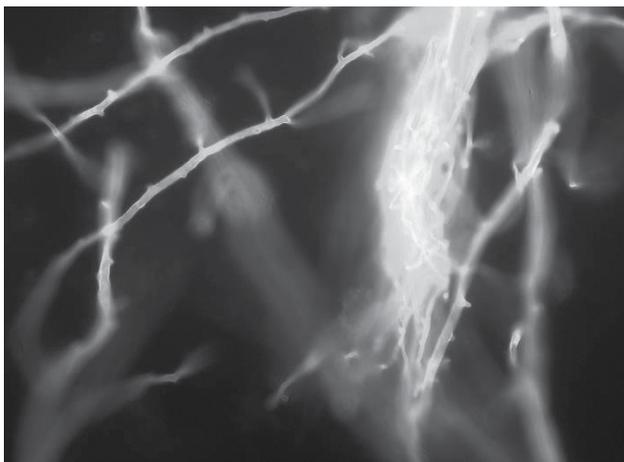


Рис. 3. Микроскопия БАЛ у пациента с ОМЛ (окраска калькофлюором белым, х400).

У 61% пациентов получен рост культуры микроорганизмов: *Rhizopus* spp. (36%), *Rhizopus oryzae* (3%), *Rhizopus arrhizus* (3%) и *Rhizopus microsporus* (5%), *Rhizomucor* spp. (14%) и *Rhizomucor pusillus* (14%), *Lichtheimia corymbifera* (17%), а также *Mucor* spp. (8%) (Рис. 4). С помощью молекулярно-генетической иден-

тификации диагноз «мукормикоз» был подтвержден у 12 больных (33%).

Возбудителями внутрибольничного мукормикоза были *Rhizopus* spp. (30%), *Lichtheimia corymbifera* (18%), *Rhizomucor pusillus* (15%), *Rhizomucor* spp. (15%), *Mucor* spp. (9%), *Rhizopus microspores* (6%), *Rhizopus oryzae* (3%), *Rhizopus arrhizus* (3%). Этиологическими агентами у больных внебольничным мукормикозом были *Rhizopus* spp. (75%) и *Rhizomucor* spp. (25%).

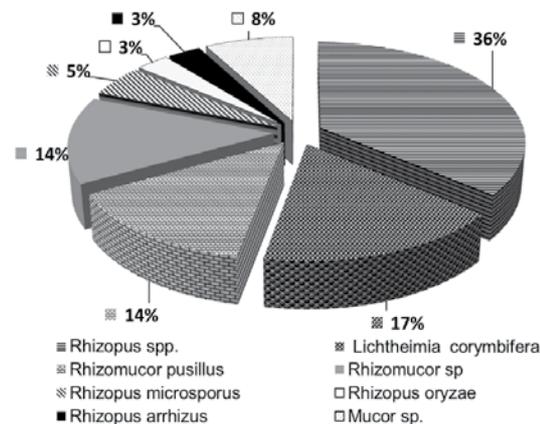


Рис. 4. Этиология мукормикоза у онкогематологических больных в Санкт-Петербурге.

Гистологическое исследование проводили у 35 больных (60%). Исследование биопсийного или послеоперационного материала было выполнено у 71% из них. Диагноз подтвержден по данным аутопсии у 29%.

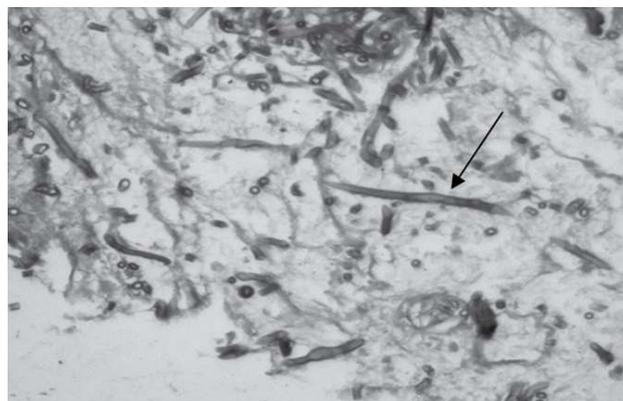


Рис. 5. Гистологическое исследование ткани легкого у больного апластической анемией. PAS-реакция (х600). Визуализируются широкие нити несептированного мицелия.

Антимикотическую терапию проводили 76% больным (n=44, внутрибольничный мукормикоз – 91%, внебольничный – 9%), у 24% пациентов диагноз был установлен посмертно. У 20 человек применение антимикотиков сочетали с хирургическим лечением (внутрибольничный мукормикоз – 95%, внебольничный – 5%). Выполняли синусотомию (40%), некрэктомию кожи и мягких тканей (20%), лобэктомии (15%), резекцию кишечника (15%), резекцию ребер (5%), а также нефрэктомии (5%).

В качестве стартовой антимикотической терапии наиболее часто назначали липидный комплекс амфотерицина В (АмВ) (3-5мг/кг/сутки) – у 55% больных и АмВ деоксихолат (1-1,5 мг/кг/сутки) – у 45% (табл. 4). По достижении клинического эффекта 66% пациентов получали позаконазол (800 мг/сутки). У 48%

больных монотерапия антимикотиками была малоэффективной, в связи с чем потребовалось применение эхинокандинов (каспофунгин, микафунгин). Комбинированную антимикотическую терапию получали 54% пациентов (каспофунгин и АмВ, каспофунгин и липидный комплекс АмВ, каспофунгин и позаконазол, липидный комплекс АмВ и позаконазол). Медиана продолжительности антимикотической терапии составила 72 дня (± 20 дней) комбинированной – 24 дня (± 14 дней).

Таблица 4

Антимикотическая терапия мукормикоза у онкогематологических больных в Санкт-Петербурге

Антимикотические препараты	n=44		Внутрибольничный мукормикоз (n=40)	Внебольничный мукормикоз (n=4)
	Абс.	%		
Позаконазол	29	66	63%	100%
Липидный комплекс амфотерицина В	24	55	55%	50%
Каспофунгин, микафунгин	21	48	48%	50%
Амфотерицин В деоксихолат	20	45	50%	0
Комбинированная терапия	25	54	52%	50%
Медиана продолжительности общего курса антимикотической терапии	72 дней (± 20 дней)		71 \pm 17 дней	115 \pm 27 дней

Общая выживаемость всех наблюдаемых нами онкогематологических больных мукормикозом (n=58) в течение 3 месяцев составила 45%, в течение 12 недель: внутрибольничным – 42%, внебольничным – 100%. Выживаемость онкогематологических больных внутрибольничным мукормикозом, получавших специфическую антимикотическую терапию в течение 12 недель, составила 60% (24 из 40) (Рис. 6). Медиана продолжительности жизни онкогематологических пациентов с мукормикозом составляет 2 месяца, внутрибольничным – 1 месяц, внебольничным – 9,5 месяцев.

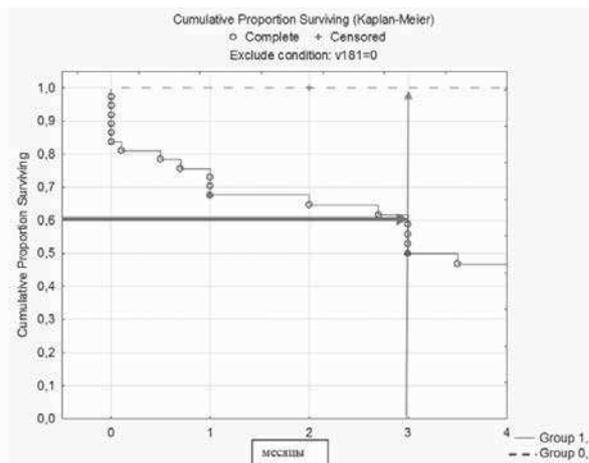


Рис. 6. Общая выживаемость онкогематологических больных с мукормикозом в течение 3 месяцев, получавших антимикотическую терапию (n=44). Группа 1 – внутрибольничный мукормикоз (n=40), группа 0 – внебольничный мукормикоз (n=4).

Установлено, что выживаемость онкогематологических больных внутрибольничным мукормикозом достоверно снижают длительный агранулоцитоз ($p=0,013$), длительное применение глюкокортико-

стероидов ($p=0,05$), распространенный (диссеминированный) мукормикоз ($p=0,0001$), кровохарканье ($p=0,001$). Достоверно улучшают прогноз внутрибольничного мукормикоза ремиссия основного заболевания ($p=0,013$), а также применение комбинированной антимикотической терапии ($p=0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Мукормикоз – тяжелая инфекция, преимущественно развивающаяся у онкогематологических больных, причем его распространенность среди данной категории пациентов прогрессивно растет. Эти данные подтверждаются проспективными международными исследованиями [10-12]. В Санкт-Петербурге, по результатам нашего исследования, также наблюдается рост случаев мукормикоза у иммунокомпрометированных пациентов с онкологическими и гематологическими заболеваниями. Если в начале столетия мы регистрировали 1 случай мукормикоза в 1-2 года, то в начале десятилетия это число уже было более десятка в год.

В ряде европейских исследований продемонстрировано, что мукормикоз развивается преимущественно у больных гемобластозами [12-14], причем основными фоновыми заболеваниями являются острые лейкозы [15-17]. Petrikkos et al. в 2012 показали, что частота мукормикоза у пациентов с ОМЛ и перенесших аллогенную ТКСК увеличилась с 0,9% до 2% [2]. Мы также наблюдали, что острые лейкозы являются основными фоновыми заболеваниями – 63% всех больных гемобластозами, причем на фоне острых лейкозов достоверно чаще развивается внутрибольничный мукормикоз (70% vs 0, $p=0,0001$).

Antoniadou A. в 2009 г. отмечал, что у иммунокомпрометированных пациентов мукормикоз развивался после длительного пребывания в стационаре – более 3 недель [18]. При этом нозокомиальный мукормикоз был связан с массивной нагрузкой микромицетами верхних дыхательных путей в результате ремонта и строительных работ стационаров, загрязнения воздушных фильтров или с обнаружением спор грибов на перевязочном материале, внутривенных катетерах и т.д. [18-20]. Среди обследованных нами больных внутрибольничным мукормикозом развивался у 93%, средняя продолжительность пребывания в стационаре до диагностирования мукормикоза составила 35 дней.

По данным клинических и экспериментальных наблюдений, посвященных мукормикозу, основным фактором риска, играющим решающую роль в патогенезе заболевания, являются повреждения гранулоцитов (качественные и количественные) и нарушение фагоцитарного звена иммунного ответа [21]. Наше исследование подтвердило, что внутрибольничным мукормикозом чаще развивался у больных во время или непосредственно после полихимиотерапии, на фоне длительного агранулоцитоза (медиана – 30 дней). Отметим, что основным фактором риска развития мукормикоза у пациентов с внебольничной формой было длительное применение глюкокортикоидов (медиана дней – 100).

Анализ результатов проведенного нами исследования, а также данные литературных источников позволяют говорить о том, что наиболее частой клинической формой как для внутрибольничного, так и внебольничного мукормикоза у онкогематологиче-

ских больных является поражение легких (50-61%) [2, 12, 13]. Почти у половины пациентов с внутрибольничным мукормикозом (46%) мы наблюдали распространение инфекции из очага поражения, в то же время, у больных внебольничным мукормикозом инфекция оставалась локальной.

Диагностика мукормикоза требует многократного исследования лабораторного материала из очагов поражения, что часто трудновыполнимо ввиду тяжести состояния пациентов. Из обследованных нами больных посмертно диагностировали мукормикоз у 24%. Согласно Европейским исследованиям, устанавливали мукормикоз по данным аутопсии в 18-20% случаев [10, 11]. При прямой микроскопии, во всех наблюдаемых нами случаях, обнаруживали широкие нити несептированного мицелия. Культуральное исследование было позитивным у 61% онкогематологических больных инвазивным микозом. В то же время, согласно зарубежным данным, выделить мукормицеты в культуре удавалось до 75% всех пациентов [10-12].

В результате микологического обследования нами выявлен широкий спектр возбудителей мукормикоза у онкогематологических больных. Возбудителями внутрибольничного мукормикоза преимущественно были представители рода *Rhizopus* (42%) и *Rhizomucor* spp. (30%), а также *Lichtheimia corymbifera* (18%). Спектр возбудителей сходен с аналогичными данными опубликованных европейских исследований [10, 11, 18].

Согласно современным международным рекомендациям, обязательными условиями успешного лечения мукормикоза у онкогематологических больных являются ранняя высокодозная противогрибковая терапия в сочетании с активным хирургическим удалением пораженных тканей, а также устранение или уменьшение выраженности факторов риска (контроль основного заболевания, коррекция нейтропении, отмена ГКС и пр.) [22].

В Санкт-Петербурге, в качестве стартовой антимикотической терапии, более чем у половины больных применяли липидный комплекс амфотерицина В, причем одинаково часто в обеих группах. Амфотерицина В деоксихолат использовали только у больных внутрибольничным мукормикозом. Комбинированную анти-

микотическую терапию назначали одинаково часто при внутрибольничном и внебольничном мукормикозе. Анализ зарубежных данных показал, что липидные формы амфотерицина В применяют у 70-80% пациентов с мукормикозом, комбинированную антимикотическую терапию – у 30-45% [10, 18].

Согласно зарубежным исследованиям и нашим наблюдениям, мукормикоз остается заболеванием с высокой летальностью. По результатам анализа случаев мукормикоза Antoniadou A. (2009 г.), летальность больных внутрибольничным мукормикозом составила 40% [18]. Согласно нашему исследованию, летальность больных внутрибольничным мукормикозом, получавших антимикотическую терапию, была также 40%. Мы не можем не отметить положительной тенденции при сравнении данных предыдущих лет [23]. Такую же тенденцию можно проследить и в зарубежных публикациях [2, 4, 5].

ВЫВОДЫ

У 93% больных мукормикоз выявили после длительного пребывания в стационаре (медиана дней – 30).

Основные фоновые заболевания у пациентов с внутрибольничным мукормикозом – острые лейкозы (70%), факторы риска: агранулоцитоз – 91% больных (медиана продолжительности – 29 дней), лимфоцитопения – 88% (медиана – 30 дней), а также применение глюкокортикостероидов – 70% (медиана – 60 дней).

Основная локализация внутрибольничного мукормикоза – легкие (74%) и околоносовые пазухи (15%), поражение ≥ 2 органов выявили у 46% пациентов.

Основные возбудители нозокомиального мукормикоза – *Rhizopus* spp. (42%) и *Rhizomucor* spp. (30%).

Антифунгальную терапию применяли у 76% больных (91% из них – с внутрибольничным мукормикозом); хирургическое лечение – у 35% (95% из них – с внутрибольничным мукормикозом).

Выживаемость в течение 12 недель у пациентов с внутрибольничным мукормикозом составила 60%. Положительные прогностические факторы – ремиссия основного заболевания ($p=0,013$) и комбинированная антифунгальная терапия ($p=0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Klimko N., Kozlova Y., S. Khostelidi, et al. The burden of serious fungal diseases in Russia. *Mycoses*. 2015; 58 (S5): 58-62.
2. Petrikos G., Skiada A., Drogari-Apiranthitou M. Epidemiology of mucormycosis in Europe. *Clin Microbiol. Infect.* 2014; 20 (6): 67-73.
3. Ibrahim A.S., Edwards J.E. Jr, Bryant R., Spellberg B. Economic burden of mucormycosis in the United States: can a vaccine be cost-effective? *Med Mycol.* 2009; 47 (6): 592-600.
4. Hammond S.P., Baden L.R., Marty F.M. Mortality in hematologic malignancy and hematopoietic stem cell transplant patients with mucormycosis, 2001 to 2009. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55: 5018-5021.
5. Zilberberg, et al. Hospital days, hospitalization costs, and inpatient mortality among patients with mucormycosis: a retrospective analysis of US hospital discharge data *BMC Infectious Diseases*. 2014; 14: 310.
6. De Pauw B., Walsh J., Donnelly J.P., et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group / *CID*. 2008; 46:1813-1821.
7. Segal B.H., Herbrecht R., Stevens D.A., et al. Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer Consensus Criteria/ *CID*. 2008; 47: 674-683.
8. *Prevention of hospital-acquired infections. A PRACTICAL GUIDE*, 2nd edition. Из-во: World Health Organization 2002: 203 p.
9. Авдеев С.Н., Белобородов В.Б., Белоцерковский Б.З. и др. Нозокомиальная пневмония у взрослых. Российские национальные рекомендации. М., 2016: 128 с. [Avdeev S.N., Beloborodov V.B., Belotserkovskiy B.Z. i dr. Nozokomialnaya pnevmoniya u vzroslykh. Rossiyskie natsionalnyie rekomendatsii. M., 2016: 128 с.]
10. Skiada A., Pagano L., Groll A., et al. European Confederation of Medical Mycology Working Group on Zygomycosis. *Zygomycosis*

- in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17 (12): 1859-67.
11. Petrikos G., Skiada A., Lortholary O., et al. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54 (1): 23-34.
 12. Lanternier F., Dannaoui E., Morizot G., et al. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54 (1): 35-43.
 13. Pagano L., Fianchi L., Leone G. Fungal pneumonia due to molds in patients with hematological malignancies. *J. Chemother.* 2006; 18 (4): 339-52.
 14. Bitar D., Van Cauteren D., Lanternier F., et al. Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis), France, 1997–2006. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15: 1395-401.
 15. Neofytos D., Horn D., Anaissie E., et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48: 265-73.
 16. Garcia-Vidal C., Upton A., Kirby K.A., Marr K.A. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin. Infect Dis.* 2008; 47: 1041-50.
 17. Kontoyiannis D.P., Marr K.A., Park B.J., et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 50 (8): 1091-100.
 18. Antoniadou A. Outbreaks of mucormycosis in hospitals. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; 15 (5): 55-9.
 19. Rammaert B., Lanternier F., Zahar J.R., et al. Healthcare-associated mucormycosis. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54 (1): 44-54.
 20. Duffy J., Harris J., Gade L., et al. Mucormycosis outbreak associated with hospital linens. *Pediatr. Infect. Dis.* 2014; 33 (5): 472-6.
 21. Ibrahim A.S., Spellberg B., Walsh T.J., Kontoyiannis D.P. Pathogenesis of Mucormycosis. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54 (1): 16-22.
 22. Tissot F., Agrawal S., Pagano L., et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica.* 2017; 102 (3): 433-444.
 23. Klimko N.N., Khostelidi S.N., Volkova A.G., et al. Mucormycosis in haematological patients: case report and results of prospective study in Saint Petersburg, Russia. *Mycoses.* 2014; 57: 91-96.

Поступила в редакцию журнала 16.06.2017

Рецензент: М.А. Шевяков



КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРАПИИ ДЕРМАТОМИКОЗОВ У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Иванова Ю.А. (главный врач, доцент кафедры)*

Краевой кожно-венерологический диспансер, Алтайский государственный медицинский университет (кафедра дерматовенерологии, косметологии и иммунологии), Барнаул, Россия

© Иванова Ю.А., 2017

В статье описаны эпидемиологические особенности дерматомикозов на фоне аутоиммунной патологии, проанализированы социально-значимые характеристики у данной категории больных, изложены результаты и рассмотрена эффективность различных методов лечения онихомикоза стоп у больных ревматоидным артритом, псориазом, системными коллагенозами и остеоартрозом.

Ключевые слова: аутоиммунные заболевания, микроскопическое и культуральное исследования, эпидемиология и этиология дерматомикозов, эффективность терапии онихомикоза

CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL FEATURES AND EFFECTIVENESS OF DERMATOMYCOSIS TREATMENT IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE DISEASES

Ivanova Y.A. (chief physician, associate professor of chair)

Altai State Regional Dermatovenerological Dispensary, Altai State Medical University (chair of dermatology, venereology, cosmetology and immunology), Barnaul, Russia

© Ivanova Y.A., 2017

In the article described the epidemiological features of dermatomycosis during autoimmune diseases, analyzed the socio-relevant characteristics in these category of patient, presented the results and showed the effectiveness of various methods of feet onychomycosis treatment in patients with rheumatoid arthritis, psoriasis, systemic collagenoses and osteoarthritis.

Key words: autoimmune diseases, effectiveness of onychomycosis treatment, epidemiology and etiology of dermatomycosis, microscopic and cultural studies

ВВЕДЕНИЕ

Факторами, способствующими развитию грибковой патологии, может послужить ряд причин, связанных с климатическими условиями, скученностью населения, профессиональной деятельностью, несоблюдением санитарных норм, личной гигиены и наличием сопутствующих соматических заболеваний [1]. Состояние макроорганизма играет ведущую роль в развитии наиболее часто встречающихся грибковых заболеваний, вызываемых патогенными дерматомицетами (дерматофитами) и условно-патогенными грибами. Следует иметь в виду, что основным predisposing фактором, способствующим заражению человека дерматомицетами, является нарушение физиологической защитной функции кожи, тогда как для возникновения микозов, вызываемых условно-патогенными грибами, необходимы более серьезные нарушения реактивности организма, в первую очередь, его иммунного статуса [2].

Известно, что пациенты, длительно получающие системные глюкокортикостероиды, цитостатики и иные иммуносупрессивные препараты, относятся к иммунокомпрометированным [3, 4]. Данные о частоте дерматомикозов у этих пациентов, по сообщениям разных авторов, существенно различаются.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ревматологическом отделении Алтайской краевой клинической больницы под наблюдением находилось 180 больных в возрасте от 18 до 80 лет с системными аутоиммунными заболеваниями и дерматомикозами. Все пациенты были распределены в пять групп в зависимости от сопутствующего аутоиммунного процесса: с ревматоидным артритом – 105 человек, с псориазом – 20, системной склеродермией – 13, остеоартрозом – 22, системной красной волчанкой – 20. Для постановки диагноза проводили микологическое исследование, включающее два этапа – микроскопию и культуральную диагностику. Микоз кожи стоп диагностировали у 125 больных, онихомикоз стоп – у 150, онихомикоз кистей – у 50, микоз кистей – у 38, микоз гладкой кожи – у 24, микоз паховых складок – у 12. В качестве системной терапии пациентам всех групп назначали один из препаратов: тербинафин – 250 мг/сут. непрерывно, итраконазол – 200 мг 2 раза/сут. пульс-терапией, флуконазол – 150 мг/неделю непрерывно. Продолжительность лечения варьировала от 2 до 36 недель. При дерматомикозах с поражением гладкой кожи для наружной терапии использовали крем тербинафина один раз в день. При онихомикозе все больные проводили механическую подчистку пораженных ногтевых пластинок 2 раза в неделю с последующей профилактической обработкой спреем, содержащим производное ундециленовой кислоты.

На основе выборочного наблюдения были определены средние значения, стандартная и предельная ошибки выборки с помощью t- критерия Стьюдента при доверительной вероятности 90%. Полученные данные применяли для сравнения средних значений зависимой переменной относительно изучаемых факторов и выявления стохастических взаимосвязей между ними.

* Контактное лицо: Иванова Юлия Александровна, e-mail: ivanova.ua@gmail.com

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки эффективности терапии провели комплексное клиничко-лабораторное обследование 180 больных дерматомикозами в возрасте от 18 до 80 лет (средний – 53,6 лет). Распределение пациентов с дерматомикозами на фоне аутоиммунных заболеваний по возрастным группам представлено на рисунке 1.



Рис.1. Распределение больных дерматомикозами на фоне аутоиммунных заболеваний по возрастным группам.

Наиболее многочисленную категорию составили лица в возрасте старше 50 лет ($69,44 \pm 5,64\%$), при этом среди пациентов с псориазом и системной склеродермией количество больных в возрасте от 31 до 50 лет было значительно выше, чем в случае других аутоиммунных заболеваний ($90 \pm 11,04\%$ и $53,85 \pm 22,75\%$ соответственно). Больные дерматомикозами в возрасте от 18 до 30 лет встречались только в случае сопутствующей системной склеродермии ($46,15 \pm 22,75\%$).

Длительность заболевания колебалась от 1 года до 25 лет, у 50 человек его продолжительность составляла более 10 лет ($27,78 \pm 5,49\%$). Среди пациентов с ревматоидным артритом и псориазом более половины имели продолжительность основного заболевания в диапазоне от 6 до 10 лет. В большинстве случаев при системной склеродермии и остеоартрозе дерматомикозы наблюдали у больных с продолжительностью аутоиммунного процесса от 1 года до 5 лет. У всех пациентов

с системной красной волчанкой дерматомикозы зарегистрированы при длительности основной патологии более 10 лет (Рис.2).



Рис. 2. Распределение больных дерматомикозами в зависимости от длительности аутоиммунных заболеваний.

Для анализа эпидемиологической ситуации у пациентов с аутоиммунными болезнями и дерматомикозами изучены социально-значимые характеристики (табл. 1).

В сельской местности проживали 109 из 180 обследованных лиц ($60,56 \pm 5,99\%$). Городские жители преобладали среди больных с сопутствующим псориазом ($70 \pm 16,86\%$) и системной красной волчанкой ($65 \pm 17,55\%$). Пациенты, страдающие ревматоидным артритом, системной склеродермией и остеоартрозом, напротив, примерно в 60% случаев проживали в селе.

В неблагоустроенных частных домах проживало $16,67 \pm 4,57\%$ больных, в благоустроенных – $40,56 \pm 6,02\%$, в квартирах – $42,78 \pm 6,07\%$. Менее одной пятой части лиц с аутоиммунными заболеваниями были одинокими людьми и $83,33 \pm 4,57\%$ – замужем или женатыми. При этом все пациенты с системной склеродермией и системной красной волчанкой были семейными, а $45,45 \pm 17,47\%$ больных с остеоартрозом – одинокими. Около 10% из всех обследованных относились к категории неработающих. В целом количество служащих и интеллигенции, лиц рабочих профессий и пенсионеров колебалось от 26 до 32%. Большинство

Таблица 1

Распределение больных дерматомикозами в зависимости от социально-значимых факторов

Возраст	Число обследованных больных (n=180)											
	Ревматоидный артрит (n=105)		Псориаз (n=20)		Системная склеродермия (n=13)		Остеоартроз (n=22)		Системная красная волчанка (n=20)		Всего (n=180)	
	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)
место жительства												
Город	34	$32,38 \pm 7,52$	14	$70 \pm 16,86$	6	$46,15 \pm 22,75$	4	$18,18 \pm 13,52$	13	$65 \pm 17,55$	71	$39,44 \pm 5,99$
Село	71	$67,62 \pm 7,52$	6	$30 \pm 16,86$	7	$53,85 \pm 22,75$	18	$81,82 \pm 13,52$	7	$35 \pm 17,55$	109	$60,56 \pm 5,99$
тип проживания												
Частный дом благоустроенный	41	$39,05 \pm 7,83$	6	$30 \pm 16,86$	7	$53,85 \pm 22,75$	12	$54,55 \pm 17,47$	7	$35 \pm 17,55$	73	$40,56 \pm 6,02$
Квартира	40	$38,1 \pm 7,8$	14	$70 \pm 16,86$	6	$46,15 \pm 22,75$	4	$18,18 \pm 13,52$	13	$65 \pm 17,55$	77	$42,78 \pm 6,07$
Частный дом неблагоустроенный	24	$22,86 \pm 6,74$	0	0 ± 0	0	0 ± 0	6	$27,27 \pm 15,63$	0	0 ± 0	30	$16,67 \pm 4,57$
семейное положение												
Женат/замуж	87	$82,86 \pm 6,05$	18	$90 \pm 11,04$	13	100 ± 0	12	$54,55 \pm 17,47$	20	100 ± 0	150	$83,33 \pm 4,57$
Одинок	18	$17,14 \pm 6,05$	2	$10 \pm 11,04$	0	0 ± 0	10	$45,45 \pm 17,47$	0	0 ± 0	30	$16,67 \pm 4,57$
профессия												
Служащие и интеллигенция	23	$21,9 \pm 6,65$	12	$60 \pm 18,01$	7	$53,85 \pm 22,75$	6	$27,27 \pm 15,63$	7	$35 \pm 17,55$	55	$30,56 \pm 5,64$
Рабочий	36	$34,29 \pm 7,62$	2	$10 \pm 11,04$	6	$46,15 \pm 22,75$	4	$18,18 \pm 13,52$	0	0 ± 0	48	$26,67 \pm 5,43$
Пенсионер	34	$32,38 \pm 7,52$	0	0 ± 0	0	0 ± 0	12	$54,55 \pm 17,47$	13	$65 \pm 17,55$	59	$32,78 \pm 5,76$
Не работает	12	$11,43 \pm 5,1$	6	$30 \pm 16,86$	0	0 ± 0	0	0 ± 0	0	0 ± 0	18	$10 \pm 3,68$

Таблица 2

Распределение больных дерматомикозами в зависимости от сопутствующих соматических заболеваний

Сопутствующие заболевания	Число обследованных больных (n=180)											
	Ревматоидный артрит (n=105)		Псориаз (n=20)		Системная склеродермия (n=13)		Остеоартроз (n=22)		Системная красная волчанка (n=20)		Всего (n=180)	
	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)
ССС	83	79,05±6,53	8	40±18,01	1	7,69±12,16	16	72,73±15,63	7	35±17,55	115	63,89±5,89
Бронхолегочные	27	25,71±7,02	0	0±0	1	7,69±12,16	0	0±0	0	0±0	28	15,56±4,44
Опорно-двигательной и нервной систем	18	17,14±6,05	0	0±0	0	0±0	6	27,27±15,63	6	30±16,86	30	16,67±4,57
ЖКТ	47	44,76±7,98	6	30±16,86	1	7,69±12,16	6	27,27±15,63	0	0±0	60	33,33±5,77
Другие	36	34,29±7,62	0	0±0	0	0±0	6	27,27±15,63	7	35±17,55	49	27,22±5,46
Итого	175		14		3		28		13		233	

Таблица 3

Распределение больных дерматомикозами в зависимости от терапии аутоиммунного заболевания

Препарат	Число обследованных больных (n=180)											
	Ревматоидный артрит (n=105)		Псориаз (n=20)		Системная склеродермия (n=13)		Остеоартроз (n=22)		Системная красная волчанка (n=20)		Всего (n=180)	
	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)
Преднизолон	57	54,29±7,99	6	30±16,86	13	100±0	6	27,27±15,63	14	70±16,86	96	53,33±6,12
Метипред	18	17,14±6,05	0	0±0	0	0±0	6	27,27±15,63	6	30±16,86	30	16,67±4,57
Метотрексат	57	54,29±7,99	6	30±16,86	1	7,69±12,16	0	0±0	7	35±17,55	71	39,44±5,99
Циклоспорин	12	11,43±5,1	12	60±18,01	0	0±0	0	0±0	0	0±0	24	13,33±4,16
Сульфасалазин	57	54,29±7,99	6	30±16,86	1	7,69±12,16	6	27,27±15,63	7	35±17,55	77	42,78±6,07
Азатиоприн	0	0±0	2	10±11,04	0	0±0	4	18,18±13,52	0	0±0	6	3,33±2,2
Итого случаев назначений	201		32		15		22		34		304	

Таблица 4

Клинические варианты дерматомикозов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями

Клинические варианты дерматомикозов	Число обследованных больных (n=180)											
	Ревматоидный артрит (n=105)		Псориаз (n=20)		Системная склеродермия (n=13)		Остеоартроз (n=22)		Системная красная волчанка (n=20)		Всего (n=180)	
	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)
Микоз стоп	75	71,43±7,25	14	70±16,86	1	7,69±12,16	22	100±0	13	65±17,55	125	69,44±5,64
Онихомикоз стоп	88	83,81±5,91	14	70±16,86	6	46,15±22,75	22	100±0	20	100±0	150	83,33±4,57
Микоз кистей	12	11,43±5,1	0	0±0	6	46,15±22,75	6	27,27±15,63	14	70±16,86	38	21,11±5
Онихомикоз кистей	12	11,43±5,1	12	60±18,01	6	46,15±22,75	6	27,27±15,63	14	70±16,86	50	27,78±5,49
Микоз гладкой кожи	18	17,14±6,05	0	0±0	6	46,15±22,75	0	0±0	0	0±0	24	13,33±4,16
Микоз паховый	6	5,71±3,73	0	0±0	6	46,15±22,75	0	0±0	0	0±0	12	6,67±3,06
Итого микозов	211		40		31		56		61		399	

пациентов с псориазом и системной склеродермией относились к категории служащих и интеллигенции, с ревматоидным артритом – к рабочим, а с остеартрозом и системной красной волчанкой – к пенсионерам.

Среди 180 больных аутоиммунными заболеваниями и дерматомикозами обнаружили 233 случая иных сопутствующих соматических заболеваний: 175 – ревматоидным артритом, 14 – псориазом, 3 – системной склеродермией, 28 – остеартрозом, 13 – системной красной волчанкой (табл. 2).

Различные базисные противоревматические препараты и глюкокортикоидные соединения имеют разный противовоспалительный эффект и в разной степени влияют на клеточный и гуморальный иммунитет. Зачастую в ревматологической практике для усиления лечебного воздействия назначают иммуносупрессивные комбинации лекарственных средств, обладающие синергизмом. Все пациенты, включенные в исследование, получали противовоспалительную терапию по поводу основного заболевания, при этом 180 больным было сделано 304 назначения иммуносупрессоров. Преднизолон и метилпреднизолон чаще всего назна-

чали пациентам с системной красной волчанкой, метотрексат и сульфасалазин – больным с ревматоидным артритом, циклоспорин – с псориазом, азатиоприн – с остеартрозом, комбинации препаратов – преимущественно больным ревматоидным артритом, псориазом и системной красной волчанкой (табл. 3).

Самыми распространенными микозами у пациентов с аутоиммунными заболеваниями были микоз стоп и онихомикоз стоп – 69,44±5,64% и 83,33±4,57% соответственно. Больше всего больных микозом кистей зарегистрировано среди лиц с системной красной волчанкой (70±16,86%) и системной склеродермией (46,15±22,75%). У этой же категории пациентов, а также у лиц с псориазом, чаще, чем у остальных, наблюдали онихомикоз кистей. Микоз гладкой кожи туловища и микоз паховых складок превалировал у больных с системной склеродермией – 46,15±22,75% (табл. 4, Рис. 3).



Рис. 3. Клинические варианты дерматомикозов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

Микоз стоп верифицирован почти у 70% пациентов. У обследованных больных преобладали сквамозно-гиперкератотические и стертая формы заболевания. Стертую форму микоза стоп наблюдали у половины больных с псориазом и у всех лиц с системной красной волчанкой, эритематозно-сквамозную форму

(в случае сопутствующего псориаза) – у 35,71±21,07%, у остальных пациентов регистрировали значительно реже. Эритематозно-сквамозная, стертая и сквамозно-гиперкератотическая формы заболевания довольно часто сочетались с межпальцевым микозом стоп. Чаше, чем у остальных, межпальцевой микоз отмечали у лиц с псориазом (42,86±21,76%) и остеоартрозом (27,27±15,63%). В целом у 13% больных одновременно выявили две формы микоза данной локализации (табл. 5).

Клиническая картина онихомикоза стоп при аутоиммунных заболеваниях имела свои особенности. В целом нормотрофический и гиперкератотический типы поражения ногтевых пластинок отмечали чаще, чем онихолитический – 43,33±6,66%, 44,67±6,68% и 12±4,36% соответственно. У пациентов с ревматоидным артритом и системной красной волчанкой в половине и более случаев имело место нормотрофическое поражение ногтевых пластинок стоп, а у больных с псориазом и остеоартрозом – гиперкератотическое. При этом у лиц с псориазом и системной красной волчанкой гиперкератотическое и онихолитическое поражение ногтей наблюдали в равной степени у половины больных, а у всех пациентов с системной склеродермией ногтевые пластинки были поражены по онихолитическому типу.

Количество и глубина поражения ногтевых пластинок, определяющие степень тяжести онихомикоза, у больных с разными ревматологическими заболеваниями имели свои особенности. В обследованной группе

Таблица 5

Клинические особенности микоза стоп у пациентов с аутоиммунными заболеваниями

Клинические особенности микоза стоп	Число обследованных больных (n=180)											
	Ревматоидный артрит (n=75)		Псориаз (n=14)		Системная склеродермия (n=1)		Остеoarтроз (n=22)		Системная красная волчанка (n=13)		Всего (n=125)	
	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)
Эритематозно-сквамозная	6	8±5,15	5	35,71±21,07	0	0±0	0	0±0	0	0±0	11	8,8±4,16
Стертая	6	8±5,15	7	50±21,98	0	0±0	0	0±0	13	100±0	26	20,8±5,97
Сквамозно-гиперкератотическая	63	84±6,96	2	14,29±15,38	1	100±0	22	100±0	0	0±0	88	70,4±6,71
Межпальцевая	4	5,33±4,26	6	42,86±21,76	0	0±0	6	27,27±15,63	0	0±0	16	12,8±4,92
Всего клинических форм заболеваний	79		20		1		28		13		141	

Таблица 6

Клинические особенности онихомикоза стоп у пациентов с аутоиммунными заболеваниями

Клинические особенности микоза стоп	Число обследованных больных (n=180)											
	Ревматоидный артрит (n=88)		Псориаз (n=14)		Системная склеродермия (n=8)		Остеoarтроз (n=22)		Системная красная волчанка (n=20)		Всего (n=150)	
	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)
Тип поражения ногтевых пластинок												
Нормотрофический	50	56,82±8,68	0	0±0	0	0±0	5	22,73±14,69	10	50±18,39	65	43,33±6,66
Гиперкератотический	36	40,91±8,62	7	50±21,98	0	0±0	16	72,73±15,63	8	40±18,01	67	44,67±6,68
Онихолитический	2	2,27±2,62	7	50±21,98	6	100±0	1	4,55±7,3	2	10±11,04	18	12±4,36
Количество пораженных ногтевых пластинок: правая стопа												
Одна	39	44,32±8,72	0	0±0	0	0±0	6	27,27±15,63	0	0±0	45	30±6,15
Две	24	27,27±7,81	8	57,14±21,76	5	83,33±25,02	4	18,18±13,52	7	35±17,55	48	32±6,27
Три и более	24	27,27±7,81	6	42,86±21,76	1	16,67±25,02	12	54,55±17,47	13	65±17,55	56	37,33±6,5
Количество пораженных ногтевых пластинок: левая стопа												
Одна	32	36,36±8,44	2	14,29±15,38	0	0±0	4	18,18±13,52	0	0±0	38	25,33±5,84
Две	12	13,64±6,02	0	0±0	6	100±0	7	31,82±16,33	6	30±16,86	31	20,67±5,44
Три и более	24	27,27±7,81	12	85,71±15,38	0	0±0	5	22,73±14,69	7	35±17,55	48	32±6,27
Глубина поражения ногтевых пластинок												
До 1/3 ногтевой пластинки	40	45,45±8,73	0	0±0	0	0±0	6	27,27±15,63	7	35±17,55	53	35,33±6,41
Более 1/3 ногтевой пластинки	48	54,55±8,73	14	100±0	6	100±0	16	72,73±15,63	13	65±17,55	97	64,67±6,41

лиц ногтевые пластинки на правой стопе поражались чаще, чем на левой. Менее чем у трети пациентов на правой стопе выявлена одна пораженная ногтевая пластинка, у 32±6,27% – две, более чем у трети – три. На левой стопе поражение одного ногтя установлено у четверти пациентов, двух – у 20,67±5,44%, трех – у 32±6,27%. Три и более пораженных ногтевых пластинок чаще всего регистрировали на правой стопе у больных с псориазом, остеоартрозом и системной красной волчанкой, на левой стопе – у пациентов с псориазом, системной красной волчанкой и ревматоидным артритом. При всех аутоиммунных заболеваниях чаще встречали поражение ногтевой пластинки более 1/3. В 100% случаев данную клиническую картину наблюдали у лиц с псориазом и системной склеродермией. Начальные изменения ногтевых пластинок стоп и, соответственно, легкую степень онихомикоза, не требующую проведения системной противогрибковой терапии, имели 35,33±6,41% больных (табл.6).

Всем пациентам проводили микроскопическое и культуральное исследования. Микроскопические грибы обнаружили у больных микозом и онихомикозом стоп и кистей в 76-100% случаев. При микозах гладкой кожи и складок микроскопическое подтверждение грибковой инфекции получено у всех обследованных. Отрицательные результаты культурального исследования зарегистрированы у 19,2±5,79% пациентов с микозом стоп и у 12±4,36% – с онихомикозом стоп. У больных паховым микозом эффективность культуральной диагностики была самой низкой и составила 50±23,74%. *T. rubrum* был основной причиной грибкового поражения кожи и ногтевых пластинок в случае вовлечения в патологический процесс стоп и кистей. У 34,21±12,67% пациентов поражение кожи кистей было вызвано *Candida albicans*. *Aspergillus* spp. зарегистрировали в посеве у больных онихомикозом стоп в 4±2,63% случаев. Грибы *Malassezia* верифицировали у 50±16,79% пациентов с микозом гладкой кожи, а *Acremonium* spp. поражали 4±2,63% лиц с микозом стоп и онихомикозом (табл. 7).

В зависимости от этиологии онихомикоза, наличия сопутствующих соматических заболеваний и противопоказаний к назначению системного противогрибкового лечения использовали методы наружной терапии или применяли один из системных антимикотиков – тербинафин, итраконазол или флуконазол.

В большинстве случаев больным онихомикозом

стоп назначали системно тербинафин – 41%, итраконазол и флуконазол – 16%. Меньше трети пациентов с онихомикозом стоп не получали системных противогрибковых препаратов и применяли только местные методы лечения. При онихомикозе кистей половина больных получала системную терапию тербинафином, половина – флуконазолом; итраконазол и монотерапию наружными препаратами не назначали (табл. 8, Рис. 4).

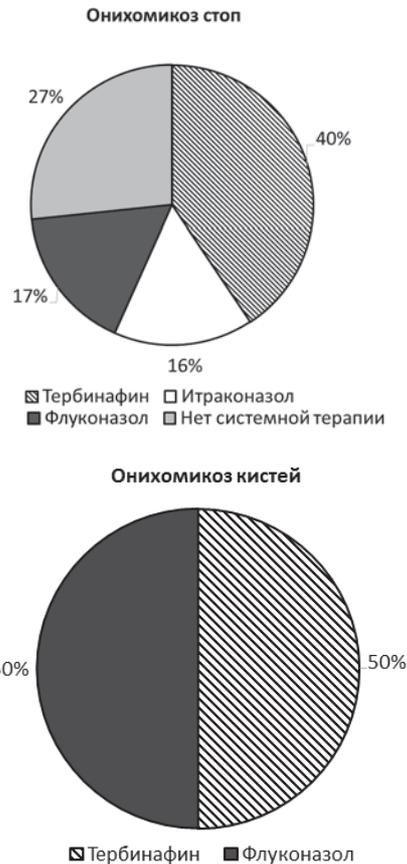


Рис. 4. Системная терапия у больных с онихомикозом стоп и кистей.

Микологическое выздоровление на 24 неделе исследования среди пациентов с онихомикозом стоп, применявших системную противогрибковую терапию, наблюдали в 45±12,94% случаев. Данный показатель существенно не отличался в зависимости от вида про-

Таблица 7

Результаты микологического исследования у пациентов с аутоиммунными заболеваниями

Результаты микологического исследования	Число обследованных больных (n=180)													
	Микоз стоп (n=125)		Онихомикоз стоп (n=150)		Микоз кистей (n=38)		Онихомикоз кистей (n=50)		Микоз гладкой кожи (n=24)		Микоз паховый (n=12)		Микоз складок (n=6)	
	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	%
Микроскопия +	95	76±6,28	126	84±4,92	32	84,21±9,74	44	88±7,57	24	100±0	12	100±0	6	100±0
Посев <i>Trichophyton rubrum</i>	59	47,2±7,35	77	51,33±6,71	19	50±13,34	31	62±11,28	7	29,17±15,26	1	8,33±13,13	0	0±0
Посев <i>Trichophyton</i> spp.	30	24±6,28	18	12±4,36	0	0±0	0	0±0	1	4,17±6,71	1	8,33±13,13	0	0±0
Посев <i>Candida albicans</i>	6	4,8±3,4	19	12,67±4,47	13	34,21±12,67	19	38±11,28	0	0±0	0	0±0	6	100±0
Посев <i>Malassezia</i>	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	12	50±16,79	0	0±0	0	0±0
Посев <i>Aspergillus</i> spp.	0	0±0	6	4±2,63	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0
Посев <i>Microsporum canis</i>	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	4	16,67±12,52	4	33,33±22,39	0	0±0
Посев <i>Acremonium</i> spp.	6	4,8±3,14	6	4±2,63	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0
Посев -	24	19,2±5,79	18	12±4,36	6	15,79±9,74	0	0±0	0	0±0	6	50±23,74	0	0±0

тивогрибковой терапии и варьировал от 40±16,12% до 49,18±10,53%. Среди лиц с легкой формой ониомикоза стоп, получавших только наружное лечение, выздоровление к этому периоду достигли 48±6,71% больных. У пациентов с ониомикозом кистей на фоне системной терапии микологическое выздоровление после пяти с половиной месяцев лечения зарегистрировали в 68±10,86% случаев. Наиболее высокие результаты отмечали у больных, получавших системно тербинафин (76±14,05%).

К окончанию периода наблюдения (72 недели) пол-

ное выздоровление установлено у 61,33±6,55% лиц с ониомикозом стоп и у 78±9,64% – с ониомикозом кистей. Результаты лечения у больных с поражением ногтевых пластинок кистей были выше, чем в случае поражения ногтевых пластинок стоп, вне зависимости от применяемого препарата. Самые низкие результаты терапии зарегистрировали у пациентов, принимавших итраконазол при ониомикозе стоп (41,67±16,55%), самые высокие – у принимавших тербинафин при дерматофитном ониомикозе кистей (84±12,06%) (табл. 8).

Таблица 8

Результаты лечения ониомикоза у пациентов с аутоиммунными заболеваниями в зависимости от вида терапии

Системный антимикотик	24 недели		72 недели						Рецидив (72 недели)	
	Микологическое выздоровление		Клиническое выздоровление		Микологическое выздоровление		Полное выздоровление			
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Ониомикоз стоп										
Тербинафин (n=61)	30	49,18±10,53	51	83,61±7,8	47	77,05±8,85	47	77,05±8,85	6	9,84±6,27
Итраконазол (n=24)	10	41,67±16,55	11	45,83±16,73	13	54,17±16,73	10	41,67±16,55	2	8,33±9,28
Флуконазол (n=25)	10	40±16,12	18	72±14,77	12	48±16,43	11	44±16,33	10	40±16,12
Итого с применением системной терапии (n=110)	50	45±12,94	34	85±9,29	24	60±12,75	24	60±12,75	10	25±11,27
Нет системной терапии (n=40)	22	48±6,71	114	76±5,74	96	64±6,45	92	61,33±6,55	28	18,67±5,23
Итого (n=150)	72	49,18±10,53	51	83,61±7,8	47	77,05±8,85	47	77,05±8,85	6	9,84±6,27
Ониомикоз кистей										
Тербинафин (n=25)	19	76±14,05	21	84±12,06	25	100±0	21	84±12,06	0	0±0
Флуконазол (n=25)	15	60±16,12	22	88±10,69	18	72±14,77	18	72±14,77	7	28±14,77
Итого с применением системной терапии (n=50)	34	68±10,86	43	86±8,08	43	86±8,08	39	78±9,64	7	14±8,08
Итого (n=50)	34	68±10,86	43	86±8,08	43	86±8,08	39	78±9,64	7	14±8,08

Вид возбудителя ониомикоза стоп у пациентов существенно влиял на эффективность проводимого лечения. К 72 неделе исследования максимальная эффективность терапии была достигнута при поражении ногтевых пластинок стоп *Trichophyton* spp. – 88,89±12,19%, *C. albicans* – 78,95±15,38%. В случае поражения *Aspergillus* spp. и *Acremonium* spp. к концу наблюдения излечения не отмечали. При отрицательных результатах культурального исследования выздоровление зарегистрировали у 77,78±16,12%. Отметим, что на промежуточном этапе (24 недели) отрицательные

результаты микологического исследования были получены у четырех пациентов из шести при поражении ногтевых пластинок *Aspergillus* spp., тем не менее, на 72 неделе полного выздоровления у данных больных достигнуто не было. Во всех остальных ситуациях количество поправившихся больных к окончанию наблюдения было выше, в том числе и у лиц с неидентифицированной культурой грибов.

У пациентов с ониомикозом кистей результаты лечения колебались от 87,1±9,9% в случае *T. rubrum* до 63,16±18,21% – *C. albicans* (табл. 9).

Таблица 9

Результаты лечения ониомикоза у пациентов с аутоиммунными заболеваниями в зависимости от возбудителя

Возбудитель	Число больных	24 недели		72 недели						Рецидив (72 недели)	
		Микологическое выздоровление		Клиническое выздоровление		Микологическое выздоровление		Полное выздоровление			
		Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)	Абс.	(%)
Ониомикоз стоп											
Микроскопия+	126	54	42,86±7,25	96	76,19±6,23	78	61,9±7,12	74	58,73±7,22	28	22,22±6,09
Посев <i>T. rubrum</i>	77	38	49,35±9,38	60	77,92±7,78	51	66,23±8,87	50	64,94±8,95	13	16,88±7,02
Посев <i>Trichophyton</i> spp.	18	6	33,33±18,27	17	94,44±8,88	17	94,44±8,88	16	88,89±12,19	2	11,11±12,19
Посев <i>C. albicans</i>	19	14	73,68±16,61	16	84,21±13,77	16	84,21±13,77	15	78,95±15,38	10	52,63±18,83
Посев <i>Aspergillus</i> spp.	6	4	66,67±31,66	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0
Посев <i>Acremonium</i> spp.	6	0	0±0	0	0±0	2	33,33±31,66	0	0±0	0	0±0
Посев -	18	12	66,67±18,27	18	100±0	14	77,78±16,12	14	77,78±16,12	4	22,22±16,12
Ониомикоз кистей											
Микроскопия +	44	28	63,64±11,93	37	84,09±9,06	37	84,09±9,06	33	75±10,74	7	15,91±9,06
Посев <i>T. rubrum</i>	31	19	61,29±14,39	27	87,1±9,9	31	100±0	27	87,1±9,9	0	0±0
Посев <i>C. albicans</i>	19	15	78,95±15,38	16	84,21±13,77	12	63,16±18,21	12	63,16±18,21	7	36,84±18,21

Частота рецидивов ониомикоза у пациентов с аутоиммунными заболеваниями зависела от локализации поражения и вида основной сопутствующей патологии.

При ониомикозе стоп рецидив грибковой инфекции имел место у 28 из 150 больных, ранее прошедших лечение. Максимальную частоту рецидивов зарегистри-

ровали у женатых мужчин старше 50 лет при длительности основного заболевания более 10 лет, по роду своей профессиональной деятельности относящихся к категории служащих и интеллигенции. В случае ревматоидного артрита и системной склеродермии рецидивы наблюдали у женщин, а псориаза и остеоартроза – у безработных и пенсионеров (табл. 10). Циклоспорин

был базовым иммуносупрессором, при котором рецидивы отмечали реже, чем в остальных случаях.

Таблица 10

Частота рецидивов онихомикоза стоп у пациентов с аутоиммунными заболеваниями в зависимости от исследуемого признака

Исследуемый признак	Число обследованных больных (n=180)											
	Ревматоидный артрит (n=88)		Псориаз (n=14)		Системная склеродермия (n=6)		Остеоартроз (n=22)		Системная красная волчанка (n=20)		Всего случаев онихомикоза стоп (n=150)	
	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)
Рецидив в зависимости от возраста												
От 18 до 30 лет	0	0±0	0	0±0	2	100±0	0	0±0	0	0±0	2	7,14±8,01
От 31 до 50 лет	0	0±0	2	100±0	0	0±0	0	0±0	7	100±0	9	32,14±14,52
51 год и больше	9	100±0	0	0±0	0	0±0	8	100±0	0	0±0	17	60,71±15,18
Итого	9		2		2		8		7		28	
Рецидив в зависимости от пола												
Мужской	0	0±0	2	100±0	0	0±0	6	75±25,18	0	0±0	8	28,57±14,05
Женский	9	100±0	0	0±0	2	100±0	2	25±25,18	7	100±0	20	71,43±14,05
Итого	9		2		2		8		7		28	
Рецидив в зависимости от длительности основного заболевания												
1-5 лет	4	44,44±27,24	0	0±0	2	100±0	2	25±25,18	0	0±0	8	28,57±14,05
6-10 лет	4	44,44±27,24	2	100±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	6	21,43±12,75
11 лет и более	1	11,11±17,24	0	0±0	0	0±0	6	75±25,18	7	100±0	14	50±15,54
Итого	9		2		2		8		7		28	
Рецидив в зависимости от семейного положения												
Женат / замуж.	8	88,89±17,24	2	100±0	2	100±0	2	25±25,18	7	100±0	21	75±13,45
Одинок(а)	1	11,11±17,24	0	0±0	0	0±0	6	75±25,18	0	0±0	7	25±13,45
Итого	9		2		2		8		7		28	
Рецидив в зависимости от профессии												
Служащие и интеллигенция	4	44,44±27,24	0	0±0	0	0±0	2	25±25,18	7	100±0	13	46,43±15,49
Рабочие	4	44,44±27,24	0	0±0	2	100±0	0	0±0	0	0±0	6	21,43±12,75
Пенсионеры	1	11,11±17,24	0	0±0	0	0±0	6	75±25,18	0	0±0	7	25±13,45
Безработные	0	0±0	2	100±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	2	7,14±8,01
Итого	9		2		2		8		7		28	
Рецидив в зависимости от иммуносупрессивного препарата												
Преднизолон	0	0±0	0	0±0	2	100±0	0	0±0	7	100±0	9	32,14±14,52
Метипред	4	44,44±27,24	0	0±0	0	0±0	6	75±25,18	0	0±0	10	35,71±14,9
Метотрексат	4	44,44±27,24	2	100±0	0	0±0	0	0±0	7	100±0	13	46,43±15,49
Циклоспорин	4	44,44±27,24	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	4	14,29±10,87
Сульфасалазин	1	11,11±17,24	0	0±0	0	0±0	2	25±25,18	7	100±0	10	35,71±14,9
Азатиоприн	4	44,44±27,24	0	0±0	2	100±0	6	75±25,18	0	0±0	12	42,86±15,38

При онихомикозе кистей с рецидивом чаще становились замужние женщины старше 30 лет, страдающие основным заболеванием более 10 лет, а также

относящиеся к категории служащих и интеллигенции. Все пациентки болели системной красной волчанкой (табл. 11).

Таблица 11

Частота рецидивов онихомикоза стоп у пациентов с аутоиммунными заболеваниями в зависимости от исследуемого признака

Исследуемый признак	Число обследованных больных (n=180)											
	Ревматоидный артрит (n=88)		Псориаз (n=14)		Системная склеродермия (n=6)		Остеоартроз (n=22)		Системная красная волчанка (n=20)		Всего случаев онихомикоза стоп (n=150)	
	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)	Абс	(%)
Рецидив в зависимости от возраста												
От 18 до 30 лет	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0
От 31 до 50 лет	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	7	100±0	7	100±0
51 год и больше	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0
Итого	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	7	0±0	7	
Рецидив в зависимости от пола												
Мужской	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0
Женский	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	7	100±0	7	100±0
Итого	0		0		0		0		7		7	
Рецидив в зависимости от длительности основного заболевания												
1-5 лет	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0
6-10 лет	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0
11 лет и более	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	7	100±0	7	100±0
Итого	0		0		0		0		7		7	
Рецидив в зависимости от семейного положения												
Женат / замуж.	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	7	100±0	7	100±0
Одинок(а)	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0
Итого	0		0		0		0		7		7	
Рецидив в зависимости от профессии												
Служащие и интеллигенция	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	7	100±0	7	100±0
Рабочие	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0
Пенсионеры	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0
Безработные	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0

Итого	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	7	
Рецидив в зависимости от иммуносупрессивного препарата												
Преднизолон	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	7	100±0	7	25±13,45
Метипред	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0
Метотрексат	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	7	100±0	7	25±13,45
Циклоспорин	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0
Сульфасалазин	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	7	100±0	7	25±13,45
Азатиоприн	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0	0	0±0

ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе результатов проведенного исследования установлено наличие различий в эпидемиологии, этиологии и эффективности лечения дерматомикозов у больных с аутоиммунными заболеваниями. У пациентов с системной склеродермией дерматомикозы часто возникают в молодом возрасте – от 18 до 30 лет, в то время как при псориазической болезни свойственно более позднее начало заболевания и развитие поверхностных грибковых инфекций. У лиц с ревматоидным артритом, остеоартрозом и системной красной волчанкой грибковые инфекции кожи и ее придатков развиваются в пожилом возрасте.

Е. Firas [5] выявил, что из всех пациентов с ревматоидным артритом и лиц, получающих метотрексат, 31,2% страдают сопутствующими грибковыми инфекциями кожи: 16% – разноцветным лишаем, 9% – паховой эпидермофитией, 6% – паронихиями.

Н-Н. Lee, et al [6] провели проспективное исследование 35 больных с длительной историей ревматических заболеваний, включая ревматоидный артрит, болезнь Бехтерева и псориазические артриты; чаще у этой категории наблюдали хронические воспалительные заболевания кожи, реже – различные инфекции, в том числе и грибковые.

Возникновение дерматомикозов в данном исследовании чаще отмечали при длительности основного заболевания от 6 до 10 лет, в то же время около половины пациентов с системной склеродермией и остеоартрозом заболевают дерматомикозами в первые пять лет с момента верификации основного диагноза. При исследовании характера и условий проживания выявлено, что больные дерматомикозами и аутоиммунными болезнями чаще являются сельскими жителями, проживающими в благоустроенных квартирах или домах, в то же время пациенты с псориазом и системной красной волчанкой чаще относились к городскому населению. Вне зависимости от аутоиммунного заболевания большинство лиц с дерматомикозами были женатыми или замужними. В зависимости от рода занятий среди обследованных больных количество служащих, рабочих и пенсионеров было примерно одинаковым и колебалось в районе 30%. Дерматомикозы среди служащих и интеллигенции чаще выявляли в случае сопутствующих псориаза и системной склеродермии, среди пенсионеров – остеоартроза и системной красной волчанки. Таким образом, предрасполагающие условия для возникновения дерматомикозов в группе с аутоиммунными заболеваниями имели общие профессиональные и социально-бытовые черты.

Наиболее распространенной соматической патологией среди всех пациентов были сердечно-сосудистые заболевания, с высокой частотой диагностировали болезни желудочно-кишечного тракта. Лица с ревматоидным артритом страдали часто бронхолегочными заболеваниями, а с системной красной волчанкой –

опорно-двигательной и нервной системы.

Самыми распространенными заболеваниями среди всех обследованных были микоз и онихомикоз стоп. У пациентов с системной склеродермией и системной красной волчанкой часто отмечали грибковое поражение кожи и ее придатков в другой локализации. Сквамозно-гиперкератотический вариант микоза стоп среди данной категории больных оказался наиболее распространенным. При системной красной волчанке микоз стоп наблюдали в стертой форме, а при псориазе – как в стертом, так и в эритематозно-сквамозном варианте. Тяжелые формы онихомикоза стоп с поражением более трех ногтевых пластинок достоверно чаще обнаруживали у больных с псориазом, системной красной волчанкой и остеоартрозом, а поражение одной ногтевой пластинки – с ревматоидным артритом. Преимущественное поражение трех и более ногтевых пластинок стоп в группе с аутоиммунными заболеваниями коррелировало с частым назначением преднизолона, циклоспорина и метотрексата, а также комбинаций этих препаратов у пациентов с псориазом и системной красной волчанкой.

В 2006 г. Гудкова Ю.И. изучила микозы кожи и ее придатков у лиц, длительно получающих системные глюкокортикостероиды. В результате обследования 320 больных возбудителями дерматомикозов были: *Trichophyton rubrum* (92,1%), *Malassezia* spp. (14,8%), *Candida* spp. (7,4%), *Trichophyton interdigitale* (2,1%), *Epidermophyton floccosum* (2,1%), *Sporothrix schenckii* (1,2%). Причем у 34,6% пациентов поражения кожи и ее придатков сочетались с кандидозом слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта и гениталий [7].

Этиология дерматомикозов среди обследованных нами больных в большинстве случаев была связана с дерматофитными грибами. Частым возбудителем микозов стоп и кистей, в том числе с поражением ногтевых пластинок, были дрожжи *C. albicans*. Доля недерматофитных плесеней в этиологии грибковых инфекций не превышала 8%. При изучении результатов применения антимикотических препаратов выявлено, что наиболее эффективным было использование тербинафина для лечения инфекции ногтевых пластин, вызванной *T. rubrum* и *Trichophyton* spp. При условии правильно назначенного лечения наличие или отсутствие системной противогрибковой терапии существенно не влияло на ее результаты, и полное выздоровление, в среднем, было достигнуто более чем в 60% случаев при онихомикозе стоп.

Проблемы лечения онихомикозов у иммунокомпromетированных больных связаны не только с невысоким процентом полного выздоровления среди пролечившихся больных, но и с высокой вероятностью рецидива заболевания. Рецидивы онихомикоза у наших пациентов чаще возникали при локализации патологического процесса на ногтевых пластинках стоп. Причиной рецидива у большинства обследованных лиц выступала оппортунистическая кандидозная

инфекция. Частота рецидивов зависела от основного заболевания, половозрастных признаков, социально-бытовых условий и профессиональной деятельности больных.

ВЫВОДЫ

1. Возраст пациентов, нозологическая разнообразность и длительность аутоиммунного процесса влияют на частоту возникновения дерматомикозов.
2. Большинство пациентов с дерматомикозами и аутоиммунными болезнями живут в составе семьи.
3. Факторы, способствующие возникновению дерматомикозов в группе с аутоиммунными заболеваниями, имели общие профессиональные и социально-бытовые черты.
4. Сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания и патология желудочно-кишечного тракта наиболее распространены у данной категории пациентов.
5. В структуре дерматомикозов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями преобладают микоз и они-

хомикоз стоп.

6. У больных с псориазом и остеоартрозом чаще встречаются тяжелые формы онихомикоза стоп с поражением более трех ногтевых пластинок.

7. Этиология микозов и ее придатков более чем в половине случаев была связана с дерматомицетами.

8. Эффективность лечения онихомикоза стоп у пациентов с аутоиммунными болезнями зависит от этиологии заболевания и выбора системного противогрибкового препарата. В среднем, терапия была успешной у 60% обследованных лиц.

9. При лечении пациентов с дерматомикозами и аутоиммунными болезнями необходимо учитывать социальные факторы, общее состояние здоровья и сопутствующие заболевания, а также высокую вероятность возникновения ранних рецидивов.

10. Дрожжи *C. albicans* являются самой частой причиной рецидива инфекционного процесса в случае онихомикоза стоп и кистей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Потеекаев Н.Н., Серов Д.Г., Дворянкова Е.В., Жуковский Р.О. Эффективная терапия микозов стоп однократным применением новой наружной формы тербинафина - пленкообразующего раствора «ЛамизилУно. Клиническая дерматология и венерология. 2008; 4: 85-88. [Potekaev N.N., Serov D.G., Dvoryankova E.V., Zhukovskiy P.O. Effektivnaya terapiya mikofov stop odnokratnyim primeneniem novoy naruzhnoy formy terbinafina - plenkoobrazuyuschego rastvora «LamizilUno. Klin. dermatologiya i venerologiya. 2008; 4: 85-88.]
2. Кауфман К.А., Манделла Дж.М. Атлас грибковых заболеваний: пер. с англ. Под ред. проф. Ю.В. Сергеева. М.: GEOTAR-Media, 2010: 240 с. [Kaufman K.A., Mandella Dzh.M. Atlas gribkovyih zabolevaniy: per. s angl. Pod red. prof. Yu.V. Sergeeva. M.: GEOTAR-Media, 2010: 240 s.]
3. Степанова Ж.В. Кандидоз гладкой кожи. Лечащий врач. 2006; 5: 25-27. [Stepanova Zh.V. Kandidoz gladkoy kozhi. Lechaschiy vrach. 2006; 5: 25-27.]
4. Blanka H., Czaika V., Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. Mycoses. 2008; 51 (4): 2-15.
5. Firas E.D. Superficial fungal infection of the skin in patients with rheumatoid arthritis after methotrexate therapy. The Iraqi postgraduate medical journal. 2007; 6 (4): 352-355.
6. Lee H-H., et al. Cutaneous side-effects in patients with rheumatic diseases during application of tumour necrosis factor-alpha antagonists. British J. of Dermatology. 2007; 156 (3): 486-491.
7. Гудкова Ю.И. Микозы кожи и ее придатков у пациентов, длительно получающих системные глюкокортикостероиды: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб. 2006: 21 с. [Gudkova Yu.I. Mikozyi kozhi i ee pridatkov u patsientov, dlitelno poluchayuschih sistemnyie glyukokortikosteroidyi: Avtoref. dis. ... kand. med. nauk. SPb. 2006: 21 s.]

Поступила в редакцию журнала 30.08.2017

Рецензент: В.В. Шевченко



АНАЛИЗ СОСТАВА МИКРОБИОТЫ ПРИ МИКОТИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПАХОВОЙ ОБЛАСТИ

¹Хисматулина И.М. (ассистент кафедры)*,
¹Абдрахманов Р.М. (зав. кафедрой), ²Халдеева
Е.В. (зав. лаб.), ²Глушко Н.И. (с.н.с.), ²Лисовская С.А
(в.н.с.)²

¹Казанский государственный медицинский университет
МЗ РФ (кафедра дерматовенерологии; ²Казанский НИИ
эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора
(лаборатория микологии), Казань, Россия

© Коллектив авторов, 2017

Дерматомикозы вносят весомый вклад в структуру дерматологической заболеваемости как в нашей стране, так и по всему миру. Наиболее часто встречающимися формами грибковых поражений кожи являются микозы стоп и крупных складок. Микотические поражения кожи паховой области вызывают различные патогенные и условно-патогенные грибы. Среди них встречаются как истинные дерматомицеты (дерматофиты) (*Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton* spp.), так и дрожжеподобные и плесневые грибы. В последнее время особенно возросла роль грибковых ассоциаций.

Цель данного исследования – анализ состава микробиоты кожи пациентов с микотическим поражением паховой области. В ходе работы было обследовано 95 больных микозом паховых складок за период 2013-2016 гг. Всем пациентам проводили культуральное исследование биологического материала, отобранного методом соскоба с кожи паховых складок. При анализе состава микробиоты кожи паховой области выявили преимущественную колонизацию (76,8%) дерматомицетами, а также дрожжеподобными грибами (23,2%). Это предопределило выбор антимикотического препарата широкого спектра действия для лечения микозов данной локализации.

Ключевые слова: дерматомицеты, микотическое поражение кожи, микробиота, паховая область

ANALYSIS OF THE MICROBIOTA IN PATIENTS WITH MYCOTIC LESIONS OF THE INGUINAL AREA

¹Khismatulina I.M. (assistant of the chair),
¹Abdrakhmanov R.M. (head of the chair), ²Khaldeeva
E.V. (head of the laboratory), ²Glushko N.I. (senior
scientific collaborator), ²Lisovskaya S.A. (leading
scientific collaborator)

¹ Kazan State Medical University (chair of dermatology and
venereology); ² Kazan Research Institute of Epidemiology and
Microbiology (laboratory of mycology), Kazan, Russia

© Collective of authors, 2017

*Dermatomycoses make a significant contribution to the structure of dermatological diseases in our country and around the world. The most common forms of fungal infections of the skin are athlete's foot and fungal infections of the large folds. Mycotic skin lesions in the groin area are caused by various pathogenic and opportunistic fungi. Some of them are as true dermatomycetes (dermatophytes): *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton* spp., and yeast-like and mold fungi. In recent years a role of fungal associations especially increased. The purpose of this study was to analyze the composition of skin microbiota in patients with mycotic lesion of the groin. In the course of work 95 patients with mycosis inguinal folds for the period 2013-2016 were examined. All patients conducted the cultural*

* Контактное лицо: Хисматулина Ирина Мансуровна,
e-mail: xomenko-aa@mail.ru

study of biological material selected by a method of scraping from the skin of inguinal folds. Analysis of the composition of the microbiota of the skin of the inguinal region showed preferential colonization (76,8%) of dermatomycetes, yeast-like fungi – 23,2%. This determined the choice of antifungal drug for the treatment of mycotic infections of this localization.

Key words: dermatomycetes, groin area, microbiota, mycotic lesions of the skin

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы грибковых поражений кожи обусловлена, прежде всего, тем, что они вносят весомый вклад в структуру дерматологической заболеваемости как в нашей стране, так и по всему миру. При этом количество пациентов с микотической патологией имеет тенденцию к росту. По данным ВОЗ, у 20% населения планеты наблюдают различные формы грибковых заболеваний, в структуре дерматологических больных микозы составляют 25%. При этом среди грибковых поражений кожи, как правило, преобладают микозы стоп и крупных складок [1, 2].

Клинически сходные микотические поражения кожи паховой области вызывают различные патогенные и условно-патогенные грибы. Среди них встречаются истинные дерматомицеты: *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton* spp. (*Trichophyton mentagrophytis* var. *interdigitale* и *Trichophyton rubrum*), дрожжеподобные грибы рода *Candida* и плесневые грибы. Последние наиболее часто обнаруживают в ассоциации с дрожжеподобными грибами.

Цель работы – анализ состава микробиоты кожи паховых складок при их микотическом поражении [3, 4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 95 пациентов (n=95) с микотическим поражением паховых складок – 81 мужчина и 14 женщин в возрасте от 15 до 86 лет (медиана – 42 года) за период 2013-2016 гг. Всем больным проводили сбор анамнестических данных, объективный осмотр. У всех 95 человек (100%) диагноз был подтвержден микроскопическим исследованием с КОН. Материалом для исследования служили чешуйки с очагов на коже паховых складок. Для постановки диагноза паховой эпидермофитии или кандидоза использовали клинические и лабораторные критерии Федеральных клинических рекомендаций 2013 г. и 2015 г. Российского общества дерматовенерологов и косметологов [5].

Для анализа состава микробиоты кожи в очаге поражения всем пациентам (100%) проводили культуральное исследование на среде Сабуро. Биоматериал был отобран методом соскоба с кожи паховой области. При этом в исследование не включали лиц, применявших местные или системные противогрибковые препараты менее чем за 10 дней до забора биоматериала.

Всем больным назначали наружную терапию местным антимикотиком широкого спектра действия 2 раза в сутки до клинического излечения, а затем еще в течение 1 недели. В качестве противогрибкового средства применяли 2% крем сертаконазола, рекомендованный при лечении различных клинических форм дерматомикозов [6, 7].

Для контроля эффективности терапии через 7 дней после ее окончания выполняли микроскопическое исследование.

Медико-биологические данные обрабатывали

с помощью программной системы STATISTICA for Windows (версия 6.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из 95 пациентов с микозами паховых складок большую часть составляли мужчины – 85%, женщины – 15%. Клинически у всех 100% больных был выявлен интертригинозный дерматит с присоединением микробиоты (с микроскопическим подтверждением), так называемый микоз крупных складок, локализованный в паховой области. Поражение кожи характеризовалось появлением в паховых складках, на внутренней поверхности бедер ярко-розовых пятен с выраженным шелушением, четкими границами, гиперемированным воспалительным валиком по периферии. В центре очагов наблюдали разрешение воспалительных явлений. Субъективно пациентов беспокоил зуд.

При микологическом исследовании присутствие грибов отмечали у всех 95 пациентов (100%). Видовой состав микробиоты кожи паховой области был следующим. Чаще всего (у 73 пациентов, 76,8%) в качестве возбудителя заболевания обнаруживали дерматомицеты (*E. floccosum* и *Trichophyton* spp.) (Рис. 1).

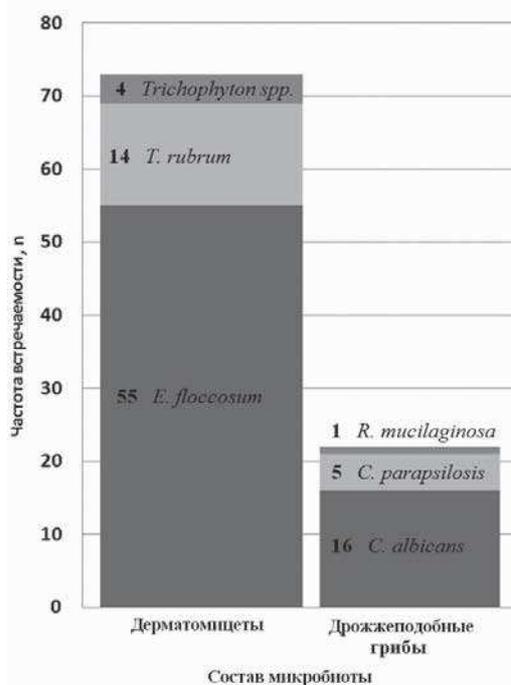


Рис. 1. Состав микробиоты при микотическом поражении паховых складок.

Основным возбудителем, выделенным с кожи пораженной паховой области, был *E. floccosum*, составивший 75,3% (n=55) от всех дерматомицетов. Вторым по частоте встречаемости грибковым агентом из этой группы возбудителей был *T. rubrum*, который в структуре дерматомицетов составил 19,2% (n=14). У 4 пациентов (5,5% от всех дерматомицетов) обнаружили *Trichophyton* spp., до вида идентифицировать возбудитель не удалось.

Дрожжеподобные грибы *Candida albicans* и *C. parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* при микозах паховых складок выявили у 23,2% (n=22) больных. Среди дрожжеподобных грибов в 72,7% случаев в составе ассоциаций превалировала *C. albicans*. Длительное течение кандидозной инфекции (*C. albicans* и *C. parapsilosis*) осложнялось присоединением плесневых грибов (в т.ч. *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *Penicillium* spp.) в 7,4% случаев (n=7).

В качестве сопутствующей микробиоты отмечали колонизацию кожи эпидермальным и золотистым стафилококком, а также палочковой биотой в умеренном количестве.

При наружной терапии применяли 2% крем сертаконазола дважды в день. Клиническое излечение наступило у 100% больных (n=95) в течение 10,7 дней (Рис. 2). Затем местную терапию продолжали еще 7 дней, после чего проводили контрольное микроскопическое исследование. У всех 95 пациентов (100%) в соскобах с кожи паховых складок элементов гриба не обнаружили.

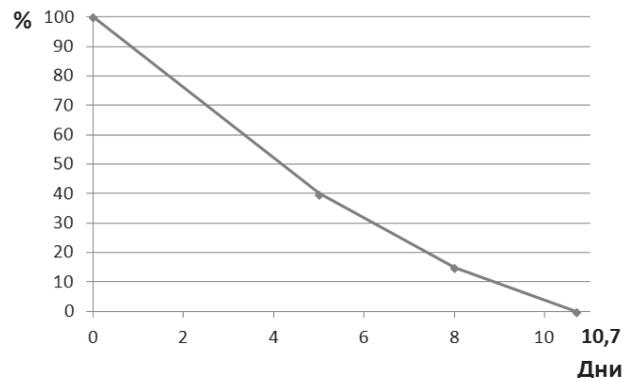


Рис. 2. Динамика этиологического излечения больных микозами паховых складок.

Отметим, что при применении сертаконазола в данной схеме лечения у больных с микотическим поражением паховых складок нежелательных явлений зафиксировано не было.

ВЫВОДЫ

Таким образом, у пациентов с однородными клиническими проявлениями микоза паховых складок доля дерматомицетов (*E. floccosum* и *Trichophyton* spp.) составила 76,8% (n=73). При этом у большинства пациентов (n=55) превалировал *E. floccosum*. Дрожжеподобные грибы при микозах паховых складок обнаруживали в 23,2% случаев (n=22). Наиболее часто выявляли *C. albicans*. При длительном течении инфекции в 7,4% случаев к дрожжеподобным грибам присоединялись плесневые.

Это является важным практическим аспектом с позиции терапии. Применение местного антимикотика широкого спектра действия 2 раза в сутки привело к клиническому и микологическому излечению у 100% (n=95) больных. Назначенная схема наружной терапии показала свою эффективность и безопасность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова М.А., Огрызко Е.В., Бендриковская И.А. и соавт. Динамика заболеваемости дерматомикозами в Российской Федерации в 2003-2007 гг. Клиническая дерматология и венерология. 2009. №2: 26-31 [Ivanova M.A., Ogryzko E.V., Bendrikovskaya I.A. i soavt. Dinamika zaboлеваemosti dermatomikozami v Rossiyskoy Federatsii v 2003-2007 gg. Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya. 2009; №2: 26-31. (In Russ)]

2. *Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В.* Грибковые инфекции: Руководство для врачей. М: Бином, 2008; 480 с. [Sergeev A.Yu., Sergeev Yu.V. Gribkovyye infektsii: Rukovodstvo dlya vrachey. M: Binom, 2008; 480 s. (In Russ)]
3. *Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В.* Новые информационные технологии и дистанционное обучение пациентов – перспективный способ борьбы с массовыми микозами человека. Успехи медицинской микологии. 2007. Т.10: 15. [Sergeev A.Yu., Sergeev Yu.V. Novyye informatsionnyie tehnologii i distantsionnoe obuchenie patsientov – perspektivnyiy sposob borbyi s massovymi mikozami cheloveka. Uspеhi meditsinskoy mikologii. 2007; T.10: 15. (In Russ)]
4. *Матушевская Е.В., Свиричевская Е.В.* Нафтифин в терапии грибковых инфекций кожи: 40 лет успеха. Вестник дерматологии и венерологии. 2014. №2: 72-77. [Matushevskaya E.V., Svirshevskaya E.V. Naftifin v terapii gribkovyih infektsiy kozhi: 40 let uspeha. Vestnik dermatologii i venerologii. 2014; №2: 72-77(In Russ).]
5. *Федеральные клинические рекомендации.* Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. – 5-е изд., перераб. и доп. М.: Деловой экспресс. 2016; 768 с. [Federalnyie klinicheskie rekomendatsii. Dermatovenerologiya 2015: Bolezni kozhi. Infektsii, pere-davaemyie polovym putem. – 5-e izd., pererab. i dop. M.: Delovoy ekspress. 2016; 768 s. (In Russ)]
6. *Дерматовенерология.* Национальное руководство. Краткое издание. Под ред. Ю.С. Бутова, Ю.К. Скрипкина, О.Л. Иванова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013; 896 с. [Dermatovenerologiya. Natsionalnoe rukovodstvo. Kratkoe izdanie. Pod red. Yu.S. Butova, Yu.K. Skripkina, O.L. Ivanova. M.: GEOTAR-Media, 2013; 896 s. (In Russ)]
7. *Котрехова Л.П., Разнатовский К.И., Цурупа Е.Н. и др.* Опыт эффективного применения сертаконазола в терапии дерматомикозов. Проблемы медицинской микологии. 2017; №1: 18-24. [Kotrehova L.P., Raznatovskiy K.I., Tsurupa E.N. i dr. Opyit effektivnogo primeneniya sertakonazola v terapii dermatomikozov. Problemyi meditsinskoy mikologii. 2017; №1: 18-24. (In Russ)]

Поступила в редакцию журнала 14.08.2017

Рецензент: Т.С. Богомолова



СРАВНИТЕЛЬНЫЙ УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ПОРОВОГО АППАРАТА СЕПТ КЛЕТОК ПЛОДОВЫХ ТЕЛ У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА MYCENA

¹Степанова А.А. (зав. лаб.), ²Кост Г. (зав. отд.),
²Рексер К.-Х. (ассист. проф.)

¹ НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; ² Марбургский Университет им. Филлиппса, Факультет биологии, Отдел микологии, Марбург, Германия

© Коллектив авторов, 2017

В статье приведены данные по ультраструктуре порового аппарата септ клеток плодовых тел 24 видов грибов из рода *Mycena*. Выявлено, что: 1) в составе порового аппарата септ изученных видов отсутствуют наружные колпачки долипоров; 2) 37,5% видов имели не типичные для агариковых грибов сплошные парентесомы, а остальные – перфорированные. По форме, строению (отсутствие или наличие «оконов») и топографии парентесом относительно долипорового утолщения у изученных видов описано 4 типа долипоровых аппаратов. Полученные данные свидетельствуют о гетерогенности и искусственности рода *Mycena*. Показана возможность использования ультраструктуры порового аппарата септ для решения вопросов систематики рода *Mycena*.

Ключевые слова: внутривидовая таксономия, клетки плодовых тел, *Mycena*, парентесомы, септальный поровый аппарат, ультраструктура

COMPARATIVE ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF SEPTAL PORE APPARATUS IN THE CELLS OF FRUIT BODIES IN SOME SPECIES OF THE GENUS MYCENA

¹Stepanova A.A. (head of lab.), ²Kost G. (head of dep.), ²Rexer K.-H. (ass. prof.)

¹ Kashkin Research Institute of Medical Mycology of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia; ² Philipps-Universität Marburg, FB Biologie, Systematic Botany & Mycology, Marburg, Germany

© Collective of authors, 2017

The ultrastructure of the septal pore apparatus in the fruit body cells of 24 species from the genus *Mycena* was investigated. It was established that: 1) in all species examined the outer caps as the components of the septal pore apparatus were absent, 2) 37,5% of investigated species possess with continuous parenthesomes uncharacteristic for the agaricalean fungi, the rest of them had typical perforated parenthesomes. Four types of dolipore apparatus were recognized based on the structure (the presence or absence of holes) as well as the topography of parenthesomes with respect to the dolipore swellings. These types indicate that the genus *Mycena* is very heterogeneous and artificial. The potentials of septal pore apparatus for the solution of problems of the systematics of the genus *Mycena* were demonstrated.

Key words: fruit body cells, generic rank taxonomy, *Mycena*, parenthesomes, septal pore apparatus, ultrastructure.

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

INTRODUCTION

The genus *Mycena* contains many species of basidiomycetes, in which the bioactivity has been reported. The structure of many of these bioactive metabolites have been identified [Baurele J., Anke T. *Planta medica*. 1980. V.39; Hutzel H., et al. *J. Antibiotics*. 1990. V.43]. Different species of this genus are capable to producing bioactive compounds such as antimicrobial and cytotoxic metabolites [Jenete R., et al. *Phytochem*. 1985. V. 24], antifungal metabolites (again *Candida lipolytica*) produced by *M. leptoccephala* [Vahidi H., et al. *Afric. J. Biotech*. 2004; V.3, №11], polysaccharides with anticarcinogenic effects and possibility inhibited the growth of sarcoma and Ehrlich solid cancers [*M. laevigata*: Ohtsuka S., et al. UK Patent 1331513, 1973], antifungal antibiotics hydroxystrobilurin D (3) [*M. sanguinolenta*: Backens S., et al. *Leibigs Annalen der Chemie*. 1988. V. 5]. For *M. galopus* mycelium specific production of monoclonal antibody [Hitchcock P., et al. *Mycol. Res*. 1997. V. 101]. It may be possible find in future time new medicinally important *Mycena* species in some phylogenetically closely related groups.

The ultrastructure of the septal pore apparatus is a very stable character and therefore it is now widely used for the delimitation and identifications of various fungal taxa [Moore R.T. *Mycologia*. 1978. V. 70; Patton A.M., Marchant R.A. *J. Gen. Microbiol*. 1978. V. 109; Khan S.R., Kimbrough J.W. *Mycotaxon*. 1982. V. 15; Stepanova A.A., Vasilyev A.E. *Mycol. and Phytopathol*. 1988. V. 22; Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a; Nakai Y. *Rep. Tottori Mycol. Inst*. 1986. V. 24; Wells K. *Mycologia*. 1994. V. 86]. However, the TEM technique was not so far used for solution of problems of systematics of agaricalean fungi at the generic level. So that it was interesting to initiate septal pore ultrastructure study using *Mycena* as a model genus. The first investigation we undertaken [1] concerned septal pore apparatus ultrastructure in two species of this genus. It showed the presence of both perforated (*M. hiemalis*) and continuous (*M. galopus*) parenthesomes. In the study presented below the number of the species was enlarged and morphometrical data were included in comparative analysis.

MATERIALS AND METHODS

In present work we investigated 24 species: *Mycena amicta* (Fr.) Quél., *M. clavularis* (Batsch) Sacc., *M. corynephora* Maas Geest., *M. filopes* (Bull.) P. Kumm., *M. galericulata* (Scop.) Gray, *M. galopus* (Pers.) P. Kumm., *M. hiemalis* (Osbeck) Quél., *M. inclinata* (Fr.) Quél., *M. leptoccephala* (Pers.) Gillet, (23.09.2002), *M. meliigena* (Berk. & Cooke) Sacc., *M. metata* (Secr. ex Fr.) P. Kumm. (18.10.2002), *M. niveipes* (Murrill) Murrill, *M. pterigena* (Fr.) P. Kumm., *M. pura* (Pers.) P. Kumm., *M. rosella* (Fr.) P. Kumm., *M. stylobates* (Pers.) P. Kumm., *Hemimycena lactea* (Pers.) Singer: Marburg's surroundings (Germany), det. Rexer K.-H.; *M. sanguinolenta* (Alb. & Schwein.) P. Kumm., *M. speirea* (Fr.) Gillet: Russia, St. Petersburg, Botanical Garden (28.08.2003), *M. capillaripes* Peck, *M. epipterygia* var. *epipterygia* (Scop.) Gray, *M. haematopus* (Pers.) P. Kumm., *M. leptophylla* (Peck) Sacc., *M. vitilis* (Fr.) Quél.: Russia, St. Petersburg, park Sosnovka (9.09.2002), det. Morozova O.

The pieces from all parts of developing fruit bodies of different ages were fixed as it was described earlier

[Traquair R.F., McKeen W.E. Can. J. Bot. 1978. V.24]. The characteristic features of the fine structure of septal pore apparatus in various parts of fruit bodies were described. The median thin sections of more than 25 septal pore apparatus of subhymenial cells in fruit bodies of different ages were examined. The size of holes in the parentheses and the distance between their centers on paradermal sections were measured. Confidence intervals were calculated using Microsoft Office Excel.

RESULTS AND DISCUSSION

In all 24 studied species the outer caps in their septal pore apparatus were absent. For the intact subhymenial cells of all species were typical the straight three-layered septa with two electron dense outer layers separated by the electron transparent layer that extended into dolipore swelling (Fig. 1 b). The septum thickness varies from 0,02 to 0,08 µm and was constant for each investigated species (Table 1). As a rule, the septum thickness was in the direct correlation with the size of dolipore swellings. The exceptions are *M. hiemalis*, *M. inclinata* and *M. galopus* for which thick septa and small dolipore swellings were typical.

According to the size (the height and width at the level of the septum) of dolipore swellings, all investigated species are divided into four groups. Characteristic of the first group that is represented by only two species (8,3 % of all investigated species) are the largest (0,52-0,55 x 0,50-0,53 µm) dolipore swellings. Six species (or 25,0 %) constitute the second group with their dolipore swellings varying within the intervals of 0,40-0,43 x 0,37-0,50 µm. The third group consists 12 species (50,0 %), in which the size of their dolipore swellings varies within the intervals 0,29-0,38 x 0,32-0,41 µm. And finally, the fourth group that is composed of four species (16,6 %) has the smallest dolipore swellings (0,22-0,27 x 0,26-0,40 µm). In the majority of the species, the height of the dolipore swelling was smaller than its width. Exceptions were *M. clavularis*, *M. stylobates*, *M. corynephora* and *M. filopes* where the proportion was reverse, and *M. sanguinolenta* and *H. lactea*, where these two parameters were equal.

In the species studied here, the diameter of the canal of the dolipores varied from 0,08 to 0,16 µm. No correlation has been found between the size of the dolipore swellings and the diameter of the pores.

Table 1

The sizes of the septa and dolipore swellings in the fruit bodies subhymenial cells of some <i>Mycena</i> species				
Species	The septa thickness, µm	The height and width of dolipore swellings, µm	Diameter of the septal pore, µm	The type of dolipore apparatus
<i>M. clavularis</i>	0,05±0,0017	0,55±0,0017 0,53±0,0018	0,09±0,0017	d
<i>M. stylobates</i>	0,06±0,0249	0,52±0,0033 0,50±0,0465	0,09±0,0124	d
<i>M. leptocephala</i>*	0,04±0,0005	0,43±0,0249 0,44±0,0249	0,10±0,0017	a
<i>M. vitilis</i>	0,07±0,0012	0,42±0,0008 0,50±0,0023	0,16±0,0015	d
<i>M. rosella</i>	0,05±0,0040	0,41±0,0124 0,43±0,0498	0,11±0,0498	a
<i>M. epipterygia</i> <i>var. epipterygia</i>	0,05±0,0017	0,40±0,0045 0,41±0,0034	0,09±0,0177	a
<i>M. corynephora</i>	0,04±0,0083	0,40±0,0285 0,37±0,0012	0,10±0,0287	d

<i>M. sanguinolenta</i>	0,05±0,0124	0,40±0,0124 0,40±0,0207	0,10±0,0179	c
<i>M. pura</i>	0,04±0,0124	0,38±0,0207 0,40±0,0124	0,13±0,0083	d
<i>M. meliigena</i>	0,04±0,0083	0,37±0,0028 0,38±0,0028	0,09±0,1245	c
<i>M. amicta</i>	0,03±0,0017	0,37±0,0207 0,41±0,0249	0,10±0,0124	d
<i>H. lactea</i>	0,06±0,0017	0,37±0,0207 0,37±0,0332	0,08±0,0249	a
<i>M. niveipes</i>	0,04±0,0083	0,33±0,0249 0,40±0,0124	0,40±0,0124	c
<i>M. speirea</i>	0,03±0,0124	0,32±0,0124 0,36±0,0207	0,12±0,0011	d
<i>M. leptophylla</i>	0,06±0,0005	0,32±0,0015 0,40±0,0015	0,12±0,0015	d
<i>M. capillaripes</i>	0,03±0,0005	0,32±0,0034 0,37±0,0114	0,09±0,0017	b
<i>M. metata</i>	0,04±0,0017	0,31±0,0456 0,38±0,0083	0,11±0,0012	d
<i>M. haematopus</i>	0,04±0,0014	0,30±0,0035 0,35±0,0047	0,12±0,0571	c
<i>M. galopus</i>	0,07±0,0016	0,30±0,0360 0,32±0,0240	0,12±0,0166	a
<i>M. inclinata</i>	0,07±0,066	0,29±0,0249 0,33±0,0243	0,09±0,0017	a
<i>M. filopes</i>	0,02±0,1245	0,27±0,0008 0,26±0,0207	0,08±0,0076	d
<i>M. hiemalis</i>	0,08±0,0034	0,26±0,0045 0,40±0,0332	0,13±0,0028	d
<i>M. galericulata</i>	0,05 ± 0,1207	0,25±0,0207 0,31±0,0249	0,09±0,0083	a
<i>M. pterigena</i>	0,05 ± 0,0041	0,22±0,0249 0,31±0,0705	0,10±0,0023	a

Note. * Here and also in Tables 2 and 3 the names of the species with the continuous parentheses are in bold letters.

To run a few steps forward, table 1 show that the species containing septal pore apparatus with perforated parentheses occur as often as those containing continuous parentheses. The obtained data demonstrated (Tables 1 and 2, Fig. 2, Fig. 1a-f, Fig. 3 a) that 37,5 % from 24 species possess with continuous parentheses and 62,5 % are distinguished by perforated parentheses with numerous holes (Fig. 2 c, d, Fig. 1 g-i). Four types of dolipore apparatus (Fig. 2) can be identified among the investigated species according to the presence or absence of holes, outlines and topography of parentheses in relation to the dolipore swellings.

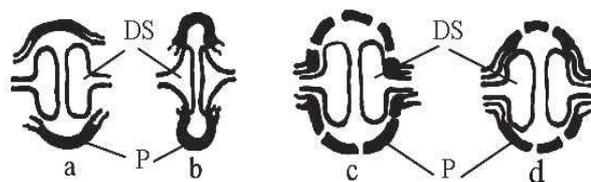


Fig. 2. Schematic diagrams of the four types of dolipore apparatus in some species of the genus *Mycena* and *Hemimycena lactea*: (a), continuous arched parentheses that are located at some (variable) distance from dolipore swelling; (b), continuous parentheses that have horseshoe outline and almost touch the dolipore swellings; (c), perforated hemispherical parentheses that envelope dolipore swelling and come closely to the septum; (d), perforated hemispherical parentheses that set against the oblique borders of dolipore swellings.

a – *M. epipterygia*, *M. galericulata*, *M. galopus*, *M. inclinata*, *M. leptocephala*, *M. pterigena*, *M. rosella*, *H. lactea*; **b** – *M. capillaripes*; **c** – *M. haematopus*, *M. meliigena*, *M. niveipes*, *M. sanguinolenta*; **d** – *M. amicta*, *M. clavularis*,

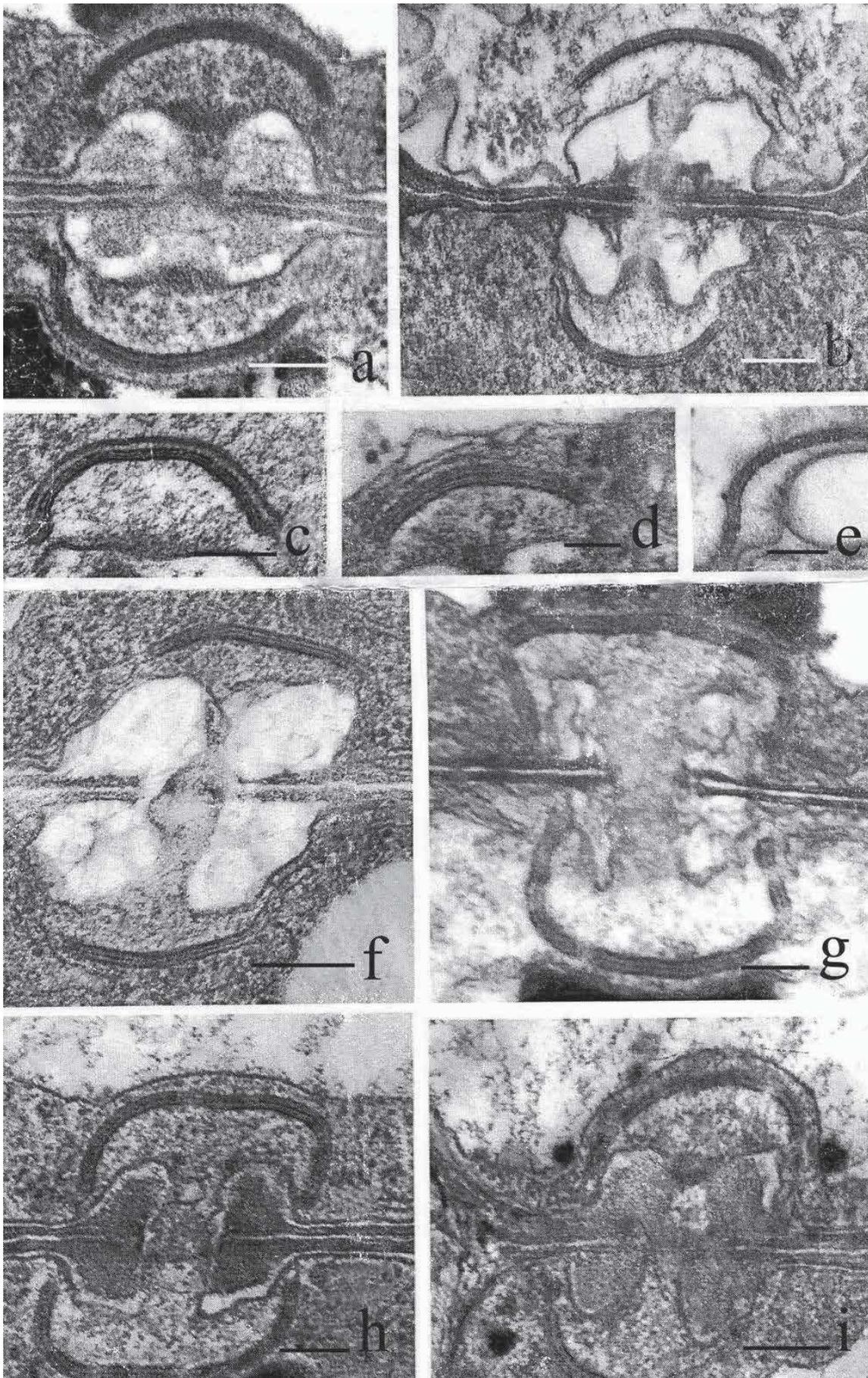


Fig. 1. Ultrastructure of the septal pore apparatus in the cells of subhymenium: a - *M. galopus*, b - *M. galericulata*, c - *M. pterigena*, *M. leptcephala*, *M. capillaripes*, f - *M. filopes*, g - *M. meliigena*, h - *M. niveipes*, i - *M. metata*. Bars: a - i - 0,1 μ m.

M. corynephora, *M. filopes*, *M. hiemalis*, *M. leptophylla*, *M. metata*, *M. pura*, *M. vitilis*, *M. speirea*, *M. stylobates*.

DS – dolipore swelling, P – parenthesome, S – septum.

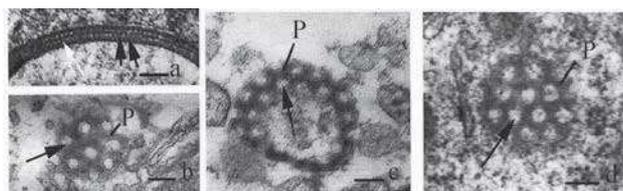


Fig. 3. Ultrastructure of the parenthesomes in the cells of subhymenium: a - *M. galericulata*, b - *M. meliigena*, c - *M. speirea*, d - *M. metata*. Bars: a - 0,1 μm, b-d - 0,5 μm.

Eight species, or 33,8 % (*Mycena leptocephala*, *M. galericulata*, *M. epipterygia*, *M. inclinata*, *M. galopus*, *M. pterigena*, *M. rosella* and *H. lactea*) have dolipore apparatus with the continuous arched parenthesomes (Fig. 2 a), that are located at some (variable) distance (0,01-0,14 μm) from dolipore swellings. This distance depends on the physiological conditions of the adjacent cells of a hypha. Only in *M. capillaripes* (4,2 % of investigated species), dolipore swellings have continuous arched horseshoe-shaped parenthesomes with their borders set against the dolipore swellings or lying at some distance (0,02-0,06 μm) from it (Fig. 2 b). Four species or 16,6 % (*M. meliigena*, *M. haematopus*, *M. sanguinolenta* and *M. niveipes*) have dolipore apparatus with perforated hemispherical parenthesomes that envelope dolipore swellings and come closely to the septum (Fig. 2 c). The remaining 11 species, or 45,8 % (*M. speirea*, *M. corynephora*, *M. hiemalis*, *M. pura*, *M. amicta*, *M. clavularis*, *M. filopes*, *M. metata*, *M. vitilis*, *M. stylobates* and *M. leptophylla*) have the dolipore apparatus with perforated hemispherical parenthesomes that were set against the borders of the dolipore swelling (Fig. 2 d). The parenthesomes in the young and mature fruit body cells of the species of all four groups as a rule were continuous with the cistern of endoplasmic reticulum lying on each side of the septum. However, in some mature cells these cisterns were not revealed in the vicinity of the septum.

The parenthesome membranes (regardless of the dolipore type) are three-layered and asymmetric (with the thicker outer layer, Fig. 1 c, d, f, h, arrow, Fig. 3 a, double arrows). The inner (in accordance of dolipore swelling) parenthesome membrane (i.e. facing the dolipore swelling) is thicker and more electron opaque than the outer one. In all species the dark lamella lying inside parenthesome is located at the equal distance from the outer and inner membranes regardless of the dolipore type (Fig. 3 a, double arrows). Only in *M. pterigena* the lamella is displaced towards the inner parenthesome membrane (Fig. 1 c, arrow). In *M. corynephora* and *M. stylobates* it is the thickest and most electron-dense of all species studied. In *M. galericulata* (Fig. 3 a, white arrow) and *M. leptocephala*, the transversely oriented electron dense “bridges” are found that connect the lamella with both parenthesome membranes. Previously similar electron dense “bridges” was revealed inside parenthesomes of *Pleurotus cystidiosus* [Moore R.T., Patton A.M. Mycologia. 1975. V. 67] and *Hirschioporus pargamensis* (syn. *Trichaptum pargamenum*) [Traquair R.F., McKeen W.E. Can. J. Bot. 1978. V.24].

The parenthesome thickness was stable and typical for each species. It does not depend on the type and development stage of the cell. The value of the parenthesome thickness varies dependent on the fungal species from 0,02 to 0,04

μm (Table 2).

Table 2

The quantitative parameters of parenthesomes in the fruit bodies subhymental cells of some *Mycena* species

Species	Parenthesome thickness, μm	Distance from the centre of the septal pore to parenthesome, μm	Diameter of parenthesome holes, μm	Distance between the centers of the holes, μm	Type of dolipore apparatus
<i>M. stylobates</i>	0,04	0,40±0,0047	0,05x0,06	0,14	d
<i>H. lactea</i>	0,04	0,29±0,0033	---	---	a
<i>M. galopus</i>	0,04	0,28±0,0050	---	---	a
<i>M. galericulata</i>	0,04	0,23±0,0057	---	---	a
<i>M. pterigena</i>	0,04	0,23±0,0017	---	---	a
<i>M. leptocephala</i>	0,03	0,37±0,0026	---	---	a
<i>M. inclinata</i>	0,03	0,31±0,0124	---	---	a
<i>M. epipterygia</i> var. <i>epipterygia</i>	0,03	0,23±0,0028	---	---	a
<i>M. rosella</i>	0,03	0,28±0,0200	---	---	a
<i>M. capillaripes</i>	0,03	0,27±0,0571	---	---	b
<i>M. metata</i>	0,03	0,31±0,0053	0,05x0,06	0,07	d
<i>M. sanguinolenta</i>	0,03	0,29±0,0267	0,05x0,06	0,08	c
<i>M. pura</i>	0,03	0,28±0,0200	0,05x0,06	0,05 x 0,06	d
<i>M. leptophylla</i>	0,03	0,24±0,0026	0,05x0,06	0,13	d
<i>M. filopes</i>	0,03	0,26±0,0026	0,04x0,05	0,07	d
<i>M. niveipes</i>	0,03	0,28±0,0028	0,04x0,05	0,07	c
<i>M. vitilis</i>	0,03	0,33±0,0022	0,04x0,05	0,07	d
<i>M. clavularis</i>	0,03	0,41±0,0017	0,04x0,05	0,08	d
<i>M. corynephora</i>	0,03	0,30±0,0032	0,04x0,05	0,10	d
<i>M. speirea</i>	0,03	0,32±0,0034	0,03x0,04	0,07	d
<i>M. haematopus</i>	0,03	0,26±0,0025	0,03x0,05	0,07	c
<i>M. hiemalis</i>	0,03	0,28±0,0044	0,03x0,06	0,09	d
<i>M. amicta</i>	0,03	0,26±0,0028	0,03x0,04	0,11	d
<i>M. meliigena</i>	0,02	0,22±0,0012	0,02x0,03	0,08	c

Note: The confidence intervals for parenthesome thickness, diameters of the holes and the distance between the centers of parenthesome holes are constant and therefore they are not given in the table.

According to the parenthesome thickness, the species studied here can be divided into three groups. In the first group containing five species (20,8%) dolipores have the thick (0,04 μm) parenthesomes. It should be noted that only one species (*M. stylobates*) in this group has perforated parenthesomes, and the other four (*H. lactea*, *Mycena galopus*, *M. galericulata* and *M. pterigena*) have the **a**-type (continuous) parenthesomes. In the second, most numerous (18 species, or 75,0 %) group, parenthesomes are either continuous (**a** and **b** types) or perforated (**c** and **d** types) and they have middle thickness (0,03 μm). The third group with only one species (4,1%) is characterized by the thinnest parenthesomes (**c** type). No correlation was found between parenthesome thickness and the size of dolipore swellings (see Tables 1 and 2).

It is apparent from Tables 1 and 3 that the second and fourth types of dolipore apparatus, the width of parenthesomes are smaller than width of the dolipore swelling. For the exception *M. galopus* where continuous parenthesomes were somewhat wider than the dolipore swelling. The width of parenthesomes in the third (**c**) type of dolipore apparatus was larger, than that of swelling.

In the species with perforated parenthesomes the holes were numerous and ellipsoid in outlines (Table 2, Fig. 3 b-d, arrows). No correlations between the diameter of parenthesome holes and parenthesome topography relative to dolipore swelling as well as between the size of the dolipore swellings and diameters of parenthesomes holes were found.

Table. 3

The qualitative parameters of the parentheses in the fruit bodies subhymenial cells of some *Mycena* species

Species	Height and width of parentheses, μm	Form (proportion of its height to width) of parentheses, μm	Type of dolipore apparatus
<i>M. clavularis</i>	0,53 ± 0,0207 0,15 ± 0,0124	0,28	d
<i>M. niveipes</i>	0,42 ± 0,0017 0,14 ± 0,0021	0,33	c
<i>M. hiemalis</i>	0,41 ± 0,0019 0,14 ± 0,0019	0,34	d
<i>M. stylobates</i>	0,40 ± 0,0045 0,12 ± 0,0014	0,30	d
<i>M. sanguinolenta</i>	0,40 ± 0,0026 0,13 ± 0,0012	0,33	c
<i>M. leptocephala</i>	0,40 ± 0,0010 0,14 ± 0,0011	0,35	a
<i>M. meliigena</i>	0,40 ± 0,0029 0,13 ± 0,0000	0,33	c
<i>M. pura</i>	0,39 ± 0,0124 0,11 ± 0,0000	0,28	d
<i>M. rosella</i>	0,38 ± 0,0332 0,10 ± 0,0115	0,26	a
<i>M. epipterygia</i> var. <i>epipterygia</i>	0,38 ± 0,0083 0,08 ± 0,0124	0,21	a
<i>M. amicta</i>	0,38 ± 0,0000 0,12 ± 0,0083	0,31	d
<i>M. vitilis</i>	0,41 ± 0,0118 0,13 ± 0,0059	0,31	d
<i>M. haematopus</i>	0,37 ± 0,0029 0,11 ± 0,0012	0,29	c
<i>M. metata</i>	0,36 ± 0,0011 0,12 ± 0,0011	0,33	d
<i>M. leptophylla</i>	0,33 ± 0,0177 0,08 ± 0,0000	0,24	d
<i>M. galopus</i>	0,32 ± 0,0031 0,10 ± 0,0115	0,31	a
<i>M. corynephora</i>	0,32 ± 0,0017 0,11 ± 0,0000	0,34	d
<i>M. spiorea</i>	0,32 ± 0,0034 0,11 ± 0,0000	0,34	d
<i>M. inclinata</i>	0,30 ± 0,0017 0,12 ± 0,0012	0,40	a
<i>M. galericulata</i>	0,28 ± 0,0031 0,09 ± 0,0013	0,32	a
<i>M. pterigena</i>	0,28 ± 0,0017 0,09 ± 0,0017	0,32	a
<i>H. lactea</i>	0,28 ± 0,0028 0,08 ± 0,0000	0,28	a
<i>M. capillaripes</i>	0,28 ± 0,0063 0,11 ± 0,0000	0,39	b
<i>M. filopes</i>	0,24 ± 0,0011 0,05 ± 0,0000	0,20	d

As it is evident from Table 3, the widest parentheses were typical for *M. clavularis*; the narrowest occur in *M. filopes*. In accordance with this, most elongate parentheses were typical for the first species and the lowest for the second one. The parentheses parameters of the other species studied occupy intermediate position.

According to the data of this work, a characteristic feature of the septal pore ultrastructure not only of the subhymenial cells, but also all types of developing fruit body cells in the species of the genus *Mycena* was the absence of outer caps (that is the portion of highly differentiated cytosol located from the outside of the parentheses). It is appropriate mention here that by the absence of the outer caps in the septal pore apparatus, the investigated species of *Mycena* differ profoundly not only from the other previously investigated species from the family *Tricholomataceae* (*Tricholoma focale* – syn.

Tr. robustum) [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Mycol. and Phytopathol. 1988. V.22; Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a], *Physalacriaceae* (*Flammulina velutipes*) [Koida M.A. Dissert., 1999], but also from all so far investigated species of the agaricalean fungi [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Mycol. and Phytopathol. 1988. V.22; Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a; McLaughlin D.J. Amer. J. Bot. 1972. V.59; McLaughlin D.J. Protoplasma. 1974. V.82; McLaughlin D.J. Ultrastructure and cytochemistry of basidial and basidial and basidiospore development, 1982; Patrignani G., Pellegrini S.T. Atti. Acad. Nat. Lincei. Rend. Cl. Sci. fis. Mat. e natur. 1983. V.75; Patrignani G., Pellegrini S. Caryologia. 1986. V.39; Stepanova A.A. Mycol. and Phytopathol. 1986. V.20; Thielke C. J. Ultr. Res. 1976. V.54; Craig G.D., et al. Protoplasma. 1977. V. 98]. In these fungi outer caps are clearly differentiated. It is very important to note that the lack of the outer caps in the septal pore apparatus is a taxon specific character of basidiocarps in all so far investigated species from the *aphyllophoralean Basidiomycota* [*Inonotus tamaricis*, *Bjerkandera fumosa*, *Ganoderma applanatum*: Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Mycol. and Phytopathol. 1994b. V.28]. The members of the *Agaricales* are very clearly distinguished from the *aphyllophoralean Basidiomycota* by the presence of the outer caps [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Mycol. and Phytopathol. 1994b. V.28]. The analysis of published electron micrographs [Patton A.M., Marchant R.A. J. Gen. Microbiol. 1978. V.109; Flegler S.L., et al. Can. J. Bot. 1976. V.54] also shows the absence of the outer caps in the septal pore apparatus of some so far studied species of *gasteroid Basidiomycota*. However, the problem of the presence/absence of the outer caps in this group of fungi requires further investigation.

The septal pore apparatus of all previously investigated species of agaricalean fungi contained the parentheses perforated with numerous ellipsoid holes [Patton A.M., Marchant R.A. J. Gen. Microbiol. 1978. V.109; Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Mycol. and Phytopathol. 1988. V.22; Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a; McLaughlin D.J. Amer. J. Bot. 1970. V.57; McLaughlin D.J. Amer. J. Bot. 1972. V.59; McLaughlin D.J. Protoplasma. 1974. V.82; McLaughlin D.J. Ultrastructure and cytochemistry of basidial and basidial and basidiospore development, 1982; Stepanova A.A. Mycol. and Phytopathol. 1986. V.20; Flegler S.L., et al. Can. J. Bot. 1976. V.54; Gull K. J. Ultr. Res. 1976. V.54; Craig G.D., et al. Protoplasma. 1977. V.98; Khan S.R., Kimbrough J.W. Can. J. Bot. 1979. V.57; Koida M.A., Stepanova A.A. Mycol. and Phytopathol. 1997. V.31; Moore R.T., Patton A.M. Mycologia. 1975. V.67]. The our data [1] and current investigations show for the first time the presence of continuous parentheses in 9 from of 24 investigated species of agaricalean fungi from the genus *Mycena*, including its type species, *M. galericulata*.

The *Mycena* species with the entire parentheses studied in the present work can be subdivided in two groups according to their outlines and position in relation to the dolipore swelling and according to the parentheses thickness. Five species (*M. stylobates*, *M. galericulata*, *M. galopus*, *M. pterigena* and *H. lactea*) have thick (0,04 μm) parentheses than other four (0,03 μm : *M. leptocephala*, *M. inclinata*, *M. epipterygia* and *M. rosella*). From they only one species (*M. stylobates*) has parentheses perforated

with numerous ellipsoid holes and therefore occupied isolated position in the group. Septal pore apparatus of *M. capillaripes* that was singled out as a special type according to the outline and position of parentheses in relation to the dolipore swelling, belongs to the second group according to the thickness of the parentheses. It is remarkable that based on the molecular-biochemical data [Moncalvo J.M., Vilgalys R., et al. One hundred and seventeen clades of euagarics, 2002], *M. galericulata* is also located apart from *M. inclinata* (together with *M. clavularis*). It is interesting to note that the last two species have parentheses of identical thickness, but they differ in their structure: they are continuous and arched (*a* type) in *M. inclinata* and perforated (*d* type) in *M. clavularis*. It is also interesting that these two species are similar by the size (0,22-0,37 x 0,31-0,37 µm) of the dolipore swellings.

Among a few families outside of the *Agaricales* studied so far, the dolipore apparatus with continuous arched (*a* type) parentheses have also been found. The species with this type of parentheses were from family *Hymenochaetales* (subfamily *Hymenochaetoideae*) and members of the genera *Inonotus* [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Mycol. and Phytopatol. 1994b. V.28; Müller W.H., et al. Mycol. Res. 2000. V.104; Moore R.T. Bot. Notis. 1980. V.133], *Onnia*, *Phellinus*, *Phylloporia*, *Hydnochaete*, *Coltriciella*, *Cyclomyces*, *Coltricia*, *Asterodon* [Müller W.H., et al. Mycol. Res. 2000. V.104; Moore R.T. Bot. Notis. 1980. V.133; Moore R.T. The challenge of the dolipore/parenthosome septum, 1985; Rajchenberg M., Bjanichinotti M.V. Mycol. Res. 1992. V.96]. Dolipores of the similar structure have been described in the species of the genera *Trametes*, *Lenzites*, *Daedalea* or *Trichaptum* [Traquair R.F., McKeen W.E. Can. J. Bot. 1978. V.24; Moore R.T. The challenge of the dolipore/parenthosome septum, 1985; Rajchenberg M., Bjanichinotti M.V. Mycol. Res. 1992. V.96; Alexander J., et al. Mycol. Helvetica. 1989. V.3; Rajchenberg M., Bjanichinotti M.V. Nord. J. Bot. 1991. V.11], in one species from the genus *Onnia* [*Onnia tomentosa* - syn. *Polyporus tomentosus*] and some species of the genus *Ramaria* [*Ramaria sanguinea*: Pellegrini S., et al. Caryologia. 1991. V.44], and also within the genus *Botryobasidium* [Langer G. Bibliotheca Mycologia. 1994. V.158].

The other species of *Mycena* investigated here possess with the perforated parentheses. They can be combined into two groups (*c* and *d*, Fig. 1) according to their position relative to the dolipore swelling. In the septal pore apparatus of *M. meliigena*, *M. haematopus*, *M. sanguinolenta* and *M. niveipes* hemispherical parentheses are perforated by numerous ellipsoid holes and they enveloped the dolipore swellings and lie close to the septa (*c* type). Before this time, parentheses of this type were at first described in the fungi from order *Boletales* - *Polyporus squamosus*, *Polyporus biennis* and *Tricholoma focale* (syn. *Tr. robustum*) [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Mycol. and Phytopathol. 1988. V.22; Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a; Moore R.T. J. Gen. Microbiol. 1975. V.87]. The analysis of electron micrographs published in the papers of other authors shows that the parentheses of *c* type were typical of the septal pore apparatus of some species of the fungi from the families *Polyporaceae* - *Corioloropsis sanguinaria* (syn. *Polyporus rugulosus*) [Welsenach R., Kessel M. J. Gen. Microbiol. 1965. V.40] and *Trametes versicolor* (syn. *Polystictus versicolor*) [Girbardt M. Arch. Microbiol. 1961. V.39], *Meruliaceae*

(*Abortiporus biennis*: Moore R.T., Patton A.M. Mycologia. 1975. V.67; Moore R.T. Marchant R. Can. J. Bot. 1972. V.50], *Insertea sedis* - *Oxyporus latemarginatus* (syn. *Poria latemarginata*) [Setliff E. C., et al. Can. J. Bot. 1972. V.50], *Schizophyllaceae* - *Schizophyllum commune* [Jersild R., et al. Arch. Microbiol. 1967. V.57], *Boletaceae* - *Chalciporus rubinellus* (syn. *Boletus rubinellus*) [McLaughlin D.J. Ultrastructure and cytochemistry of basidial and basidial and basidiospore development, 1982] and *Aureoboletus gentilis* (syn. *Boletus cramesinus*) [Patrignani G., Pellegrini S. Caryologia. 1986. V.39], *Suillaceae* - *Suillus bovinus*, *Tricholomataceae* - *Tricholoma matsutake*, *Agaricaceae* - *Crucibulum vulgare*, *Phallaceae* - *Phallus impudicus* [Nakai Y. Rep. Tottori Mycol. Inst. 1986. V.24], *Physalacriaceae* - *Armillaria limonea* (syn. *Armillaria mellea*) [Berliner M.D., Duff R.H. Can. J. Bot. 1965. V.43], and *Lycoperdon perlatum* [Flegler S.L., et al. Can. J. Bot. 1976. V.54], and *Clathrus cancellatus* [Eyme J., Parriaud H. C. R. Acad. Sci. 1970. V.230]. In the three (*M. haematopus*, *M. sanguinolenta* and *M. niveipes*) out of four *Mycena* species studied here that have dolipores with *c* type of parentheses, the thickness of the latter was 0,03 µm, while only in one species of this group, *M. meliigena*, parentheses were thinner (0,02 µm). It was interesting to note that the same type of parentheses was typical for the species of another genus of the family *Tricholomataceae* - *Tricholoma focale* (syn. *Tr. robustum*) [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Mycol. and Phytopathol. 1988. V.22; Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a]. However, this species possessed with the thicker (0,04 µm) parentheses. The thin parentheses as in *M. meliigena* were described also for *Agaricus bisporus* and *Pholiota squarrosa* [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a]. The last two species have perforated hemispherical parentheses that set against the sloped edge of dolipore swelling (*d* type).

A proposal has been offered earlier [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a] that the presence of perforated hemispherical parentheses that envelope the dolipore swelling and lie close to the septum (*c*-type of *Mycena*'s parentheses) also typical for some species of the *Polyporaceae* and *Boletaceae*. For this type typical the stable presence of the outer parentheses's caps without endoplasmic reticulum cistern, as well as the one-celled mature spores and four degenerating nucleus in basidium after spore discharge are indicators of their primitive position in comparison with the other agaricalean fungi. The presence of *c* type parentheses concurrently in the genera with poroid (*Polyporus*), tubular (*Boletus* s.l., *Suillus*) and gilled (*Tricholoma*, several species of *Mycena*) hymenophores allows us to suggest that, in the *Agaricomycetes*, morphological-anatomical characters change in the evolution faster than the characters of the septal pore apparatus. This suggestion is supported by the presence of continuous parentheses simultaneously in the *Mycena* species with gill hymenophore and in the hymenochaetoid genera (*Inonotus*, *Onnia*, *Phellinus*, *Hydnochaete*, *Coltricia*, etc.) with poroid hymenophore. Our data support the Moore's [Moore R.T. Bot. Notis. 1980. V.133; Moore R.T. A. van Leeuwenhoek. 1986. V.52; Moore R.T. Taxonomic implications of septal ultrastructure in aphylophorales, 1988] opinion that the structure of the septal pore apparatus is a conservative character.

Previously we [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a] revealed for the species of “nodal” family *Hygrophoraceae* – *Hygrophorus hypothejus* the simultaneous combination of the progressive (presence of perforated hemispherical parentheses that set against the oblique borders of dolipore swellings and storage substances in developing basidia) and primitive (one-nucleated mature basidiospores). In this study we revealed for 9 species *Mycena* the combination of primitive cytological (continuous parentheses) and progressive anatomical (gill hymenophore) characters. Also we revealed [4] another example of such kind combination in the ultrastructure of septal pore apparatus in two species from ascomycetous family *Microascaceae* – *Scedo-sporium apiospermum* – (teleomorph – *Pseu-dallescheria boydii*). We note the presence the primitive (without bounding membrane) and typical (with outer membrane) Woronin bodies in the composition of septal pore apparatus of this species. All this cases present the examples of heterobathmy [Tahtadzhyan A.L. Voprosyi evolyutsionnoy morfologii, 1954], the ingenious universal assumption which according our data also “work” for the Kingdom Fungi. According the Tahtadzhyan A.L. [Tahtadzhyan A.L. The questions of the evolutionary morphology, 1954] the species in which present combination of primitive and progressive characters possible to consider as “nodal” in evolution of plant. Thus, evidently the capacity of ultrastructural data for phylogenetical investigations in fungi also.

Dolipore apparatus of *d* type, that was typical for the *M. speirea*, *M. corynephora*, *M. hiemalis*, *M. pura*, *M. amicta*, *M. clavularis*, *M. filopes*, *M. metata*, *M. vitilis*, *M. stylobates* and *M. leptophylla*, have hemispherical parentheses perforated by numerous ellipsoid holes and they set against the sloped edge of dolipore swelling (Fig. 1 d). This type of the dolipore apparatus is characteristic feature of many species of the agaricalean fungi [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Mycol. and Phytopathol. 1988. V.22; Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a; Koida M.A., Stepanova A.A. Mycol. and Phytopatol. 1997. V.31]. It is described [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a] in the families *Pleurotaceae* (*Pleurotus ostreatus* – syn. *Pleurotus cornucopuae*), *Hygrophoraceae* (*Hygrophorus hypothejus*), *Amanitaceae* (*Amanita muscaria*), *Psathyrellaceae* (*Coprinellus truncorum* – syn. *Coprinus truncorum*, *C. domesticus*, *Psathyrella candolleana*), *Cortinariaceae* (*Rozites caperata*), *Strophariaceae* (*Pholiota squarrosa*), *Entolomataceae* (*Entoloma sordidulum*) and *Russulaceae* (*Russula cyanoxantha*, *Lactarius pubescens*) as well as in the *Physalacriaceae* (*Flammulina velutipes*). Dolipores of this type of parentheses can also be seen on the micrographs in the papers by the other authors. They were present in the species from the *Psathyrellaceae* – *Coprinus stercorearius* [syn. *Coprinopsis tuberosa*: Ellis T.T., et al. Mycologia. 1972. V.64], *Agaricaceae* [Thielke C. Arch. Mikrobiol. 1972 a. V.82; Craig G.D., et al. Protoplasma. 1977. V.98], *Strophariaceae* [Khan S.R., Kimbrough J.W. Mycotaxon. 1982. V.15; Nakai Y. Rep. Tottori Mycol. Inst. 1986. V.24; Wells K. Mycologia. 1994. V.86; Gull K. J. Ultr. Res. 1976. V.54], *Russulaceae* [Patrignani G., Pellegrini S. Atti. Acad. Nat. Lincei. Rend. Cl. Sci. fis. Mat. e natur. 1983. V.75], *Physalacriaceae* [*Flammulina velutipes*: Koida M.A. Disseert., 1999], *Pleurotaceae* and *Bolbitiaceae* [Nakai Y. Rep. Tottori Mycol. Inst. 1986. V.24]. They were also seen in

other papers devoted to fungi from the families *Hericiaceae* [*Hericum coralloides*: Flegler S.L., et al. Can. J. Bot. 1976. V.54], *Ceratobasidiaceae* [*Thanatephorus practicola* – syn. *Th. cucumber*], *Corticaceae* [*Waitea circinata*: Tu C.C., et al. Can. J. Bot. 1977. V.55], *Phanerochaetaceae* [*Pseudolagarobasidium*: Maekawa N., Hasebe K. Mycoscience. 2002. V.43], *Hymenochaetaceae* (*Coltricia perennis*), *Stereaceae* [*Stereum hirsutum*, *Polyporaceae* – *Trametes versicolor* (syn. *Coriolus versicolor*), *Clavulinaceae* [*Clavulina rugose*], *Ganodermataceae* [*Ganoderma lucidum* – syn. *Ganoderma orbiforme*] [Nakai Y. Rep. Tottori Mycol. Inst. 1986. V.24], *Fomes fomentarius* [Moore R.T. Bot. Notis. 1980. V.133], *Oxyporus latemarginatus* [syn. *Poria latemarginata*: Setliff E.C., et al. Can. J. Bot. 1972. V. 50], *Polyporus arcularius* (syn. *Favolus alveolaris*) [Flegler S.L., et al. Can. J. Bot. 1976. V.54] and *Bjerkandera fumosa*, *Ganoderma applanatum* [Thielke C. Arch. Mikrobiol. 1972 a. V.82], *Clavariadelphaceae* [*Clavariadelphus pistillaris*: Pellegrini S., et al. Caryologia. 1991. V.44]. *D*-type of parentheses can also be found in the families *Phallaceae* [*Aseroë arachnoidea* – syn. *Lysurus arachnoideus*], *Agaricaceae* [*Calvatia nipponica* – syn. *Lasio-sphaera nipponica*], *Phallaceae* [*Phallus impudicus*: Nakai Y. Rep. Tottori Mycol. Inst. 1986. V.24] and *Clavariadelphaceae* [*Clavariadelphus pistillaris*: Pellegrini S., et al. // Caryologia. 1991. V.44].

By the parentheses structure and topography *Mycena meliigena*, *M. haematopus*, *M. sanguinolenta* and *M. niveipes* were similar with *Tricholoma focale* (syn. *Tr. robustum*) [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a]. As the analysis of the illustrations published by other authors show they were also similar with *Armillaria limonea* (syn. *Armillaria mellea*) [Berliner M.D., Duff R.H. Can. J. Bot. 1965. V.43] and *Tricholoma matsutake* [Nakai Y. Rep. Tottori Mycol. Inst. 1986. V.24]. However, these three species of *Mycena* are singled out not from the *Tricholomataceae* but also from the other agarics by the absence of the outer caps. The *Mycena* species with the *d*-type of dolipores are more closely related to the agaricalean fungi that have similar (*d*) type of the septal pore apparatus [*Agaricaceae*: Thielke C. Arch. Mikrobiol. 1972 a. V.82; Craig G.D., et al. Protoplasma. 1977. V.98; *Psathyrellaceae*: Nakai Y. Rep. Tottori Mycol. Inst. 1986. V.24; McLaughlin D.J. Amer. J. Bot. 1972. V.59; Thielke C. Arch. Mikrobiol. 1972 a. V.82]. And finally, the *Mycena* species with the continuous parentheses of *a* and *b* types occupy the isolated position with respect to the agaricalean fungi studied so far.

No strong correlation has been found in the present work between the thickness and the type (continuous/perforated) of parentheses and the size of the dolipore swellings. So, in the species that have large dolipore swellings (*M. clavularis* and *M. stylobates*) their parentheses differ in their thickness vary from 0,03 to 0,04 μm. *M. meliigena* with its thinnest (0,02 μm) parentheses has the dolipore swellings of a medium size, but *M. pterigena* that has the smallest dolipore swellings possesses with thickest (0,04 μm) parentheses. In the majority of the *Mycena* species studied, the lamella inside parentheses takes up a central position, the situation typical for the *Agaricomycetes* [Patton A.M., Marchant R.A. J. Gen. Microbiol. 1978. V.109; Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Mycol. and Phytopathol. 1988. V.22; Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a; Stepanova A.A.

Mycol. and Phytopatol. 1986. V.20; Flegler S.L., et al. Can. J. Bot. 1976. V.54; Moore R.T., Patton A.M. Mycologia. 1975. V.67] including the tricholomean fungi from the other genera than *Mycena* [*Tricholoma focale* – syn. *Tr. robustum*: Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Mycol. and Phytopathol. 1988. V.22; Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a; *Flammulina velutipes*: Koida M.A., Stepanova A.A. Mycol. and Phytopatol. 1997. V.31]. *M. pterigena* was an exception with the lamella displaced towards the inner parentheses membrane. The exceptions from the other taxa were the species of the genera *Coprinellus* [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Mycol. and Phytopathol. 1988. V.22; Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a], *Coprinus* [Ellis T.T., et al. Mycologia. 1972. V.64] and *Inonotus* [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Mycol. and Phytopatol. 1994b. V.28] where, contrary, the lamella was displaced towards the outer parentheses membrane.

On the whole, the comparative analysis of our own and literature data shows that within the *Agaricomycetes*, occur species with continuous (*a* type) and perforated (*c* and *d* types) parentheses. In a few investigated species of *Basidiomycota* with gastroid fruiting bodies, *c* and *d* types of dolipore apparatus were found.

Nakai Y. [Nakai Y. Rep. Tottori Mycol. Inst. 1986. V.24], based on the study of 32 species from 11 orders of *Basidiomycota*, consider the ultrastructure of the septal pore apparatus as a taxonomic character of the family rank. On the whole, the modern knowledge about the septal pore ultrastructure of agaricalean fungi, makes it possible to conclude that the characters of the family rank are not only the presence or absence of holes in the parentheses, but also their outlines and position with respect to the dolipore swellings and position of the lamella inside parentheses, the presence or absence of outer caps in the septal pore apparatus, the presence or absence of endoplasmic reticulum around outer caps, symmetrical/asymmetrical structure of the outer caps on the either side of the septum, their form, diameter and contents (granules or fibrils, or both), also their distribution in the fruit body, stability or plasticity (with regard to the pattern of ultrastructural changes) during fruit body development. According to the data we obtained for the agaricalean fungi before [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Mycol. and Phytopathol. 1988. V.22; Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a;

Stepanova A.A. Mycol. and Phytopatol. 1986. V.20; Koida M.A., Stepanova A.A. Mycol. and Phytopatol. 1997. V.31], the parentheses thickness was the taxonomic character of the generic rank. So, in the *Boletaceae*, *Boletus edulis* has thick (0,05 μm) parentheses, while *Suillus luteus* from genus *Suillus* – 0,04 μm , in the genus *Psathyrella* – *P. candolleana* – 0,03 μm ; in the *Russulaceae* – *Russula cyanoxantha* has parentheses with thickness 0,03 μm and *Lactarius pubescens* – 0,05; in the *Tricholomataceae*, *Tricholoma focale*'s (syn. *Tr. robustum*) parentheses are 0,04 μm , whereas (*Physalacriaceae*) *Flammulina velutipes*'s – 0,03 μm .

Van Driel K.G A. et al. [5] investigated dolipores in *Cantharellus* species and found that the parentheses were perforated. Additionally, they confirmed the results of Kost G. [Kost G. Zeitschrift für Mykologie. 1984. V.50], that in *Rickenella* perforated parentheses were found. So they could show that in *Hymenochaetales* and *Cantharellales*, which are normally characterized by dolipores with continuous parentheses, genera with perforated parentheses were included. The interpretation of Van Driel K.G.A, et al. [5] was supported, that the imperforate type gave rise to the perforate septal pore cap-type. Our results show that such a transition from continuous to perforated parentheses also happened in *Agaricales* s. str. This means that a perforated parentheses developed several times during the evolution of *Agaricomycetes*.

The data of the present work show that the application of the ultrastructural characters of the septal pore apparatus is very perspective in the solution the problems of systematics of the agaricalean fungi at the generic level. However, for the final solution of the problem of the degree of similarities or distinctions among the investigated species of *Mycena*, comparative analysis of the anatomy of the developing fruit bodies, ultrastructural data about the basidium and cystidia morphogenesis should be also made. In sum, all these data very important step forward to understand the phylogenesis within the *Agaricomycetes* [Stepanova A.A., Vasilyev A.E. Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis, 1994a].

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Annette Schrievers and Helga Kisselbach-Heckmann for technical assistance. The first author appreciates the DAAD for financial support of her stay in Germany. We are grateful Olga Morozova for determination of fungi, which first author collect in Russia.

REFERENCES

1. Rexer K.-H., Stepanova A.A. The septal pore apparatus of *Mycena galopus* and *M. hiemalis*. In: Agerer R., Piepenbring M., Blanz P. (eds.) *Frontiers in Basidiomycote Mycology*. IHW Verlag, Eching, 2004: 309-314.
2. Celio G.J., Padamsee M., Bryn T.M., et al. Septal pore apparatus and nuclear division of *Auriscalpium vulgare*. *Mycologia*. 2007; 99 (5): 644-654.
3. Jenkinson T.S., Celio G.J., Padamsee M., et al. Conservation of cytoplasmic organization in the cystidia of *Suillus* species. *Mycologia*. 2008; 100 (4): 539-547.
4. Stepanova A.A., de Hoog S., Vasilyeva N.V. Intra- and interspecific diversity of ultrastructural markers in *Scedosporium*. *Fungal Biology*. 2016; 120: 147-154.
5. Van Driel K.G A., Humbel B.M., Verkleij A.J., et al. Septal pore complex morphology in the *Agaricomycotina* (*Basidiomycota*) with emphasis on the *Cantharellales* and *Hymenochaetales*. *Mycological research*. 2009; 113: 559-576.

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



ОЦЕНКА ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РОСТ ПОПУЛЯЦИЙ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ *CANDIDA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА

¹Царев В.Н. (директор института, зав. кафедрой)*, ¹Ипполитов Е.В. (профессор кафедры), ²Плахтий Л.Я. (зав. кафедрой), ¹Подпорин М.С. (м.н.с.), ¹Ильясова С.Т. (врач-стоматолог), ¹Ахмедов Г.Д. (доцент кафедры)

¹Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова МЗ РФ (кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии и кафедра хирургической стоматологии), Москва; ²Северо-Осетинский государственный медицинский университет МЗ РФ (кафедра микробиологии с вирусологией и иммунологией), Владикавказ, Россия

© Коллектив авторов, 2017

Низкую эффективность химиотерапии орального кандидоза и *Candida*-ассоциированного пародонтита связывают со свойствами микробной биопленки и развитием резистентности к фунгицидным препаратам. Однако альтернативные методы эрадикации биопленок, в частности, образуемых при участии дрожжевых грибов, находятся в начальной фазе исследования. Обсуждается возможность фотодинамической терапии для лечения кандидоза слизистой оболочки.

Цель исследования – проведение сравнительного анализа воздействия фотодинамической терапии (ФДТ) с различными фотосенсибилизаторами (ФС) на рост популяций грибов рода *Candida* в экспериментах *in vitro*.

Для определения чувствительности выделенных штаммов применяли оригинальную методику с использованием биореактора «Реверс-Спиннер RTS-1» (Латвия). Оптическую плотность полученной взвеси измеряли с помощью денситометра DEN-1B, которая для каждого эксперимента составила $2,01 \pm 0,3$ McF. Результаты культивирования микроорганизмов в биореакторе после применения фотодинамического воздействия и без него интерпретировали по изменению оптической плотности при длине волны 850 нм. Статистическую обработку результатов проводили по Манну-Уитни с помощью программного пакета Biostat 9.0.

При исследовании кривых роста бактериальных и дрожжевых популяций выявили статистически значимое снижение количества жизнеспособных клеток использованных штаммов в разные фазы кривых роста. При анализе динамики роста отмечали различия в наступлении максимума размножения (стимуляции роста) и его ингибирования у представителей разных видов бактерий и грибов *Candida*. Установлены различия антимикробной активности различных ФС, а также эффективность применения ФДТ при разной экспозиции в экспериментах *in vitro*.

Фотодинамическая терапия, в зависимости от экспозиции, оказывает различное воздействие на процесс размножения микробных клеток штаммов *Candida* spp. Более чувствительны к фотодинамическому воздействию были виды *C. albicans*, *C. tropicalis*, а *C. glabrata* и *C. krusei*, напротив, устойчивы.

Ключевые слова: биопленка, дрожжевые грибы, оральный кандидоз, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизаторы

EVALUATION OF PHOTODYNAMIC IMPACT ON THE GROWTH OF POPULATIONS OF *CANDIDA* YEAST FUNGI EXTRACTED FROM THE ORAL MUCOSA

¹Tsarev V.N. (director of the institute, head of the chair), ¹Ippolitov E.V. (professor of the chair), ²Plachtiiy L.Y. (head of the chair), ¹Podporin M.S. (junior scientific researcher), ¹Ilyasova S.T. (stomatologist), ¹Ahmedov G.D. (associate professor of the chair)

¹A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry (chair of microbiology, virology, immunology and chair of surgical dentistry), Moscow; ²North Ossetian State Medical Academy (chair of microbiology with virology and immunology), Vladikavkaz, Russia

© Collective of authors, 2017

Low efficiency of chemotherapy of oral candidosis and *Candida*-associated periodontitis is associated with the properties of microbial biofilm and the development of resistance to fungicidal drugs. However, alternative methods of eradication of biofilms, in particular, formed with the participation of yeast fungi, are in the initial phase of the study. The possibility of photodynamic therapy for the treatment of mucosal candidosis has been discussed.

The purpose of the study was a conducting of the comparative analysis of the effects of photodynamic therapy (PDT) with various photosensitizers (FS) on the growth of populations of fungi of the genus *Candida* in experiments *in vitro*.

An original technique was used to determine the sensitivity of the isolated strains using the Revers-Spinner RTS-1 bioreactor (Latvia). The optical density of the resulting suspension was measured with a DEN-1B densitometer, which for each experiment was $2,01 \pm 0,3$ McF. Results of microorganisms' cultivation in the bioreactor after application of photodynamic action and without it, were interpreted according to the change in the optical density at a wavelength of 850 nm. The statistical processing of the results was carried out according to Mann-Whitney using the Biostat 9.0 software package.

Investigation of the growth curves of bacterial and yeast populations revealed a statistically significant decrease in the number of viable cells of the strains used in different phases of the growth curves. When analyzing the dynamics of growth, differences were revealed between reproduction maximum occurrence (growth stimulation) and its inhibition in representatives of different bacteria species and *Candida* spp. The differences were established in the antimicrobial activity of various PSs, as well as the effectiveness of PDT application in different exposures in *in vitro* experiments.

Photodynamic therapy, depending on the exposure, has a different effect on the multiplication process of microbial cells strains – *Candida* fungi. *C. albicans*, *C. tropicalis* are more sensitive to photodynamic effect, while *C. glabrata* and *C. krusei* are to the opposite – stable.

Key words: biofilm, oral candidosis, photodynamic therapy, photosensitizers, yeast fungi

Дрожжевые грибы рода *Candida*, являясь оппортунистическими условно-патогенными микроорганизмами, встречаются на слизистой оболочке полости рта более чем у половины всего населения. Факторы, предрасполагающие к развитию кандидоза в полости рта, разнообразны: чаще всего он возникает у новорожденных, в старческом возрасте, при беременности, вследствие нарушений функций эндокринной, пищеварительной, иммунной и кровяной систем, системы кровообращения, обмена веществ, при онкологических заболеваниях, ВИЧ-инфекции и др. [1, 2].

При снижении иммунной реактивности организма при воспалительных заболеваниях пародонта проис-

* Контактное лицо: Царев Виктор Николаевич, e-mail: nikola777@rambler.ru

ходит нарушение колонизационной резистентности, усиление размножения патогенов и развитие воспалительно-деструктивных процессов в пародонте [3]. Микроэкологический дисбаланс слизистой оболочки дёсен и нарушение иммунных реакций, в свою очередь, приводят к длительному рецидивирующему течению пародонтита, торпидному и рефрактерному к проводимой традиционной терапии антибактериальными препаратами [2, 4, 5].

И хотя ведущая роль при развитии воспалительного процесса в пародонте связана с облигатной анаэробной и микроаэрофильной микробиотой, всё чаще, наряду с бактериальной, присутствует и грибковая [5-7]. В стоматологической практике часто встречаются ситуации, когда при длительном применении больших доз антибиотиков микобиота в полости рта начинает активизироваться и проявлять патогенные свойства [1]. Интерес к изучению видового состава грибов *Candida* связан также и с тем, что разные виды дрожжевых грибов имеют неодинаковую чувствительность к применяемым антимикотическим и антисептическим препаратам, что, в дальнейшем, может привести к безуспешности проводимой терапии. В частности, *C. glabrata* и *C. krusei* отличаются высокой устойчивостью к флуконазолу [8].

Лечение хронических воспалительных заболеваний пародонта, в том числе, ассоциированных с различным представительством *Candida* spp. в биотопе, является актуальной проблемой стоматологии. Лазерные технологии открывают новые перспективы в лечении данной патологии, особенно на фоне растущей резистентности микробиоты к антибактериальным и противогрибковым препаратам. За последнее десятилетие накоплен достаточно большой клинический материал по применению фотодинамической терапии при лечении различных заболеваний полости рта, включая патологию слизистой оболочки, дёсен, пародонта, а также в амбулаторной хирургии челюстно-лицевой области [4, 9; Soukos N.S., et al. Antimicrob. Agents. Chemother. 1999; 42]. В частности, установлено, что *Candida* spp. нередко присутствуют в составе смешанных микробных биоплёнок полости рта либо при развитии кандидоза сами формируют мощную биоплёнку [1, 7].

Подбор методов фотодинамического воздействия, фотосенсибилизатора, способного влиять на данный инфекционный фактор, возможно, может дать оптимальный результат при лечении кандидоза слизистой оболочки полости рта. Однако вопрос о влиянии фотохимической реакции, опосредованной различными фотосенсибилизаторами и при использовании разных типов аппаратов для проведения фотодинамической терапии, остаётся открытым, так как исследований в эксперименте *in vitro* с применением современных технологий мониторинга роста дрожжевых грибов, по нашим данным, не проводили. Последнее и явилось основанием для настоящего исследования.

Цель работы – оценка фунгистатической эффективности фотодинамического воздействия с применением разных типов аппаратов и фотосенсибилизаторов в отношении различных видов грибов рода *Candida* – клинических изолятов и референтного штамма, с использованием автоматизированной системы культивирования грибов на жидкой питательной среде в режиме реального времени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментального исследования использовали клинические изоляты *Candida* spp., выделенные при воспалительных заболеваниях полости рта: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*. В качестве контроля был взят референтный штамм *C. albicans* ATTC 90028™, любезно предоставленный нам из коллекции НИИ медицинской микологии имени П.Н. Кашкина (Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова).

Для сохранности жизнеспособности микроорганизмов, выделенных у пациентов в ЛПУ, в процессе транспортировки материала в лабораторию, использовали транспортную среду M306 Stuart Transport Medium (Himedia, Индия). Выделение, культивирование и идентификацию штаммов выполняли в соответствии со стандартным протоколом [1, 6].

Первичный посев для выявления *Candida* spp. осуществляли на хромогенную питательную среду M1297A (Himedia Labs, Индия). Посевы помещали в термостат при 37 °C на 48 часов. После получения и идентификации чистых культур, которую проводили с помощью интерпретирующих таблиц к хромогенной питательной среде, готовили взвеси двухсуточных культур стандартной концентрации по оптической плотности, которые использовали для экспериментального исследования с применением биореактора «Реверс-Спиннер RTS-1» (BioSan, Латвия). Данная система предназначена для культивирования микроорганизмов и сравнительной оценки их роста при разных воздействиях в режиме реального времени. Для культивирования микроорганизмов в биореакторе применяли жидкую питательную среду производства HiMedia Labs Pvt. Limited (Индия): Fluid Sabouraud Medium (M013) – для культивирования грибов рода *Candida* (тип пробирок объемом 50 мл с мембранным фильтром TubeSpin®, SW).

Результаты интерпретировали по изменению оптической плотности (OD) при длине волны $\lambda=850$ нм (Рис. 1).



Рис. 1. Система для одновременного культивирования микроорганизмов «Реверс-Спиннер RTS-1» (BioSan, Латвия).

В исследовании использовали два разных типа диодных аппаратов для генерации излучения 630-635 нм – с импульсным (FotoSan 360) и непрерывным (Lazurit) режимом работы. Описание и технические характеристики приборов фотодинамического воздействия представлены в таблице 1.

Таблица 1

Технические характеристики диодных устройств для фотодинамической обработки, использованных в экспериментальном исследовании

	FotoSan 360	Lazurit
Тип устройства	диодный лазер низкой мощности	диодный лазер низкой мощности
Длина волны	630 нм	635 нм
Выходная мощность	50-100 мВт	50-100 мВт
Время излучения	10-30 с	10-150 с
Режим работы	импульсный	непрерывный
Фотосенсибилизатор (ФС)	толуидиновый синий	хлорид толония

Для определения чувствительности выделенных штаммов к фотодинамическому воздействию применяли собственную модификацию метода серийных разведений, разработанную на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова МЗ РФ [8]. Для каждого эксперимента, отдельно в стерильных пробирках объемом 15 мл, готовили бактериальную взвесь в общем количестве 5 мл. Оптическую плотность полученной взвеси измеряли с помощью денситометра «DEN-1В» (BioSan, Латвия), которая, в конечном итоге, для каждого эксперимента составила $2,82 \pm 0,3$ McF.

В каждой серии эксперимента (для каждого вида грибов) проводили культивирование в трех разных пробирках: №1 – контроль кривой роста; №2 – ФДО FotoSan (фотосенсибилизатор Fotosan; состав – толуидиновый синий); №3 – ФДО Lazurit (фотосенсибилизатор Lazurit-L; состав – хлорид толония медицинского качества).

Для осуществления культивирования в каждую пробирку объемом 50 мл добавляли 19,5 мл питательной среды и вносили заранее подготовленную взвесь в количестве 0,5 мл, в пробирки №2 и №3 – соответствующий фотосенсибилизатор по 0,5 мл. Через 60 секунд обрабатывали инфракрасным пучком света через наконечник, который вводили в пробирку. Экспозиция составляла 30 секунд (в соответствии с инструкцией). Продолжительность эксперимента культивирования в биореакторе составила 96 часов.

Статистическую обработку данных проводили по Манну-Уитни с использованием компьютерной программы Biostat 9.0. За достоверную разницу принимали значения $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамику роста *Candida* spp. изучали в трех параллелях, что отражалось на графиках кривых роста популяций каждого вида: после фотодинамической терапевтической обработки (FDT) с использованием аппарата FotoSan 360 и фотосенсибилизатора на основе толуидинового синего, а также аппарата Lazurit и фотосенсибилизатора на основе хлорида толония. В качестве контроля оценивали рост соответствующего вида грибов, который характеризовался наступлением экспоненциальной фазы роста через 4-12 часов и достигал максимума с переходом в стационарную фазу роста через 16-20 часов от начала культивирования в зависимости от вида микроорганизма. Во всех случаях показатель начала стационарной фазы роста был достоверно выше (от 5,0 до 6,3 OD), чем при фотодинамическом воздействии. При оценке кривых роста бактериальных популяций исследуемых видов микроорганизмов получены следующие данные.

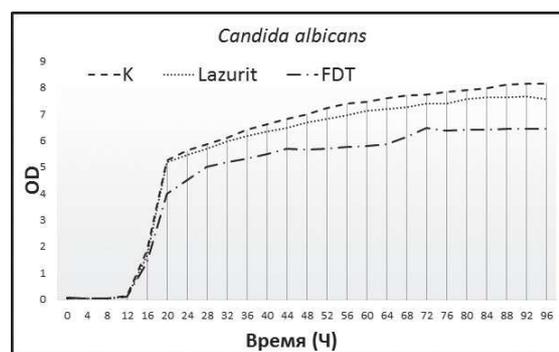


Рис. 2. Кривая роста штамма – клинического изолята *C. albicans* при использовании разных вариантов FDT.

У клинического изолята *C. albicans* (Рис. 2) лаг-фаза была до 12 часа культивирования и оказалась самой продолжительной по сравнению с референтным штаммом *C. albicans* (Рис. 3) и образцами других видов (Рис. 4-6). На кривых роста данного штамма логарифмическая фаза роста начиналась одновременно для всех проб с разными аппаратами для фотодинамического воздействия, а ее окончание различалось только в показателях оптической плотности. Для контрольного образца и образца с аппаратом Lazurit окончание логарифмической фазы и начало стационарной – 20 час с показателем 5,25 McF и 5,19 McF соответственно. Образец с аппаратом FotoSan 360 показал окончание логарифмической фазы на 28 час, с последующим сохранением прироста бактериальных популяций до начала стационарной фазы до 5,01 McF. Максимальная концентрация бластоспор была достигнута на 72 час и соответствовала 6,46 McF, что на 1,46 единиц McF меньше по сравнению со средним показателем оптической плотности в первых двух образцах.

Следовательно, торможение роста популяции дрожжевых грибов при FDT аппаратом FotoSan 360 было максимальным, а аппаратом Lazurit – статистически достоверно меньше.

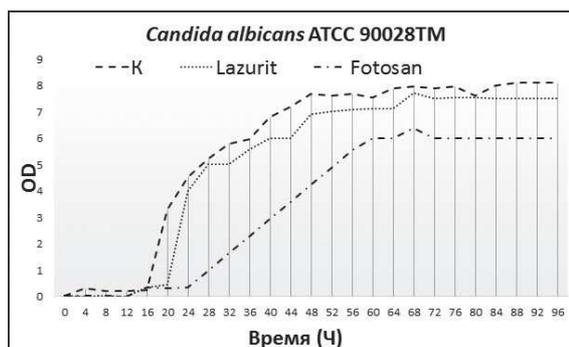


Рис. 3. Кривая роста референтного штамма *C. albicans* ATCC 90028™ при использовании разных вариантов FDT.

У референтного штамма *C. albicans* ATCC 90028™ (Рис. 3) продолжительность лаг-фазы отмечали до 16 часа культивирования, и аналогично предыдущему образцу она была достаточно длительной. На кривых роста штамма логарифмическая фаза роста в разных пробах (с FDT и без таковой) началась не одновременно, а с задержкой при использовании аппарата Lazurit – на 4 часа (подъем зафиксирован на 20 час), а аппарата Fotosan – на 8 часов (подъем зафиксирован на 24 час). Прирост популяции при использовании аппарата Fotosan также был значительно менее выраженный, по

сравнению с аппаратом Lazurit и контрольным образцом. Для контрольного образца и образца с FDT аппаратом Lazurit окончание логарифмической фазы и начало стационарной – 40-44 час с показателем OD 6,85-7,18 McF и 6,0-6,1 McF соответственно. Образец с FDT аппаратом FotoSan 360 показал окончание логарифмической фазы на 60 час и последующую стабилизацию стационарной фазы на показателях OD 6,01 единиц McF, то есть торможение роста популяции дрожжевых грибов было максимальным.

Следовательно, результатами, полученными с референтным штаммом *S. albicans* ATTC 90028™, подтверждены данные, выявленные с клиническим изолятом данного вида, о более выраженном фунгистатическом воздействии аппарата FotoSan 360, по сравнению с аппаратом Lazurit.

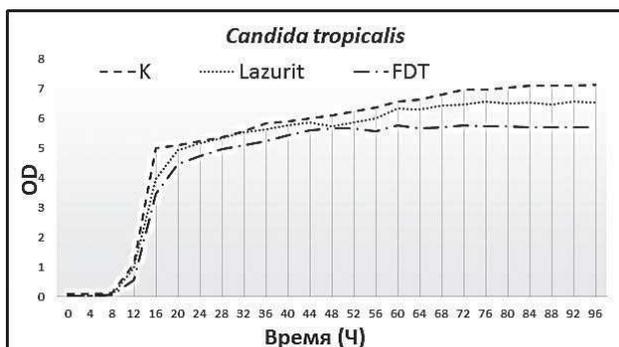


Рис. 4. Кривая роста штамма – клинического изолята *C. tropicalis* при использовании разных вариантов FDT.

Кривая роста штамма - клинического изолята *C. tropicalis* (Рис. 4) характеризовалась средней продолжительностью лаг-фазы с переходом в фазу логарифмического роста (экспоненциального) на 8-ой час культивирования с достаточно резким подъёмом кривой роста популяции. Окончание экспоненциальной фазы происходило одновременно во всех пробах на 16 час культивирования, но переход в стационарную фазу отличался скоростью прироста бактериальных популяций в пробирках №2 и №3, где заканчивался на 20 час, а в контрольной пробирке – скорость прироста практически отсутствовала, и начало стационарной фазы совпадало с окончанием экспоненциальной фазы. Дальнейший бактериальный прирост в стационарной фазе характеризовался достижением максимальной концентрации. В контрольном образце кривая роста достигала максимума на 84 час (7,11 McF), что было на 0,58 единицы McF больше, чем после обработки аппаратом Lazurit, и на 1,41 единицу McF больше, чем после обработки аппаратом FotoSan 360.

Следовательно, торможение роста популяции дрожжевых грибов при FDT аппаратом FotoSan 360 было слабо выраженным, хотя в отдельных участках кривой роста (в фазе стационарного роста) достоверно отличалось от контрольного образца без фотодинамического воздействия, а с аппаратом Lazurit – практически не отличалась от контрольного образца.

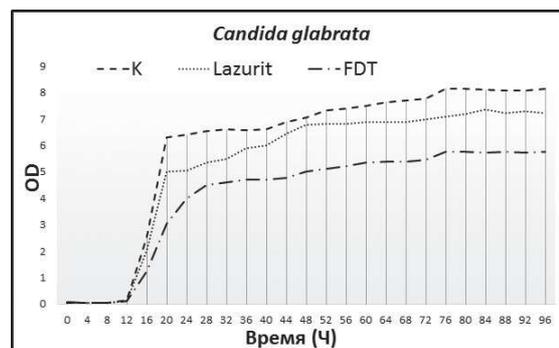


Рис. 5. Кривая роста штамма – клинического изолята *C. glabrata* при использовании разных вариантов FDT.

Кривая роста штамма - клинического изолята *C. glabrata* (Рис. 5) отличалась более длинной лаг-фазой, чем в предыдущем образце, и достаточно резким переходом в фазу логарифмического роста после 12 часа культивирования. Окончание экспоненциальной фазы в контрольной пробирке отмечали на 20 час с четким переходом в стационарную фазу. Максимальная концентрация была достигнута на 76 час культивирования – 8,16 McF. Для фазы логарифмического роста в исследуемых пробирках №2 и №3 был характерен постепенный переход в стационарную фазу с равномерным распределением скорости прироста бактериальных клеток относительно времени культивирования. При обработке аппаратом Lazurit экспоненциальная фаза заканчивалась на 20 час с показанием оптической плотности 5,00 McF, максимальная концентрация в стационарной фазе – 84-96 час (7,35 McF), а при обработке аппаратом FotoSan 360 – на 28 час с показанием оптической плотности 4,5 McF, максимальная концентрация в стационарной фазе – 76-92 час (5,77 McF).

Следовательно, торможение роста популяции дрожжевых грибов при FDT аппаратом FotoSan 360 было максимальным, а аппаратом Lazurit – статистически достоверно меньше.

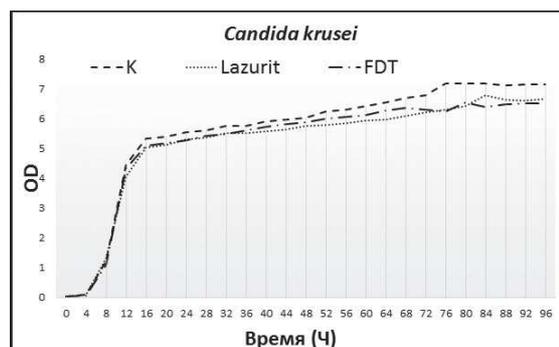


Рис. 6. Кривая роста штамма – клинического изолята *C. krusei* при использовании разных вариантов FDT.

Очень короткую лаг-фазу отмечали на кривых роста штамма - клинического изолята *C. krusei* (Рис. 6). Логарифмическая фаза роста начиналась на 4-й час культивирования, а ее переход в стационарную фазу был одинаковым для всех проб – 16 час культивирования. Скорость прироста бактериальных популяций (в фазе замедления логарифмического роста) наблюдали во всех пробирках в промежутке с 12 по 16 час. В контрольном образце максимальная концентрация была достигнута на 76 час культивирования с показателем 7,19 McF. В исследуемых пробирках кривые ста-

ционарной фазы в разных образцах FDT отличались перекрестным расположением по отношению друг к другу: для аппарата FotoSan пик был достигнут на 80 час культивирования – 6,55 McF, а для аппарата Lazurit – на 84 час с показателем 6,78 McF. Средняя разница пиковых показателей между контролем и исследуемыми образцами – 0,23 McF.

Для клинического изолята *C. krusei* не выявили существенных различий торможения роста популяции, по данным сравнения кривых роста между разными устройствами для FDT, а также и по сравнению с контролем.

Таблица 2

Сравнительная характеристика количественных параметров (по оптической плотности) роста популяций *Candida* spp. после фотодинамической обработки аппаратами FotoSan 360 и Lazurit с учётом узловых точек кривой роста

ФАЗА		Лог фаза	Пик подъема экспоненц. фазы	Пик подъема стационарной фазы	Среднее по стационарной фазе
Штамм / Проба					
<i>C. albicans</i> АТТС 90028тм	К	0,33±0,03	7,68±0,14	7,99±0,11	7,86±0,12
	FotoSan	0,36±0,04	6,00±0,11*	6,40±0,13*	6,04±0,10*
	Lazurit	0,45±0,05	6,90±0,15*	7,70±0,12*	7,39±0,14*
<i>C. albicans</i>	К	0,15±0,04	5,25±0,11	8,16±0,15	7,14±0,24
	FotoSan	0,09±0,03	5,01±0,10*	6,46±0,16*	5,91±0,23*
	Lazurit	0,10±0,03	5,09±0,11*	7,68±0,24*	5,97±0,24*
<i>C. krusei</i>	К	0,10±0,03	5,33±0,14	7,19±0,26	6,34±0,26
	FotoSan	0,06±0,02	5,10±0,15	6,55±0,25	5,96±0,25
	Lazurit	0,09±0,03	5,04±0,16	6,78±0,26	5,90±0,25
<i>C. glabrata</i>	К	0,15±0,04	6,30±0,14	8,16±0,26	7,35±0,25
	FotoSan	0,09±0,03	4,50±0,15	5,77±0,16*	5,25±0,25*
	Lazurit	0,10±0,03	5,00±0,15	7,35±0,25*	6,53±0,26*
<i>C. tropicalis</i>	К	0,12±0,03	5,00±0,15	7,11±0,25	6,28±0,26
	FotoSan	0,15±0,04	4,48±0,14	5,78±0,26	5,47±0,26*
	Lazurit	0,15±0,03	4,94±0,15	6,56±0,25	6,02±0,25

Примечание: * достоверное снижение показателя при исследуемом фотодинамическом воздействии по сравнению с контролем (p<0,05).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Широкое использование химиотерапевтических препаратов приводит к развитию полирезистентных штаммов, на которые традиционные средства перестают действовать, поэтому в настоящее время все чаще, наряду с медикаментозными методами лечения заболеваний слизистой оболочки рта и пародонта, применяют физические и физиотерапевтические методы, оказывающие местное воздействие на воспаление, к которым можно отнести также и фотодинамическую терапию [4, 9].

Кроме того, известно, что недостаточная концентрация препаратов в десневой жидкости и микробной биоплёнке, формируемой на слизистой оболочке, зачастую оказывается ниже минимальной ингибирующей концентрации для микроорганизма-мишени [3, Soukos N.S., et al. Antimicrob. Agents. Chemother. 1999; 42]. Ситуация осложняется тем, что матрица микробной биопленки формирует экологическое убежище, защищающее бактериальные клетки от действия антибиотиков, что приводит к необходимости увеличения концентрации препарата [5, 10]. Так, по данным исследований Пинегиной О.Н. с соавт. (2014), биоплёнки *C. krusei* были резистентны к вориконазолу и флуконазо-

лу, причём к последнему МИК в биоплёнке возрастала с 64 до 1024 мкг/мл [8].

При воспалительных заболеваниях пародонта, практически во всех случаях, имеется колонизация пародонтальных карманов с участием нескольких анаэробных бактерий-пародонтопатогенов в ассоциации с дрожжевыми грибами. Состав колонизирующих микроорганизмов, а точнее их комбинации (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguis* и др.), могут варьировать как для разных зон поражения, так и для разных больных и конструкционных материалов, из которых изготовлены зубные протезы [7]. Аналогичные данные ранее получены для смешанных биоплёнок сосудистых и уретральных катетеров, где вместе с *C. albicans* определяли *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* [11]. В связи с этим проведение антисептических воздействий должно основываться на результатах микробиологических исследований, включая видовую идентификацию грибов [3, 12].

Вышеизложенные факты побуждают специалистов к развитию и разработке новых способов воздействия на микроорганизмы ротовой полости, и одним из них является фотодинамическая терапия. Однако, согласно нашим исследованиям, чувствительность разных штаммов грибов существенно различается, что может зависеть как от используемого фотосенсибилизатора (толуидиновый синий, толония хлорид, т.п.), так и от характеристик фотодиодного источника излучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, оптимизм клиницистов в отношении применения фотодинамической терапии при лечении воспалительных процессов полости рта, ассоциированных с *Candida* spp., далеко не всегда оправдан [4, 9]. Очевидно, что эффективность эрадикации, прежде всего, определяется таксономической характеристикой, то есть зависит от видовой принадлежности грибов.

Так, в нашем исследовании клинические изоляты *C. albicans* и *C. glabrata* были чувствительны к фотодинамическому воздействию, и отмечали существенное снижение амплитуды кривой роста популяции в результате этого воздействия. Напротив, клинический изолят *C. krusei* оказался устойчивым к фотодинамическому воздействию (достоверных различий по сравнению с контролем не получено для обоих фотодиодных аппаратов, использованных в исследовании). Аналогичную картину наблюдали в эксперименте со штаммом *C. tropicalis*, причём его чувствительность при фотодинамической обработке аппаратом Fotosan 360 была минимальной, а аппаратом Lazurit – отсутствовала.

Полученные результаты о влиянии фотохимической реакции на штаммы разных видов *Candida* spp. свидетельствуют, в лучшем случае, о фунгистатическом воздействии фотохимической реакции на возбудителя, которое было продемонстрировано при использовании аппарата Fotosan 360 со штаммами *C. albicans* (клинический изолят и референтный) и *C. glabrata*, в то время как другой аппарат – Lazurit оказался практически неэффективным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мороз А.Ф., Снегирёва А.Е. Дрожжевые грибы рода *Candida* – возбудители кандидозов. В кн.: Руководство по медицинской микробиологии. Кн. III. Том 1. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика. Под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой. М.: Бином, 2013: 504-557. [Moroz A.F., Snegiryova A.E. Drozhzhevyye gribyi roda *Candida* – vzbuditeli kandidozov. V kn.: Ru-kovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii. Kn. III. Tom 1. Opportunisticheskie infektsii: vzbuditeli i etiologicheskaya diagnostika. Pod red. A.S. Labinskoy, N.N. Kostyukovoy. M.: Binom, 2013: 504-557. (In Russ)]
2. Cannon R.D., Firth N.A. Mushrooms and fungal infections of the mouth. In: R.J. Lamont Microbiology and Immunology for Dentists. 2010: 378-396.
3. Царев В.Н., Суркова С.А., Давыдова М.М. Особенности диагностики инвазивной кандидозной инфекции слизистой оболочки полости рта и тканей пародонта. Медицинский алфавит. 2012; Т.4. №19:10-14. [Tsarev V.N., Surkova S.A., Davyidova M.M. Osobennosti diagnostiki invazivnoy kandidoznoy infektsii slizistoy obolochki polosti rta i tkaney parodonta. Meditsinskiy alfavit. 2012; T.4. №19:10-14. (In Russ)]
4. Разина И.Н., Чепуркова О.А., Чеснокова М.Г., Недосеко В.Б. Лазерные технологии при лечении хронического генерализованного пародонтита, ассоциированного с *Candida* spp. Опыт клинического применения. Пародонтология. 2013; №1(18): 24-30. [Razina I.N., Chepurkova O.A., Chesnokova M.G., Nedoseko V.B. Lazernyye tehnologii pri lechenii hronicheskogo generalizovannogo parodontita, assotsiirovannogo s *Candida* spp. Opyit klinicheskogo primeneniya. Parodontologiya. 2013; №1(18): 24-30. (In Russ)]
5. Ушаков Р.В., Ушакова Т.В., Пакишин Н.И. и др. Перспективы разработки адгезивной двуслойной пленки «Диплен-дента» с комбинированным антибактериальным и фунгицидным эффектом. Медицинский алфавит. 2015; Т.1. №1: 15-18. [Ushakov R.V., Ushakova T.V., Pakshin N.I. i dr. Perspektivy razrabotki adgezivnoy dvusloynoy plenki «Diplen-denta» s kombinirovannym antibakterialnyim i fungitsidnym efektom. Meditsinskiy alfavit; 2015. T.1. №1: 15-18. (In Russ)]
6. Давыдова М.М., Плахтий Л.Я., Царев В.Н. Методы микробиологического исследования, применяемые в стоматологии. В кн. Микробиология, вирусология иммунология полости рта. Под ред. проф. В.Н. Царева. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013: 223-268. [Davyidova M.M., Plahytiy L.Ya., Tsarev V.N. Metody mikrobiologicheskogo issledovaniya, primenyaemye v stomatologii. V kn. Mikrobiologiya, virusologiya immunologiya polosti rta. Pod red. prof. V.N. Tsareva. M.: GEOTAR-Media, 2013: 223-268. (In Russ)]
7. Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царёв В.Н. Особенности морфологии биоплёнки пародонта при воспалительных заболеваниях дёсен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. Клиническая лабораторная диагностика. 2015; Т.60. №12: 59-64. [Ippolitov E.V., Didenko L.V., Tsaryov V.N. Osobennosti morfologii bioplyonki parodonta pri vospalitelnykh zabolevaniyakh dyosen (hronicheskyy kataralnyiyy gingivit, hronicheskyy parodontit, kandida-assotsiirovannyiy parodontit) po dannym elektronnoy mikroskopii. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2015; T.60. №12: 59-64. (In Russ)]
8. Пинегина О.Н., Рауш Е.Р., Васильева Н.В. Определение чувствительности к антимикотикам *Candida* spp. в составе биоплёнок. Проблемы медицинской микологии. 2014; Т.16. №4: 46-48. [Pinegina O.N., Raush E.R., Vasileva N.V. Opredelenie chuvstvitelnosti k antimikotikam *Candida* spp. v sostave bioplyonok. Problemy meditsinskoj mikologii. 2014; T.16. №4: 46-48. (In Russ)]
9. Янушевич О.О., Айвазова Р.А., Соколова Е.Ю. Фотоактивируемая дезинфекция как альтернатива традиционным методам антисептического воздействия в эндодонтии, пародонтологии и гастроэнтерологии. Эндодонтия Today. 2014; №3: 3-8. [Yanushevich O.O., Ayvazova R.A., Sokolova E.Yu. Fotoaktiviruemaya dezinfektsiya kak alternativa traditsionnyim metodam antisepticheskogo vozdeystviya v endodontii, parodontologii i gastroenterologii. Endodontiya Today. 2014; №3: 3-8. (In Russ)]
10. Tobudic S., Kratzer C., Lessnigg A., Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. Mycoses. 2011; 55:199-204.
11. Степанова А.А., Васильева Н.В., Пинегина О.Н. Сканирующая электронная микроскопия биоплёнки уретральных и венозных катетеров. Проблемы медицинской микологии. 2014; Т.16. №4: 31-37. [Stepanova A.A., Vasileva N.V., Pinegina O.N. Skaniryuschaya elektronnaya mikroskopiya bioplyonki uretralnykh i venoznykh kateterov. Problemy meditsinskoj mikologii. 2014; T.16. №4: 31-37. (In Russ)]
12. Царев В.Н., Атрушкевич В.Г., Ипполитов Е.В., Подпорин М.С. Сравнительный анализ антимикробной активности пародонтальных антисептиков с использованием автоматизированной системы контроля роста микроорганизмов в режиме реального времени. Пародонтология. 2017; Т.82. №1: 4-10. [Tsarev V.N., Atrushkevich V.G., Ippolitov E.V., Podporin M.S. Sravnitelnyy analiz antimikrobnoy aktivnosti parodontalnykh antiseptikov s ispolzovaniem avtomatizirovannoy sistemy kontrolya rosta mikroorganizmov v rezhime realnogo vremeni. Parodontologiya. 2017; T.82. №1: 4-10. (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 10.07.2017

Рецензент: И.А. Босак



ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ КЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ХОДЕ ПОЧКОВАНИЯ *RHODOTORULA MINUTA*

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

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

©Коллектив авторов, 2017

Впервые представлены данные по ультраструктуре динамики компонентов клетки в ходе почкования дрожжевых клеток *Rhodotorula minuta* в экспоненциальной фазе *in vitro*. Материнские клетки *R. minuta* имеют одно интерфазное ядро, плотный цитозоль, многочисленные свободные рибосомы, высокий уровень вакуолизации, обильные секреторные пузырьки, однако цистерны Гольджи, микротельца и запасные вещества были выявлены в небольшом числе. В ходе почкования размеры ядра и ядрышка увеличиваются параллельно с возрастанием уровня хроматизации. Для процесса почкования *R. minuta* типично увеличение числа митохондрий с формированием одной гигантской органеллы. Плотная ассоциация рибосом с наружной мембраной митохондрий дрожжевой клетки свидетельствует о том, что митохондриальная активность возрастает в ходе ее почкования.

Ключевые слова: замораживание-замещение, *in vitro*, почкование, *Rhodotorula minuta*, ультраструктура

ELECTRON-MICROSCOPIC INVESTIGATION OF CELL COMPONENT DYNAMICS DURING BUDDING IN THE YEAST *RHODOTORULA MINUTA*

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

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

©Collective of authors, 2017

The ultrastructure of cell component dynamics during budding of *Rhodotorula minuta* yeast cells at the exponential phase *in vitro* was presented for the first time. The mother cells of *R. minuta* had one interphase nucleus, dense cytosol, numerous free ribosomes, higher level of vacuolization, abundant secretory vesicles, but few Golgi cisterns, microbodies, and storage substances were revealed. During budding, the sizes of nucleus and nucleolus were increased along with the increase of level of chromatinization. The increase in number of mitochondria with the formation of one giant organelle was typical for the process of *R. minuta* budding. Tight

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

association of ribosomes with mitochondrial outer membranes may suggest that mitochondrial activity would increase during its budding.

Key words: budding, freeze-substitution, *in vitro*, *Rhodotorula minuta*, ultrastructure

INTRODUCTION

Rhodotorula minuta (Saito) F.C. Harrison – is widely distributed basidiomycetous yeast, opportunistic pathogen. This species causes endophthalmitis [Gregory J.K., Haller J.A. Arch. Ophthalmol. 1992; 110], onychomycosis [1], systemic infection in a leukemic patient [Rusthoven J.J., et al. J. Infect. 1984; 8] and infection in hip joint prosthesis [Cutrona A.F., et al. Am. J. Orthop. 2002; 31]. It was also isolated from the central venous catheter of the AIDS patient [Goldani L.Z., et al. J. Med. Vet. Mycol. 1995; 33]. Since there have been no reports on the ultrastructure of *R. minuta* yeast cells, we aim to reveal the cell components dynamics during budding of this yeast with the use of modern methods of transmission electron microscopy.

MATERIALS AND METHODS

In present work we used culture of strain IFM 5756 from Culture Collection of the Research Center of Pathogenic Fungi (Chiba University, Japan).

The strain was cultivated for 24 h in YPD medium (1% yeast extract, 2% bactopecton and 2% glucose) on shaker at 30° C. They were observed on phase-contrast microscope (Olympus BH-2RFCA). For transmission electron microscopy (TEM), cells were collected by centrifugation and sandwiched between two copper grids. Then the samples were freeze-substituted in 2% osmium tetroxide/acetone at - 80° C for 48 h and embedded in epoxy resin [2- 5]. The ultrathin sections (70 nm thick) were cut with a diamond knife and stained with uranyl acetate and lead citrate. Finally, the grids were covered with Super support films (Nisshin EM, Tokyo, Japan) and observed in JEM-1400 EX transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan).

RESULTS

Phase-contrast microscopy. The cells were spherical or ellipsoidal (3,5-6,5 x 2,5-4,5 μm), and single or in small groups (Fig. 1 a).

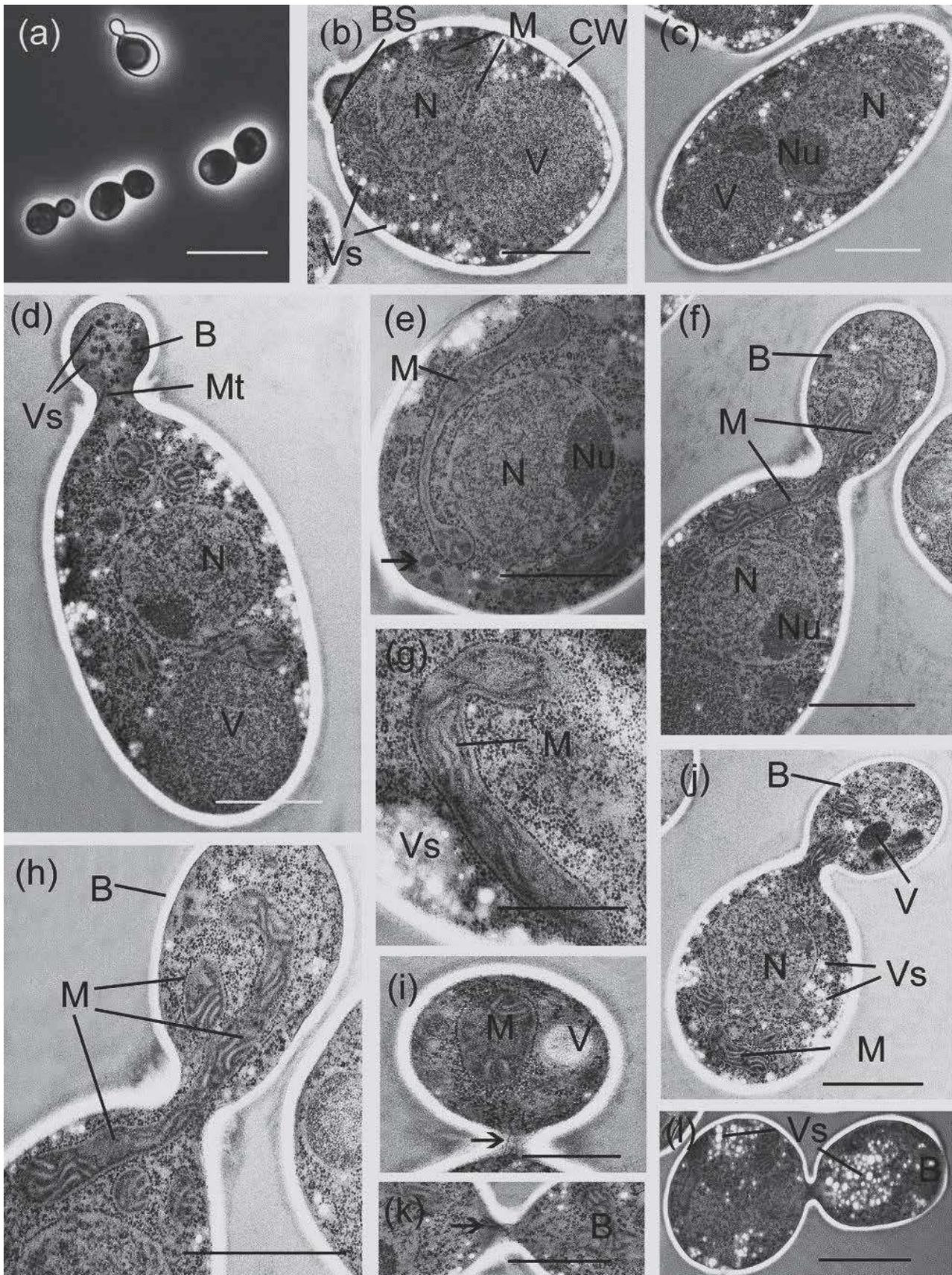


Fig. 1. Phase-contrast (a) and transmission electron microscopy (b-l) of the in vitro growing *R. minuta* cells. B – bud; BS – budding scar; CW – cell wall; ER – endoplasmic reticulum; M - mitochondrion (ia), Mt – microtubule; N – nucleus; Nu – nucleolus; V – vacuole, Vs – vesicles. Scale bars: a – 10 μ m, b – 1,5 μ m, c, d, f, h, m – 1 μ m, e, i-l – 1 μ m.

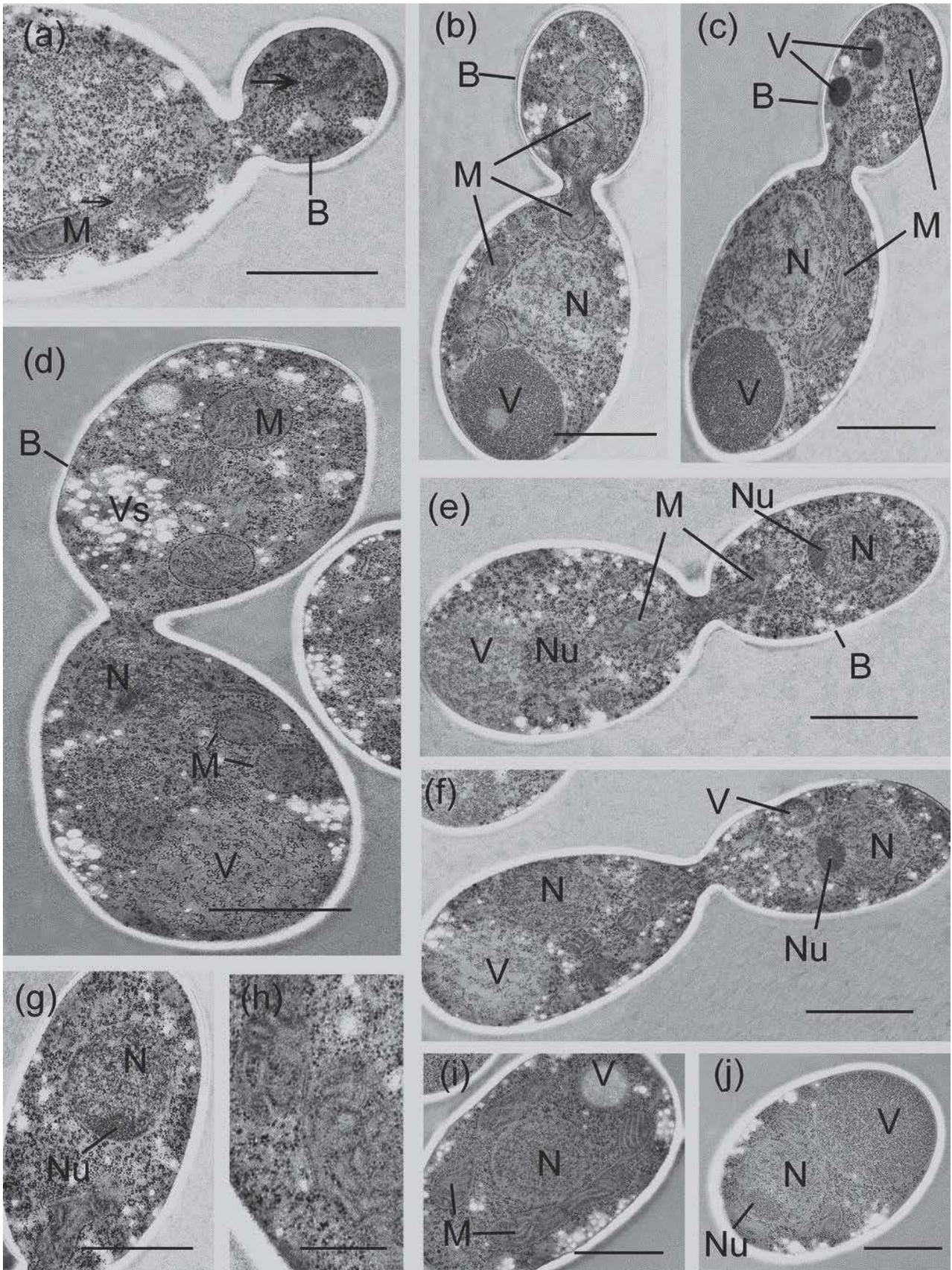


Fig. 2. Ultrastructure of in vitro growing *R. minuta* cells during (a-i) and after budding (j). Scale bars: a-g, i, j – 1 μ m, h – 2 μ m.

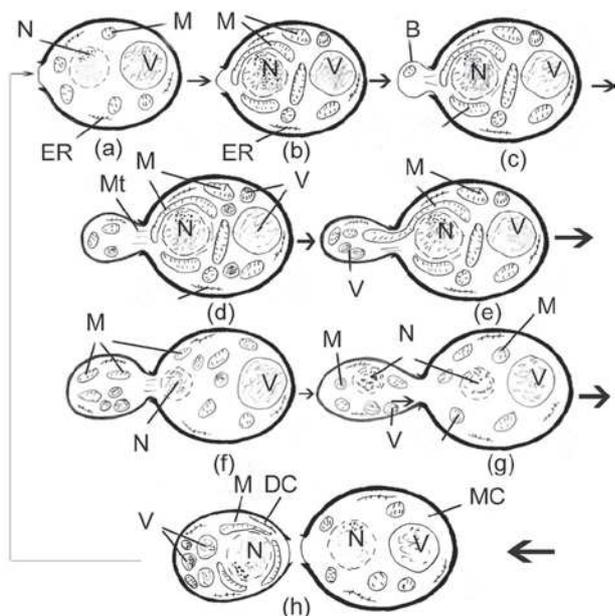


Fig. 3. Diagram showing the organelles migration during *R. minuta* budding: a – mother cell before budding; b-g – mother cell during budding; h – mother and daughter cell cells after separation.

Mother cells before budding. The interphase nucleus and large vacuole occupied the main cell volume, and were practically similar in size (Fig. 1 b, c). The nucleus was localized right next to the scar (Fig. 1 b, 3 a), was spherical (1,3 μm) or ellipsoidal (1,0x1,5 μm), contained moderate level of randomly distributed condensed chromatin (Fig. 1 b). The nucleolus was ellipsoidal (0,4x0,6 μm) and consisted of granular and fibrillar components (Fig. 1 c). There were numerous ribosomes on outer nuclear membrane.

The number of mitochondria varied from 3 to 5. They were spherical (0,4 μm) or ellipsoidal (0,3 x 0,5 μm). The mitochondria had more electron-dense matrix than cytosol. They had light lengthy dense cristae. Dense association of ribosomes on mitochondria were observed (Fig. 1 e, g) in all growth phases.

The single large vacuole was localized in the basal part of the cell under the nucleus (Fig. 1 d, e, 3 a). The vacuole was filled with specific tightly localized thin fibrillar material.

There were no storage substances. The cytosol had moderate electron density (Fig. 1 b) and was rich in mono- and polyribosomes. Numerous (from 50 to 70 on median cell section) light (0,10 μm) and grey (0,06 μm) secretory vesicles were uniformly distributed on the cell periphery (Fig. 1 d). There were no Golgi cisterns. There were few short rough endoplasmic reticulum (ER) (Fig. 3 a), and localized close to the plasma membrane. There were no microbodies. The plasma membrane was closely adhered to the electron-transparent thin (0,16 μm) cell wall with a single budding scar (with mean diameter 0,6 μm , Fig. 1 b).

Budding. The bud formation first started in the scar zone by isodiametrical growth. At this stage, the moderate electron density cytosol, numerous free ribosomes and uniformly distributed grey secretory vesicles (Fig. 1 d, 3 c, d) were visible in bud. Then during bud growth several single small mitochondria, small vacuoles (from 1 to 3, Fig. 1 i, j, f, h, 2 c) filled with fibrillar material, a few short ER cisterns, and many secretory vesicles (Fig. 1 j, l) were observed. The sections on mitochondrial surfaces in the

mother cell and bud showed dense ribosomal distribution (Fig. 2 a, arrows). The small vacuoles appeared in mother cell (Fig. 1 i, j, 3 d) that later selectively migrated to the bud.

At early stage of budding the nucleus was localized near the wall in the middle part of the cell above the large vacuole (Fig. 1 d, 3 b). The sizes of nucleus and degree of chromatization were increased. Some changes in mitochondrial number and localization occurred. The number of mitochondria on median cells sections increased up to 8-10. They moved from the cell periphery to the nucleus outer membrane (Fig. 1 e, 3 b). The long (0,6-0,8 μm , Fig. 1 e, g, f, h) and branching profile of those organelles appeared. As was the previous stage, the numerous ribosomes were located on the outer mitochondrial membrane (Fig. 1 e).

Several microfilaments (Fig. 1 i, arrow) and short microtubules (Fig. 1 k) were visible in the isthmus. They were connected with the plasma membrane and localized parallel to each other. Contrary to the microfilaments, the microtubules were localized deep in the cytosol and distantly from the plasma membrane. We also found the microtubules near mitochondria in mother cells and bud (Fig. 2 h). Sometimes there were the long mitochondrial profiles that migrated through the isthmus (Fig. 1 f, h), that may prove the presence of a giant mitochondrium.

At this stage the large vacuole was localized in the basal part of the mother cell, but the nucleus was in central. Several mitochondrial profiles (Fig. 2 b, 3 d) were arranged opposite the isthmus. The process of transition of the cytosol, free ribosomes, mitochondria, small vacuoles, secretory vesicles and cisterns of ER from the mother cell into the bud's content across the isthmus was visible. The same situation was observed inside of both cell types during the next stage of apical growth (Fig. 3 e-g). The bud shape became ellipsoidal (Fig. 2 a-d, 3 g). Near the nuclear membrane of the mother cell several long microtubules were observed before their transition to the bud cytoplasm.

The nucleus in the mother cell migrates from the central part to the apical area directly opposite the scar (Fig. 2 d, 3 f). Later, after the division, we observed one nucleus in the mother cell and the other in the bud (Fig. 2 e, f, g, 3 g). Their sizes were 1,4 μm and the degree of chromatin condensation became higher. They contained small (0,4 x 0,8 μm) moderate electron density nucleolus (Fig. 2 e) localized near the inner nuclear membrane. After the mitosis and before the septum formation, the process of migration of cytosol, free ribosomes, mitochondrium and other cell components from mother cell to the bud continued (Fig. 2 e, f).

The mother and daughter cells after se-paration. After the cell separation the ultrastructure and localization of organelles in the mother cell were the same as they were before budding (Fig. 3 h).

The daughter cell after separation underwent the isodiametrical growth which was accompanied by the formation of the vacuole in its basal part (Fig. 2 i, j, 3 h). During that period the spherical (1,4 μm) nucleus was localized in the apical part of the cell opposite the scar. Its size increased and the degree of chromatization decreased. The synthesis of cytosol, free ribosomes, and proliferation of mitochondria, ER and peripheral secretory vesicles took place. At that period the long profiles (0,7-0,9 μm) of mitochondria appeared near the nucleus (Fig. 2 i). After the growth completion, the daughter cell showed the

ultrastructure typical for mature mother cell.

DISCUSSION

For investigated *R. minuta* yeast cells the monopolar budding were typical [6]. The mother cell of *R. minuta* had one interphase nucleus and large vacuole, moderate number of mitochondria, rare cisterns of ER and numerous secretory vesicles. During budding of yeast the sizes of nucleus and nucleolus together with the level of chromatization increased. Similar data were obtained for in vitro growing cells at early stage of budding of *C. albidus* [4], *M. pachydermatis* [5] and *C. laurentii* [7]. The changes in topography of nucleus (i.e. the migration from central part to apical directly opposite the scar) of the budding mother cell were also typical for *M. pachydermatis* [5]. The other pattern of the nucleus migration was revealed for mother yeast cells of *C. albidus* [4] and *C. laurentii* [7], from the basal part to central-lateral and finally apical under the isthmus. The *R. minuta*, *M. pachydermatis* [5] and *C. laurentii* [7] mother cells at all the stages of budding did not differ between themselves in vacuolar content morphology and that significantly distinguished this species from *C. albidus* [4].

R. minuta budding was accompanied by the increase of number of mitochondria with the formation of one giant organelle proceeded according to two stages: 1) during budding in a mother cell; 2) after budding in a daughter cell. In a mother cell the formation of giant mitochondria was necessary for the synthesis of cytosol, free ribosomes and other cell components for the developing bud. In a daughter cell after budding the giant mitochondrium provides the same component synthesis but during its differentiation into mature mother cell. These morphogenetic peculiarities distinctly differ *R. minuta* from the species of other genus [*C. albidus*: 4; *M. pachydermatis*: 5]. The giant mitochondrium also developed during budding of yeast cells *C. laurentii* [7]. The aggregation of mitochondria was also revealed near the nucleus at early stages of budding in *R. glutinis* yeast cells [McCully E.K., Robinow C.F. J. Cell Sci. 1972; 11] and commonly was observed in *R. rubra* cells [Srivastava K.C., Smith D.G. Cytobios. 1979; 26]. Unusual morphological «alliance» between the outer membrane of mitochondrium and ribosomes may suggest that these topographical peculiarities considerably increased the degree of mitochondrial functional capability and activity in mother and daughter cells. We found similar aggregation of ribosomes with mitochondrium on Figures 1 b and 2 a with the images of mother and budding cells of other species – *R. glutinis* [McCully E.K., Robinow C.F. J. Cell Sci. 1972; 11]. It is interesting to note that in the yeast cells of *M. pachydermatis* [5], the number of mitochondria and their structure during budding were permanent that may be typical for other species of genus *Malassezia*.

The storage substances, Golgi cisterns and microbodies in *R. minuta* were absent. The absence of storage substances was also typical in *C. albidus* [4] and *C. laurentii* [7] cultivated for 24 h under the same conditions. Contrary,

for *M. pachydermatis* mother yeast cells [5] growing under similar conditions and time length, the presence of single large lipid inclusion was typical. Similar with *R. minuta*, the microbodies were absent in budding cells of *C. albidus* [4], *M. pachydermatis* [5] and *C. laurentii* [7].

The analysis of *R. minuta*, *C. albidus*, *M. pachydermatis* and *C. laurentii* patterns of yeast budding demonstrated significant differences in organelles topography, quantity and quality in contents of budding mother cells depending on species. Topographical relations between the interphase nucleus and vacuoles during budding in two species of one genus *Cryptococcus* were identical, but differed between the species of different genus. The investigated species were divided into three distinct groups concordant with criteria of their functional ultrastructural activity. *R. minuta* with high level of fine structural activity during budding belongs to the first group *C. albidus* and *C. laurentii* with median level of organelle activity – to the second. In the cytosol of *C. albidus*, *C. laurentii* and *R. minuta* mother cells during early stages of bud formation we observed the proliferation of mitochondria with developed one giant organelle, which was concentrated around the nucleus. Only in *R. minuta* we revealed the repeated presence of a giant mitochondrium during the daughter cell development into the mother cell. This peculiarity in cell cycle accelerates the speed of cell growth and gives this species the specific priority. The third group, with lower level of budding activity was discovered in *M. pachydermatis*. For mother cells of this species before and during the budding the lower level of vacuolization, small number of mitochondria, presence of single cistern of ER, absence of secretory vesicles and presence of one big lipid inclusion opposite the budding scar was typical. During the process of bud morphogenesis the number of mitochondria, storage lipids and cisterns of ER was not increased contrary to the volume of cytosol and number of free ribosomes.

CONCLUSION

The revealed differences in the organellography during yeast cells budding may be very important for the phylogenetic investigations. Perhaps during the evolution the analyzed yeast species passed the process of «energization», so that the phylogenetic relations between them may be as follows: *Malassezia* → *Cryptococcus* → *Rhodotorula*. But may be a more «economical» pattern of budding, which we revealed for *M. pachydermatis* (transport of «ready» storage inclusion from the mother cell into the daughter's, the absence of mitochondrial proliferation and other peculiarities), phylogenetically was more advanced? The revealed differences in patterns of organelles transition during yeast cells budding of investigated species may indirectly demonstrate the differences in the «rapidity» of this process.

The subsequent investigations of other yeast species from one genus or from different genus of one family or different families will permit to solve the question on taxonomical importance of the revealed differences.

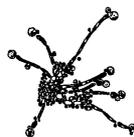
REFERENCES

1. Zhou J., Chen M., Chen H., et al. *Rhodotorula minuta* as onychomycosis agent in a Chinese patient: first report and literature review. *Mycoses*. 2013; 57: 191-195.
2. Yamaguchi M., Okada H., Namiki Y. Smart specimen preparation for freeze-substitution and serial ultrathin sectioning of yeast cells // *J. Electron Microsc.* – 2009. – Vol. 58. – P. 261 - 266.
3. Yamaguchi M., Namiki Y., Okada H., et al. Structure of *Saccharomyces cerevisiae* determined by freeze-substitution and serial ultrathin sectioning electron microscopy. *J. Electron Microsc.* 2011; 60: 321-335.

4. Yamaguchi M., Shimizu K., Kawamoto S., et al. Dynamics of cell components during budding of *Cryptococcus albidus* yeast cells. *Problems in Medical Mycology*. 2014; 16 (1): 29-35.
5. Yamaguchi M., Shimizu K., Kawamoto S., et al. Ultrastructural patterns of cellular components during budding in the yeast *Malassezia pachydermatis*. *Problems in Medical Mycology*. 2014; 16 (4): 13-18.
6. de Hoog G.S., et al. Atlas of clinical fungi (a recent electronic version 3.1). 2011
7. Stepanova A.A., Yamaguchi M., Chibana H., Vasilyeva N.V. Ultrastructural aspects of cells components migration during budding in the yeast *Cryptococcus laurentii*. *Problems in Medical Mycology*. 2016; 18 (3): 24-29.

Поступила в редакцию журнала 25.05.2017

Рецензент: Игнатъева С.М.



БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ПРОТЕОМА *PENICILLIUM DIGITATUM*

¹Рябинин И.А. (м.н.с.)*, ²Лякишева Е.В.
(ординатор), ^{1,2} Васильева Н.В. (директор
института, зав. кафедрой)

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

© Коллектив авторов, 2017

В исследовании проведено аннотирование масс-спектра, полученного в результате MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточного экстракта мицелия *Penicillium digitatum* 1, по протоколу, пригодному для видовой идентификации. С использованием серии биоинформационных ресурсов TagIdent, Protein BLAST, Swiss-Model и RaptorX идентифицировали белки и пептиды, с наибольшей вероятностью образующие масс-спектр, также по аминокислотным последовательностям удалось воссоздать их третичную структуру, выявить гомологи среди других видов микромицетов, установить некоторые свойства. В результате проведенной работы выявили и описали в составе низкомолекулярной фракции протеома 33 полипептида, из которых 9 – имеют гомологи у других микромицетов, а 13 – являются уникальными для изученного вида. Большинство исследованных полипептидов ранее были предсказаны только методами молекулярной генетики и не снабжены подробными структурными и функциональными характеристиками.

Ключевые слова: биоинформатика, MALDI-TOF-масс-спектрометрия, *Penicillium digitatum*, спектрообразующие белки, третичная структура белка

BIONFORMATICAL ANALYSIS OF THE LOW-MOLECULAR- WEIGHT FRACTION OF *PENICILLIUM DIGITATUM* PROTEOME

Ryabinin I.A.¹ (junior scientific collaborator),
Lyakisheva E.V.² (resident physician), Vasilyeva
N.V.^{1,2} (director of the institute, head of the chair)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹ Kashkin Research Institute of Medical Microbiology, ² Chair of medical microbiology, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2017

The annotation of the mass-spectrum, which was obtained by MALDI-TOF-mass-spectrometry of the mycelium extract of *Penicillium digitatum* 1 using a protocol suitable for species identification, was carried out in this study. Proteins and peptides which most likely forming the mass-spectrum were identified with using a series of bioinformatics resources (TagIdent, Protein BLAST, Swiss-Model and RaptorX), as well as it was possible to reconstruct their tertiary structure, to reveal homologs among other species of micromycetes, to establish some other properties based on amino acids sequences. As a result of this work, 33 polypeptide of the low-molecular-weight fraction of proteome were detected and described, of which 9 – have homologs in other micromycetes and 13 – are unique for the studied species. Most of the investigated polypeptides were previously predicted only by molecular genetics methods and are not provided with detailed structural and functional characteristics.

Key words: bioinformatics, MALDI-TOF-mass-spectrometry, mass-spectra-forming proteins, *Penicillium digitatum*, protein tertiary structure

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

ВВЕДЕНИЕ

P. digitatum (Persoon) Saccardo, 1881 – микромицет, оказывающий разнофакторное влияние на здоровье и качество жизни человека. Данный гриб известен как вредитель пищевых продуктов (наиболее частая причина порчи плодов цитрусовых), индуктор микогенной аллергии (IgE к аллергену данного гриба определяют в диагностических целях) и, как недавно установили, продуцент микотоксинов – триптоквивалина А и В – веществ, сходных с триптоквивалином *Aspergillus fumigatus*, близких по химическому строению к алкалоидам спорыньи [1, 2]. Описали необычный случай микоза легких со смертельным исходом, вызванный этим грибом [3]. Пациентом оказался мужчина 78 лет пониженного питания, страдавший на протяжении 12 лет бронхиальной астмой и эмфиземой легких. Рентгенологически поражение проявилось расширяющейся полостью распада в верхней доле левого легкого. Первоначально состояние расценили как аспергиллему. Противогрибковую терапию проводили в течение нескольких месяцев итраконазолом, микафунгином, вориконазолом и амфотерицином В, однако эти препараты позитивного эффекта не дали. По мере прогрессии заболевания у пациента началось отхождение гнойной мокроты, появился плевральный выпот, отметили снижение показателей функции внешнего дыхания. Смерть наступила от почечной недостаточности. Культуру *P. digitatum* выделили из мокроты, идентифицировали по частичной последовательности β-тубулина. Антитела к антигенам *P. digitatum* и *Aspergillus flavus* (перекрестная реакция) выявили в сыворотке и плевральной жидкости методом встречной иммунодиффузии по Оухтерлони.

В отношении диагностики и лечения микогенной аллергии, индуцированной *Penicillium* spp., следует обратить внимание на некоторые проблемные аспекты. Известно, что антигены и аллергены *Penicillium* spp. и *Aspergillus* spp. способны вызывать синтез перекрестно реагирующих антител. Еще в 1996 г. Brouwer J. показал, что сыворотки пациентов, в составе которых в реакции преципитации обнаружили антитела к *Penicillium* spp., также реагируют с антигенами *A. fumigatus* в ИФА, притом IgG к *Penicillium* spp. связывают антигены *A. fumigatus* молекулярной массой от 28 до 130 kDa. Учитывая подобное обстоятельство, в составе протеома и гликома *Penicillium* spp. необходимо выявить биомолекулы, которые одновременно отличались бы от прочих компонентов антигенностью / аллергенностью и специфичностью для конкретного вида данных грибов. Решение этой задачи позволит до некоторой степени устанавливать или отвергать связь между существующей у пациента аллергической патологией и биодеструкцией жилого или производственного помещения представителями рода *Penicillium*, хотя такому выводу может помешать смешанный состав микробиоты помещения и наличие полисенсibilизации у пациента. Для специфической иммунотерапии аллергенами (специфической гипосенсибилизации) на современном этапе применяют пептидные препараты. Появились сообщения об их использовании при микогенной аллергии. Данный аспект вновь обращает внимание на необходимость выявления специфических антигенных и аллергенных биомолекул, в частности – пептидной природы. С технической точки зрения одним из

наиболее удачных методов изучения смеси пептидов и низкомолекулярных белков, экстрагируемых из клеток грибов, является MALDI-TOF-масс-спектрометрия.

Цель исследования – определение состава низкомолекулярной фракции протеома *P. digitatum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичное исследование. Использовали штамм *P. digitatum* 1, переданный сотрудниками центральной клинико-диагностической лаборатории РНИИТО им. Р.Р. Вредена. Субкультивирование, масс-спектрометрическое изучение штамма и видовую идентификацию выполняли согласно Riabinin I.A., et al. [4] с применением MALDI-TOF-масс-спектрометра спектра Autoflex speed TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Полученный масс-спектр показан на рисунке 1.

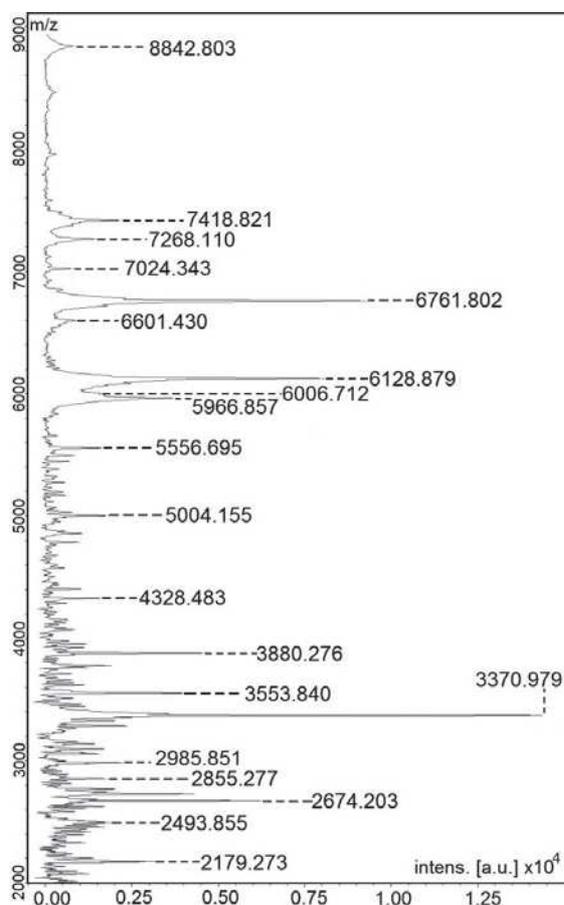


Рис. 1. Масс-спектр низкомолекулярной фракции протеома *P. digitatum* 1.

Аннотирование масс-спектра провели по Riabinin I.A. [5]. В кратком изложении методика подразумевает идентификацию спектрообразующих белков с помощью ресурса TagIdent (<http://web.expasy.org/tagident/>) на основании некоторых допущений в трактовке процесса MALDI-ионизации полипептидов. При работе с ресурсом применяли данные Wilkins M.R. и соавт. (1996, 1998), а также Gasteiger E. и соавт. (2005). Поиск гомологов осуществляли в ресурсе protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) среди представителей таксона Fungi (taxid: 4751), а при отсутствии гомологов у грибов – среди иных представителей живого мира. Гомологи регистрировали при соблюдении 2-х критериев: идентичность последовательностей

(анализируемой и гомологичной) не менее 60%, перекрытие последовательностей – не менее 90%. Фактически полученные пределы идентичности и перекрытия фиксировали в результатах. При отсутствии гомологов, отвечающих указанным критериям, определяли общие аминокислотные мотивы с последовательностями отдаленно схожих белков, если такие удалось найти.

Реконструкцию третичной структуры спектрообразующих полипептидов проводили преимущественно с применением ресурса Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>), согласно работе Arnold K. и соавт. (2006) и более поздним сообщениям [6, 7, 8], исключая пептиды, состоящие менее чем из 30 остатков, что является ограничением для моделирования. В случае если указанный ресурс не позволял провести реконструкцию, применяли редактор RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) [9, 10]. При использовании данных ресурсов учитывали и выкопировали значения показателей точности моделирования. Для краткости их определения и правила трактовки здесь не приведены, с данной информацией можно подробно ознакомиться в соответствующих разделах упомянутых сетевых редакторов [11, 12].

Анализ биологических свойств и межбелковых взаимодействий выполняли с помощью ресурсов InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) и String 10.5 (<https://string-db.org/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА

Описание низкомолекулярной фракции протеома *P. digitatum* на основании аннотирования масс-спектра представлено в таблицах 1 и 2, а также далее в тексте. Для удобства обозначения полипептиды, выявленные при анализе, отмечены аббревиатурой Pdp (*Penicillium digitatum* (poly)peptide) и цифровым номером.

Таблица 1

Перечень обнаруженных белков и пептидов с краткими характеристиками

№	Mw	m/z	δMw	N_{aa}	St. 1	St. 2
Pdp1	2322	2171,192	151	22	+	+
		2179,273	143			
Pdp2	2551	2493,855	57	23	+	—
Pdp3	2805	2728,513	76	25	+	+
		2749,007	56			
		2771,188	34			
Pdp4	2897	2855,277	42	29	+	+
Pdp5	3003	2985,851	17	29	+	+
Pdp6	3305	3287,167	18	30	+	+
Pdp7	3342	3329,485	14	28	+	+
Pdp8	3355	3354,267	1	33	+	+
Pdp9	3376	3370,979	5	29	+	+
Pdp10	3386	3384,195	2	29	+	+
Pdp11	3563	3553,840	9	32	+	+
Pdp12	3789	3780,157	9	32	+	+
Pdp13	3884	3880,276	4	31	+	—
Pdp14	4335	4328,483	7	39	+	+
Pdp15	5008	5004,155	4	45	+	+
Pdp16	5562	5556,695	5	53	+	+
Pdp17	5974	5966,857	7	48	+	+
Pdp18	6011	6006,712	4	54	+	+
Pdp19	6077	6072,225	5	56	+	+
Pdp20	6087	6087,402	0	55	+	+
Pdp21	6130	6128,879	1	55	+	+
Pdp22	6632	6601,430	31	59	—	+
Pdp23	6728	6720,674	7	63	+	+
Pdp24	6761	6761,802	0	60	+	+
Pdp25	6783	6780,735	2	65	+	+

Pdp26	7026	7024,343	2	61	+	+
Pdp27	7275	7268,110	7	66	+	+
Pdp28a	7380	7378,745	1	68	+	+
Pdp28b	7380			67	—	+
Pdp29	7407	7400,366	7	67	—	+
Pdp30	7422	7418,821	3	67	+	+
Pdp31	7454	7445,018	9	69	+	+
Pdp32	8844	8842,803	1	74	+	+

Условные обозначения: № – наименование полипептида; Mw – молекулярная масса предполагаемого полипептида; m/z – одноименная величина пика из масс-листа, приведенная в Da; δMw – разница значений молекулярной массы предполагаемого полипептида и величиной m/z образуемого им пика, округленная до целого значения; N_{aa} (number of amino acids) – количество аминокислотных остатков в полипептиде; St. 1 (strain 1) – наличие данного полипептида в протеоме штамма *P. digitatum* PHI26/CECT 20796; St. 2 (strain 2) – наличие данного полипептида в протеоме штамма *P. digitatum* Pd1/CECT 207950.

Таблица 2

Первичная структура спектрообразующих пептидов *P. digitatum*

№	Аминокислотная последовательность в коде FASTA
Pdp1	GEVLWSGFFNASATVADFCKG
Pdp1p	MRSLAWLVSLPMVADAGEVLWSGFFNASATVADFCKG
Pdp2	CTFLSLPGSILEAYNRLKKGKPK
Pdp2p	MHTTRAVANFLEMLTCTFLSLPGSILEAYNRLKKGKPK
Pdp3	LDLMDSRPDLHHIPARPEATAVPRP
Pdp3p	MHLVYLLIIRISVLGQCLDLMDSRPDLHHIPARPEATAVPRP
Pdp4	MAGGVQMGPCQVIAGSQCGFLLEASVLD
Pdp5	MTSQAVAGHSALHKFQVPTAVQPLPATSQ
Pdp6	MYTLGGVVLVDLHNDLKHCSRFLDFAGLVV
Pdp7	TKESEVDESEEDFQKRVEEAVQNMKL
Pdp7p	MILWVLYPLTFCTVTLNTEKSEVDESEEDFQKRVEEAVQNMKL
Pdp8	MVELSTLLAGSGCPKNLGEPICDFGSAVMGDE
Pdp9	MQKSEHLHGFLPGMCMMLRKEGISRLLCV
Pdp10	MYSDHRGTGEVRSPLYFVYHSPGCRWRIGN
Pdp11	MVGVPVHSGGCSLCRERRIKVNVNSHGKIELSK
Pdp12	MVLGVQRDEGLNWSGKYFNWRGRVRGAGFL
Pdp13	MKPTDKHFRCDVQRAFRTRIDHLKRHSLRRM
Pdp14	MIHMLCAKILTRLDSHDGSSKSLDRGLGRPMSLILPRSK
Pdp15	MSNSGQVLSGLEDTQITMNSPPQFIPINIMPETWDIVKVEEDTVS
Pdp16	MQRVLVHAQTDQAIASPLSPRCQVAAPGSRALTTAPPFPDVELGGFRGAGPFS
Pdp17	MRWESKGIETFWRGAHFARLSHVALFFSFLVIFRVEIEVKGRYWRVVKW
Pdp18	MKPDSISSGLPVKILCFVHLLGPFGLVINSQTSKFKHQRVQQRTHFTVEVA
Pdp19	MCMKAICSTCNKVTWVWGGSSHISVLSIPIGEWCSCCTPQVEKDGKYPKPKA ARAG
Pdp20	MDNVFSNGHGSLLMGLTRSPPLFQLSRAMKRMSAETWGRRSYNTGRTAKIG VCVV
Pdp21	MNSVHRANVAAYASNSRPTSRGPARGFYQCVCKDYGRADHLIRHVRSR MLLG
Pdp22	MRSFGVEIPGERGILSKLSLQKQAGVCSLGVVSTSKFAVCTYYRSTTYRTRE RVLK
Pdp23	MCSLGVWAGAIQKVGWGLRGLSPSGTLHSELORHGCLDHIACSSDPATGYAL RAHFELQIG
Pdp24	MIPKIQRQETFPSIDISAIGVSNRNLHEKGRVKEIETFATSLYEIDHIDIKSIDSGS
Pdp25	MISHLSETNSLTVRETDEAGNPTATVYVYSGDVASSITSSKTPAGRVDDVIGIPVN VLGYLPNTSE
Pdp26	MGFDRGLGALTFPYHTLPTPIFLSHVLFHTEPDTYDHRVWKTGLPVRSAVLK PHILHSQ
Pdp27	MNPDSRSQPREEQSPGSLNCRGRIRALIQTSDGERHYFSGTVSTDLCLMVNNA QPAPSPAPLEYL
Pdp28a	MGGGGKIPYKVEVWSPSGGWYQANWRANTAMGAFVIGVAVAVAFSISADRE HRDKMPEPGRFFPSR
Pdp28b	MYWVYPYQAGGCTGSGGANFTLAMTGTQKRVAMSGLELWLLRNVSIDES VDVSLTGRKQLPLLI
Pdp29	MADNVVPMGLCSHQDDELERSAKQDQKVPESAPLDVDENEKHKREVPDGG YGVVVCACVFWINAA
Pdp30	MPRYKEDKVSYPVGGAAQSNFTSGLILETLGGRSSDDEPRYKIENMHTHK SSSIKEGNIETPAE
Pdp31	MPVPIESSDFSPARKHEGNEAEKPKGQQLPKATATDFLSKGPQIPDNMPPKASK EELEARAKELNKSAN
Pdp32	MAGPSKSLIDPALQKYELNANRYKYWRWTPROARISFVYMALIPGILGYFAYK YEGKFLRGKRRGDTISE

Индексом «р» обозначены пептиды – предшественники.

В результате анализа для всех пиков масс-спектра удалось найти соответствующие полипептиды. Предположительно, два пептида с массами 2322 Da и 2805 Da (Pdp1 и Pdp3) при ионизации образуют несколько типов ионов, что отражено в масс-спектре в виде нескольких пиков. Напротив, пик с m/z равном 7378,745 может быть образован двумя пептидами со сходными характеристиками, которые в таблицах отмечены Pdp28a и Pdp28b. Среди всех обнаруженных полипептидов до сих пор ни один не имеет ранее установленного функционального предназначения. Пептиды Pdp1, Pdp2, Pdp3 и Pdp7 предположительно формируются в результате протеолиза более крупных предшественников (пропептидов), последовательности которых также приведены в таблице 2. Компоненты Pdp2, Pdp17, Pdp18, Pdp28a и Pdp32 способны встраиваться в билипидную мембрану. Среди изученных полипептидов и белков 13 представителей (Pdp6, Pdp8 – 12, Pdp17, Pdp20, Pdp22, Pdp25, Pdp26, Pdp28b) являются уникальными для *P. digitatum* и не имеют близких гомологов у других микромицетов; 9 представителей (Pdp5, Pdp13, Pdp15, Pdp16, Pdp18, Pdp23, Pdp24, Pdp27, Pdp29) у других микромицетов, как правило, имеют гомологи в виде фрагментов в составе более крупных белков.

Пептид Pdp1 имеет предшественника массой 4064 Da, состоящего из 38 аминокислот. При перекрытии не менее 89% и идентичности последовательностей не менее 60% сходные пропептиды удалось выявить у других представителей рода *Penicillium* (*P. expansum*, *P. italicum*, *P. chrysogenum*, *P. freii*, *P. camambertii*, *P. arizonense*, *P. nordicum*, *P. griseofulvum*, *P. oxalicum*), а также у *Aspergillus versicolor*, *A. udagawae*, *Sistotremastrum niveocreteum*, *S. sueticum*. У некоторых грибов (*Sphaerobolus stellatus* и *Exidia glandulosa*) сходные пропептиды известны, как «углевод-связывающие модули белков семейства 1».

Пептид Pdp2 имеет предшественника массой 4484 Da, состоящего из 40 аминокислот. При перекрытии не менее 95% и идентичности последовательностей не менее 66% сходные пропептиды удалось обнаружить у других представителей рода *Penicillium* (*P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. rubens*, *P. camambertii*) и *Aspergillus* (*A. bombycis* и *A. sydowii*). У *P. camambertii* сходный пропептид – цинковый «палец» CCHC-типа.

Пептид Pdp3 имеет предшественника массой 4823 Da, состоящего из 42 аминокислот. При перекрытии не менее 92% и идентичности последовательностей не менее 75% сходный пропептид смогли определить у *P. chrysogenum*. Близкие по строению пептиды, возникающие в результате протеолиза, встречаются у других представителей рода *Penicillium* (*P. rubens*, *P. camambertii*, *P. italicum*, *P. roqueforti*, *P. freii*, *P. expansum*, *P. nordicum*, *P. brasilianum*, *P. arizonense*), а также рода *Aspergillus* (*A. ruber*, *A. ochraceoroseus*, *A. rambellii*) – перекрытие не менее 80%, идентичность не менее 60%.

Пептид Pdp4 имеет гомологи у других представителей рода *Penicillium* (*P. rubens*, *P. camamberti*, *P. expansum*, *P. italicum*, *P. roqueforti*) при перекрытии 100% и идентичности последовательностей не менее 87%.

Пептид Pdp5. Отчасти сходные пептиды имеются в протеоме других представителей рода *Penicillium*, но их характеризуют меньшими величинами перекрытия

и идентичности, чем заданные пороговые значения.

Пептид Pdp7 имеет предшественника массой 5352 Да, состоящего из 45 аминокислот. Данный пропептид для *P. digitatum* является уникальным, а зрелый пептид (при перекрытии не менее 96% и идентичности не менее 62%) имеет аналоги у некоторых представителей рода *Penicillium* (*P. camamberti*, *P. roqueforti*, *P. rubens*) и *Aspergillus* (*A. glaucus*, *A. fumigatus*, *A. udagawae*, *A. zonatus*). У *P. camamberti* данный пептид сходен с участком последовательности белка из 206 аминокислот, несущего мотив типа TonB.

Пептид Pdp13 имеет цинковый «палец» типа C2H2. Сходных пептидов близкой длины цепи у других микромицетов не выявили; данная последовательность гомологична участкам цепи некоторых белков, также несущих цинковый «палец» и ДНК-связывающий домен, но обладающих гораздо более длинной цепью аминокислот (свыше 600 остатков). Такие белки обнаружили у представителей родов *Penicillium*, *Talaromyces*, *Aspergillus*, *Byssosclamyces*, *Rasamsonia*, *Emmonsia*, *Paracoccidioides*, *Blastomyces*, *Histoplasma*. Многих из них относят к регуляторам транскрипции.

Пептид Pdp14 при перекрытии 100% и идентичности 87% сходен с гипотетическим пептидом РИТС из 42 аминокислот, который продуцирует *P. italicum*.

Пептид Pdp15. Сходных пептидов у других микромицетов найти не удалось, однако наблюдали похожие участки в последовательностях белков у *P. expansum*, *P. chrysogenum* и *P. italicum*. Белки этих грибов более длинные (свыше 200 аминокислот), их функции не установлены.

Белок Pdp16 гомологичен фрагменту белка из 811 аминокислот у *P. rubens*.

Белок Pdp18. Сходных белков у других микромицетов установить не удалось, близкие фрагменты имеются в структуре более крупных белков из нескольких сотен остатков, которые известны в протеоме других *Penicillium* spp., в том числе – ГТФазная (SRP54) субъединица сигнал-распознающей частицы у *P. camamberti*.

Белок Pdp19 при перекрытии не менее 89% и идентичности последовательностей не менее 60% имеет гомологи у широкого круга грибов, в том числе представителей родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phialocephala*, *Pestalotiopsis*, *Marssonina*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Cordyceps*, *Lepidopterella*, *Fusarium*, *Dothistroma*, *Stachybotrys*, *Isaria*, *Pyrenophora*, *Ophiocordyceps*, *Glomium*, *Thermothelemyces*, *Cenococcum*, *Beauveria*, *Paraphaeosphaeria*, *Oidiodendron*, *Thielavia*, *Verticillium*, *Acidomyces*, *Colletotrichum* и *Magnaporthe*. У *P. camamberti* сходный белок является железо- и серосвязывающим сайтом ферредоксина типа 2Fe-2S.

Белок Pdp21, несущий цинковый «палец» типа C2H2, сходен с белком, несущим цинковый «палец», у *P. italicum* (перекрытие – 100%, идентичность – 75%). Сходный фрагмент есть в структуре неопределенного белка у *P. rubens*, состоящего из 204 аминокислот.

Белок Pdp23 в виде самостоятельной последовательности имеется только у *P. digitatum*. У других микромицетов (родов *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Aspergillus*, *Metarhizium*, *Pochonia*, *Talaromyces*, *Purpureocillium* и *Colletotrichum*) сходные последовательности (с перекрытием до 98% и идентичностью до 60%) входят в структуру различных гидролитических ферментов. Среди таких ферментов – пептидазы, ги-

дролазы N-карбиноламин-L-аминокислот, β-аланин-синтаза, амидазы (гидантоиназа, карбамоилаза).

Белок Pdp24 в виде самостоятельной последовательности имеется только у *P. digitatum*. У других представителей рода *Penicillium* сходные последовательности (с перекрытием до 91% и идентичностью до 71%) входят в структуру РНК-зависимой ДНК-полимеразы *P. camamberti* и белка неуточненной функции у *P. frei*.

Белок Pdp26. Сходные последовательности у штаммов *P. digitatum* входят в состав L-лизин-2,3-аминомутаз (107-119 аминокислот), у других микромицетов достаточно близкие (с учетом установленных показателей) последовательности в виде отдельных белков или в составе более крупных полипептидов не обнаружили.

Белок Pdp27 в виде самостоятельной последовательности имеется только у *P. digitatum*. Найдены гомологичные участки в составе более крупных белков (137 остатков) у других представителей рода *Penicillium*, но их функции неизвестны.

Белки Pdp28a и Pdp28b в формировании пика, как было указано выше, являются альтернативными. Pdp28a, по-видимому, относится к весьма консервативным, поскольку с перекрытием не менее 95% и идентичностью не менее 69% сходные последовательности нашли у представителей 56 родов аскомицетов. Однако функции этих белков неизвестны. Для Pdp28b гомологов у других микромицетов выявить не удалось.

Белок Pdp29 в виде самостоятельной последовательности имеется только у *P. digitatum*. Найдены гомологичные участки в составе более крупных транскрипционных белков (более 500 остатков) у других представителей рода *Penicillium* (перекрытие не менее 98%, идентичность не менее 75%).

Белок Pdp30 несет домен DUF2945 (домен неизвестной функции). Сходные белки при перекрытии последовательности 100% и идентичности не менее 63% нашли у *P. expansum*, *P. nordicum*, *P. camamberti*, *P. roqueforti*, *P. rubens*, *P. arizonense*.

Белок Pdp31 при перекрытии не менее 95% и идентичности последовательностей не менее 61% имеет гомологи у других представителей рода *Penicillium* (*P. griseofulvum*, *P. rubens*, *P. frei*, *P. expansum*, *P. nordicum*, *P. roqueforti*, *P. brasilianum*, *P. oxalicum*, *P. arizonense*) и *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. clavatus*, *A. nidulans*, *A. sydowii*, *A. versicolor*). У *P. italicum* сходная последовательность входит в состав белка, участвующего в репарации ДНК (1038 аминокислот).

Белок Pdp32 несет домен NDUFB4 (домен субъединицы В15 НАДФ-убиквитин-оксидоредуктазы). Сходные белки при перекрытии последовательности 91% и идентичности не менее 67% нашли у представителей родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Byssosclamyces*, *Emmonsia*, *Blastomyces*, *Paracoccidioides*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Arthroderma*, *Trichophyton*.

Pdp6, Pdp9, Pdp20 и Pdp28b не имеют достаточно близких структурных гомологов не только среди белков грибов, но и других живых организмов. В отношении Pdp8 следует заметить, что удалось найти некоторые значительно более крупные белки, перекрывающие своими сходными фрагментами последовательность Pdp8 на ≈60%. После некоторой корректировки перечня найденных белков с удалением отдельных

гомологов, «выпадающих» из общего ряда по особенностям структуры, обнаружили общий для них мотив в аминокислотной последовательности, который имеет следующий вид (неидентичные участки отмечены знаком «-» по числу различающихся остатков, которое обозначено нижним индексом, где «v» - варибельное):

EEE(-)₉Y-P-RIGE(-)₅YQ-VGKLG-G(-)₂ST-WLARD(-)_v
 V-LK(-)₈G(-)₅EL(-)₂Y(-)_vH-G(-)₃VR-LLD-F(-)₃GP(-)₃
 H-CLVH-PL(-)₂S(-)₃FL-RNP(-)₃LP(-)₇L(-)₃AL(-)₃H-
 EC(-)₃HT(-)₂K-DNI(-)₅D-S(-)₄FE(-)₂E(-)₃P-PRK(-)_vR(-)₂
 Y-S(-)₂L(-)₂P(-)₃G-P-LCDF-S(-)₃GD(-)_vQP(-)₂YR-P-
 VIL(-)₂PW-Y(-)₂D-WN(-)₂C(-)_vW(-)₃EG(-)₃F(-)₃DPE(-)₃
 YRSRAHLA(-)₄LL.

Белки, обладающие такой структурной особенностью, оказались протеинкиназами некоторых классов из *P. chrysogenum*, *P. camemberti*, *P. roqueforti*, *Madurella mycetomatis*, *Coniochaeta ligniaria*, *Acremonium chrysogenum*, *Histoplasma capsulatum*, *Pochonia chlamydosporia*, а также гипотетическими белками неясной функции из *P. vulpinum*, *Penicillium zonata*, *A. wentii* и *Pseudomynoascus* sp.

Пептид Pdp10 имеет общий короткий мотив с белками пенициллов (*P. italicum*, *P. flavigenum*, *P. roqueforti* и *P. nalgiovense*): Y-D(-)₃TGEV-SPYLFVYH(-)₂G. При этом у *P. roqueforti* и *P. italicum* такие гомологи являются AAA-доменами АТФаз. Pdp11 отделенные гомологи перекрывают сходными регионами немногим более чем на 50%; гомологичные белки, по большей части, неуточненной функции, отдельные представители Zn-зависимые ДНК-связывающие белки – факторы транскрипции грибов рода *Aspergillus* и *Penicillium*, но единого общего аминокислотного мотива представители этой группы не имеют. Pdp12 и гипотетический белок *P. rubens* из 216 аминокислот имеют общий мотив MVLGV-RR-EGLNWSGY-YF-WRGRVRG. Пептид Pdp17 и крупные белки (свыше 470 остатков) других пенициллов (*P. nordicum*, *P. camemberti*, *P. rubens*), один из которых является сахарозно-протонным-симпортером, несут довольно условный мотив вида G-E(-)₂W(-)₄FA-LS(-)₄F-SFL(-)₄V-I-VKGR-W(-)₃W.

Мотив V(-)₂P-E(-)₂ILSK(-)₂LK(-)₄V(-)₂S-GVR(-)₂T(-)₂F(-)₂TCTYY(-)₃T(-)₆V-K является общим для пептида Pdp22 и белка из 80 аминокислот, открытого у *P. polonicum*. Для Pdp25 найдены лишь отдаленные гомологи у *Penicillium* spp. и *Aspergillus* spp., сходство с которыми выражается меньшими величинами идентичности и перекрытия, чем установленные в дизайне исследования; эти белки состоят, в среднем, примерно из 500 аминокислот, практически не имеют общих для всей подборки аминокислотных остатков, некоторые из них авторами отмечены, как обладатели домена неизвестной функции DUF647, а также члены семейства трансмембранных белков RUS1.

Результаты реконструкции третичной структуры выявленных полипептидов, по данным ресурса Swiss-Model, представлены на рисунке 2 и в таблице 3, а для тех полипептидов, структуру которых моделировали в RaptorX, итоги реконструкции показаны на рисунке 3 и в таблице 4. В целом, у анализируемых полипептидов полученные модели характеризуются относительно низкими показателями точности, исключая Pdp2p, Pdp13 и Pdp27. У моделей, построенных в RaptorX, обращает внимание достаточно небольшой показатель R-уровня, но при этом у Pdp6 и Pdp14 опти-

мальное для коротких последовательностей значение GDT (ненормализованный общий тест дистанции, в данном случае более 50).

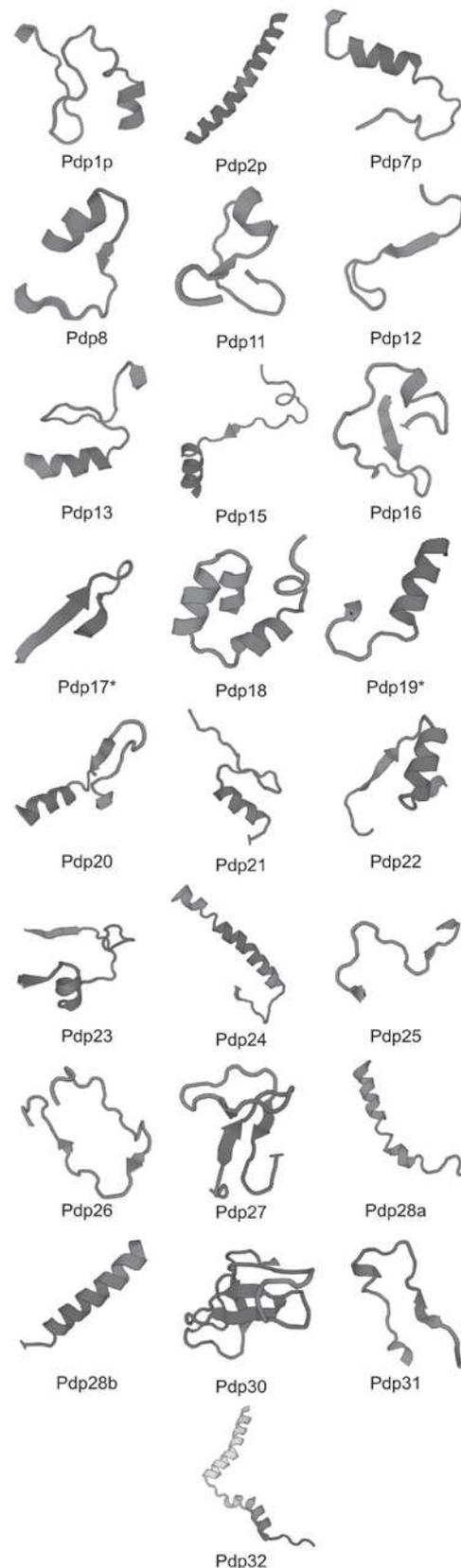


Рис. 2. Третичная структура спектрообразующих белков и пептидов *P. digitatum* 1 по данным Swiss-Model. Знаком «*» отмечены полипептиды, для которых модель удалось построить не для всей цепи.

Таблица 3

Модели, использованные для воссоздания вероятной пространственной конформации спектрообразующих полипептидов *P. digitatum*

Pdps	Белок-«шаблон», его происхождение и номер.	QMEAN	Seq. Id.
Pdp32	Субъединица 4А субкомплекса 1β НАДН-убихинон-дегидрогеназы респираторного суперкомплекса I ₁ III ₁ IV ₁ млекопитающих. Шаблон № 5qur.40.	-3,07	26,00%
Pdp31	Спиральный домен фактора сплайсинга пре-мРНК SF1 из мышины эмбриональных фибробластов линии NIH 3T3. Шаблон № 4fxx.1.	-1,93	26,92%
Pdp30	Гипотетический белок CNAG_02591 из <i>Cryptococcus neoformans</i> . Шаблон № 4p5n.1.	-1,80	15,38%
Pdp29	Невозможно построить модель.		
Pdp28b	Гликозилированная бифункциональная нуклеаза TBN1 из томата. Шаблон № 3snq.1.	-1,25	36,67%
Pdp28a	Субъединица SecE транслоказы белков <i>Escherichia coli</i> . Шаблон № 5abb.1.	-3,21	10,00%
Pdp27	Кальциевый переносчик из митохондрий человека. Шаблон № 5kuq.1.	0,59	32,35%
Pdp26	Белок M130, обогащенный цистеином — корецептор мембранного белка CD163 свиньи. Шаблон № 5hrj.1.	-3,48	8,57%
Pdp25	Гликозидгидролаза семейства 9 (целлюлаза CbhA) из <i>Clostridium thermocellum</i> . Шаблон № 3k4z.1.	-2,25	30,00%
Pdp24	CRISPR-ассоциированная эндорибонуклеаза C2c2 из <i>Leptotrichia shahii</i> . Шаблон № 5wtj.1.	-1,23	32,50%
Pdp23	β-аланин-синтаза из <i>Saccharomyces kluyveri</i> . Шаблон № 1r43.1.	0,31	26,47%
Pdp22	5,10-метилтетрагидрофолатредуктаза из <i>E. coli</i> . Шаблон № 1zр3.1.	-0,83	27,27%
Pdp21	ДНК-связывающий димеризующийся белок мыши, несущий «цинковый палец». Шаблон № 1f2i.1.	-2,34	32,35%
Pdp20	Домен PU.1 фактора транскрипции семейства Ets мыши. Шаблон № 1rue.1.	-3,53	21,21%
Pdp19*	Белок задержки роста 2 мыши. Шаблон № 1v5r.1.	-2,81	19,05%
Pdp18	F-домен 4 (распознающий) из комплекса убиквитин-лигазы SCF(Fbx4) человека. Шаблон № 3l2o.1.	-2,37	20,00%
Pdp17*	Синтетический β-складчатый белок OR485 искусственного происхождения. Шаблон № 5kph.1.	1,57	46,67%
Pdp16	Паркин (белок, стабилизирующий E3 убиквитин-протеин-лигазу) крысы. Шаблон № 4k95.1.	-2,01	24,24%
Pdp15	Никотинат-фосфорибозилтрансфераза из <i>Enterococcus faecalis</i> . Шаблон № 2f7f.1.	-0,53	15,63%
Pdp14	Невозможно построить модель.		
Pdp13	Крюпель-подобный фактор 5 человека. Шаблон № 2ebt.1.	-1,71	43,33%
Pdp12*	Белок Cгубg3 мыши, несущий домен β/γ-кристаллина. Шаблон № 4fd9.1.	-3,59	27,78%
Pdp11*	ДНК-связывающий белок GAL4 из <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Шаблон № 1aw6.1.	-3,36	16,67%
Pdp8*	4-оксалокротонат-декарбоксилаза NahK из <i>Pseudomonas putida</i> . Шаблон № 5d2f.1.	-1,37	33,33%
Pdp7p	Субъединица F АТФ-синтазы типа V из <i>Thermus thermophilus</i> . Шаблон № 5gar.1.	-1,64	7,14%
Pdp6	Невозможно построить модель.		
Pdp3p	Невозможно построить модель.		
Pdp2p	Гликопротеин E2 коронавируса SARS. Шаблон № 2bez.1.	-0,86	31,25%
Pdp1p	Белок-репрессор оперона устойчивости к мышьяку из <i>Bacteroides vulgatus</i> . Шаблон № 3ktb.1.	-0,51	21,43%

Условные обозначения: Pdps – спектрообразующие полипептиды *P. digitatum*; звездочкой (*) отмечены те Pdp, у которых найденный «шаблон» отличается низким сходством с анализируемой последовательностью; QMEAN – показатель качества моделирования в ресурсе Swiss-Model; Seq. Id. – сходство анализируемой последовательности Pdp и белка-«шаблона».

Таблица 4

Характеристики моделей спектрообразующих полипептидов *P. digitatum*, построенных с помощью ресурса RaptorX

Pdps	Показатели точности моделирования	Белковый «шаблон»
Pdp29	P-уровень=4,36e-02 uGDT=18 GDT=27 uSeqId=4 SeqId=6 Score=19	Переносчик дофамина <i>Drosophila melanogaster</i> . Шаблон № 4xp4:A.
Pdp14	P-уровень=3,33e-02 uGDT=20 GDT=52 uSeqId=7 SeqId=18 Score=17	Комплекс (гетеродимер) ДНК-связывающих теломерных белков α и β из <i>Sterkiella (Oxytricha) nova</i> . Шаблон № 2i0qB.
Pdp6	P-уровень=1,93e-02 uGDT=24 GDT=81 uSeqId=7 SeqId=23 Score=16	Цистатионин-γ-синтаза <i>E. coli</i> . Шаблон № 1c51A.
Pdp3p	P-уровень=3,27e-02 uGDT=17 GDT=42 uSeqId=8 SeqId=19 Score=18	АТФ-зависимая рестриктаза-ДНК-модифицирующий белок LlaBIII (типа ISP) <i>Lactococcus lactis</i> . Шаблон № 4xqkA.

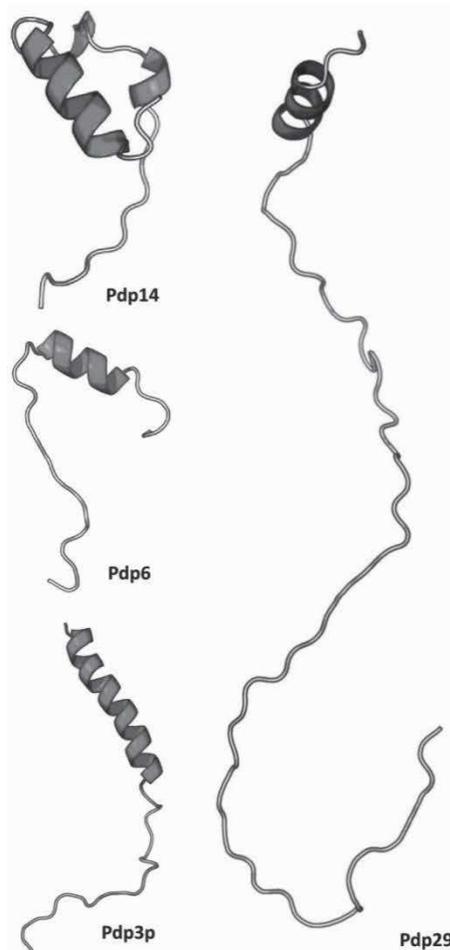


Рис. 3. Третичная структура спектрообразующих белков и пептидов *P. digitatum* 1 по данным RaptorX.

Поиск функциональной принадлежности выявленных белков и пептидов с использованием биоинформационных ресурсов оказался мало результативным. Ресурс InterPro не позволил установить дополнительные данные о биологических свойствах и

клеточной локализации. В базе STRING 10.5 для представителей рода *Penicillium* межбелковые взаимодействия приведены только для штаммов *P. chrysogenum* (*P. notatum*) Wisconsin 54-1255 и *P. marneffeii* ATCC 18224. Среди белков второго из указанных видов ранее проведенный поиск гомологов не выявил совпадений, а некоторым белкам и пептидам *P. chrysogenum* гомологичны Pdp1, Pdp2, Pdp3 и Pdp15. Тем не менее, для близких полипептидов *P. chrysogenum* межбелковые взаимодействия, как выяснилось, еще неизвестны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования анализируемый масс-спектр фракции протеома удалось аннотировать полностью, однако для большинства слагающих его пептидов и низкомолекулярных белков еще не установлена четкая функциональная принадлежность. Значительная доля компонентов явилась консервативной и, как оказалось, представлена полипептидами, сходными как у представителей семейства *Trichocomaceae* (рода *Penicillium*, *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Byssoscleris*), так и у представителей других таксонов аскомицетов.

Заметим, что наиболее стабильной третичной структурой обладают белки, состоящие примерно из $n \times 100$ аминокислотных остатков. Относительно короткие последовательности, выявленные в данном анализе, обладают весьма подвижной пространственной конформацией (особенно в растворе), которую трудно рассматривать как истинную третичную структуру. Тем не менее, ее реконструкция представляет определенный интерес, поскольку взаимодействия типа «субстрат-фермент» и «лиганд-рецептор», а также «эпитоп (антигена)-паразит (антитела)» требуют от низкомолекулярного вещества-участника находится в специфичной для данного взаимодействия пространственной конфигурации.

В дальнейшем представляет интерес исследование антигенных и аллергенных свойств данных веществ при конъюгировании с адъювантом, а также выявление перекрестных реакций антител типа IgE и других классов, полученных в ответ на введение таких аллергенов, с аллергенами (антигенами) других микромицетов и антигенами немикробной природы.

Помимо прикладного исследования, представляет интерес вопрос о биологической функции выявленных полипептидов и их клеточной топологии. Многие обнаруженные полипептиды гомологичны последовательностям в структурах белков более крупного размера. Неясно, следует ли данный феномен расценивать как возникшие в эволюции *P. digitatum* мутации, которые привели к укорочению кодирующей области более протяженных предковых генов. Ответить на данные вопросы станет возможным только после сравнительного исследования регионов генома *P. digitatum* и других микромицетов, с компонентами протеома у которых удалось найти сходства.

За предоставление штамма для исследования выражаем благодарность врачам-бактериологам В.В. Шабановой и А.Н. Рукиной (центральная клиничко-диагностическая лаборатория, научное отделение профилактики и лечения раневой инфекции РНИИТО им. Р.Р. Вредена).

Работа поддержана в рамках НИР по Государственному заданию Минздрава РФ «Молекулярные предикторы развития микозов и микоаллергозов различного генеза на основе иммунопатогенеза» (№АААА-А16-116042010012-0).

ЛИТЕРАТУРА

1. Marcet-Houben M., et al. Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. BMC Genomics. 2012; 13.
2. Dhanasekaran D., Thajuddin N., Panneerselvam A. Antimicrobials: synthetic and natural compounds. CRC Press, 2015: 524 p.
3. Oshikata C., et al. Fatal pneumonia caused by *Penicillium digitatum*: a case report. BMC Pulm. Med. 2013; 13.
4. Riabinin I.A., Vasilyeva N.V., Bogomolova T.S., et al. MALDI-TOF-mass-spectrometry of protein extracts for ascertainment of phylogenetic relationships between clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. 6th Advances Against Aspergillosis. 2014: 119-120.
5. Riabinin I.A. Polypeptides from *Aspergillus* spp. forming mass-spectra during MALDI-TOF-mass-spectrometry// Wu Lien-Teh Forum. The 3rd China-Russian International Conference on Microbiology, Immunology and Related Diseases (CRICMID 2016). 2016: 36-38.
6. Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. Nucleic Acids Research. 2014; 42 (W1): 252-258.
7. Kiefer F., Arnold K., Künzli M., et al. The SWISS-MODEL repository and associated resources. Nucleic Acids Research. 2009; 37: D387- D392.
8. Guex N., Peitsch M.C., Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. Electrophoresis. 2009; 30 (1): 162-173.
9. Ma J., Wang S., Zhao F., Xu J. Protein threading using context-specific alignment potential. Bioinformatics. 2013; 29 (13): 257-265.
10. Källberg M., Wang H., Wang S., et al. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. Nature Protocols. 2012; 7 (8): 1511-1522.
11. SWISS-MODEL Help [Electronic resource]. – 2017. <https://swissmodel.expasy.org/docs/help>.
12. RaptorX Docs [Electronic resource]. – 2017. <http://raptorx.uchicago.edu/documentation/>.

Поступила в редакцию журнала 21.08.2017

Рецензент: Е.Р. Рауш



АНТИМИКОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ СЕРЕБРЯНЫХ СОЛЕЙ ПИРАЗОЛ-3-КАРБОКСАМИДОВ

Новикова В.В. (зав. кафедрой)*, Гейн В.Л. (зав. кафедрой), Бобровская О.В. (доцент)

Пермская государственная фармацевтическая академия МЗ РФ (кафедра микробиологии, кафедра общей и органической химии и кафедра фармацевтической химии), Пермь, Россия

© Коллектив авторов, 2017

Изучено противогрибковое действие новых серебряных солей пиразол-3-карбоксамидов. Выявлена высокая антимикотическая активность в отношении представителей рода *Candida* как типовых, так и клинических штаммов, в том числе в отношении проблемного возбудителя – *C. krusei*.

Ключевые слова: антимикотическая активность, *Candida* spp., микозы, серебряные соли пиразол-3-карбоксамидов

ANTIMYCOTIC ACTIVITY OF NEW SILVER SALTS OF PYRAZOL-3-CARBOXAMIDE

Novikova V.V. (head of the chair), Gein V.L. (head of the chair), Bobrovskaya O.V. (assistant professor)

Perm State Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of Russia (microbiology chair, organic chemistry chair, pharmaceutical chemistry chair), Perm, Russia

© Collective of authors, 2017

The antifungal effect of the new silver salts of pyrazole-3-carboxamides was studied. High antimycotic activity against representatives of the *Candida* spp. both typical and clinical strains, including problematic agent – *C. krusei* was revealed.

Key words: antimycotic activity, *Candida* spp., mycoses, silver salts of pyrazole-3-carboxamides

ВВЕДЕНИЕ

Представители рода *Candida* имеют большое значение в этиологии как тяжелых инвазивных микозов, так и большого числа поверхностных форм грибковой инфекции [1-5]. Типичным является поражение кожи и ее придатков. *Candida* spp. – значимые патогены в этиологии онихомикозов, обуславливающие до 18-20% случаев заболеваний [6]. Данные микроорганизмы имеют особое значение в развитии инфекций нижнего отдела полового тракта [2-4]. Кандидозный вульвовагинит (КВ) – типичная инфекционная патология женских половых органов. По данным Sobel J.D. и Marchaim D. [4, 7], у 75% женщин фиксируют, по крайней мере, один эпизод кандидозного поражения слизистой оболочки влагалища в течение жизни, почти у половины из них возникают рецидивы. В большинстве случаев причиной данной патологии является *C. albicans*. Однако в последнее время наблюдают тенденцию к увеличению значимости не-*albicans* видов *Candida*, например, по данным [8], частота выделения этих микромицетов при КВ составила: *C. glabrata* – 10%, *C. krusei* – 5%, *C. tropicalis* – 5%. По результатам наших исследований [9], доминирующими патогенами в данной группе также были *C. krusei* (10,6%) и *C. glabrata* (7,7%). Частота выделения этих возбудителей при инвазивных кандидозах еще выше: *C. tropicalis* – 7,8-28%, *C. parapsilosis* – 9,4-18%, *C. glabrata* – 12-17,2%, *C. krusei* – 6-10,9% [10, 11]. В соответствии с полученными результатами многоцентрового исследования ARTEMIS Disk, проведенного с 2003 по 2008 гг. [1], частота выделения не-*albicans* видов *Candida* при поверхностных и инвазивных кандидозах была существенно ниже: *C. glabrata* – 5,3%, *C. krusei* – 3,4%, *C. parapsilosis* – 3,1%, *C. tropicalis* – 1,8%.

В настоящее время появляются сообщения о снижении чувствительности *Candida* spp. к наиболее часто применяемому в практике противогрибковому препарату азолового ряда – флуконазолу. Так, по данным Легоу О. [5], чувствительность к этому антимикотику снизилась на 17%. В работе [2] также подтверждено прогрессивное снижение чувствительности *C. albicans* к флуконазолу: количество чувствительных штаммов за семилетний период наблюдения уменьшилось со 100% до 70,4%. По результатам наших исследований [9], зафиксированы высокие показатели резистентности изолятов *Candida* spp., выделенных из отделяемого половых путей, к антимикотикам азолового ряда: 64,8% *C. albicans* были резистентны к клотримазолу, 88,9% – к кетоконазолу, 90,7% – к флуконазолу. Большинство (60-80%) изолятов *C. glabrata* проявили устойчивость к кетоконазолу и флуконазолу. Наиболее часто резистентные к флуконазолу штаммы выявляли у *C. krusei* – 100% изолятов [9, 11, 12].

Таким образом, ввиду наличия стабильной тенденции к прогрессированию резистентности наиболее значимых патогенов к антимикотическим средствам, а также проблемы импортозамещения, разработка новых отечественных противогрибковых препаратов является важным направлением фармации и медицины. Полученные нами ранее результаты [13] свидетельствуют о перспективности поиска эффективного антимикотического средства среди серебряных солей гетероциклических соединений.

Цель исследования – определение антифунгаль-

* Контактное лицо: Новикова Валентина Васильевна, e-mail: vvnperm@yandex.ru

ной активности новых серебряных солей пиразол-3-карбоксамидов, содержащих сульфаниламидный фрагмент, в отношении типовых и клинических штаммов дрожжей рода *Candida* и выявление наиболее активных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами впервые реакцией N-[4-(тиазол-2-илсульфамойл)фенил]-5-арил-1-фенилпиразол-3-карбоксамидов [14] с серебра нитратом в среде этанол-ДМФА (в соотношении 2:1) были получены серебряные соли пиразол-3-карбоксамидов общей формулы (Рис. 1, табл. 1).

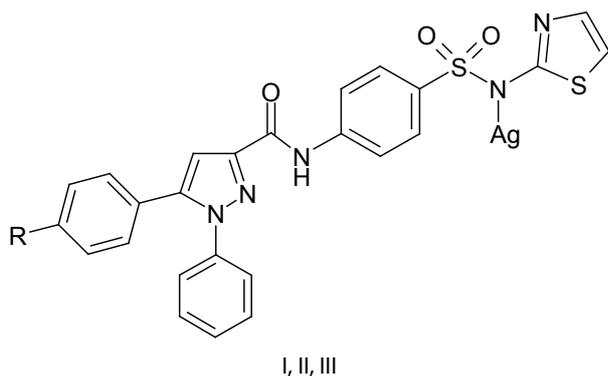


Рис. 1. Общая структурная формула серебряных солей пиразол-3-карбоксамидов (I, II, III).

Таблица 1.

Структура, температуры плавления и выходы серебряных солей пиразол-3-карбоксамидов

Соединение	R	Т. пл., °С	Выход, %
I	CH ₃ O	214–216	74
II	Cl	217–219	79
III	H	219–221	82

Выход соединений составил 74–82%. Ход реакций и степень чистоты синтезированных соединений контролировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Silufol UV-254. Строение было доказано методами ЯМР ¹H (ядерного магнитного резонанса) и ИК (инфракрасной) спектроскопии. Температуру плавления синтезированных соединений определяли на приборе Melting Point M-565.

В качестве тест-культур использовали типовые (*C. albicans* 885-653 и *C. albicans* 10231) и клинические изоляты отделяемого половых путей (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*), имевшие различный профиль чувствительности к антимикотическим препаратам.

Исследование противогрибковой активности соединений проводили рекомендованным [15, 16] микрометодом двукратных серийных разведений в жидкой среде (в 96-луночных планшетах), чувствительность каждого из штаммов выявляли в двух повторах. Для приготовления взвеси дрожжевых культур применяли двухсуточные культуры, выращенные на плотной питательной среде Сабуро. Концентрация микробных клеток в опыте составила 2–5·10⁴ КОЕ/мл. Культивирование посевов дрожжей в эксперименте осуществляли на бульоне Сабуро. В качестве положительного контроля использовали питательную среду без противогрибкового препарата с внесенной исследуемой культурой, качество среды контролировали с применением референтных штаммов. В качестве отрицательного контроля применяли питательную среду без возбудителя. Планшеты инкубировали в термостате при температуре 35 °С±2 °С. Оценку роста культур проводили визуально на 40–48 час и 70–72 час инкубирования в соответствии с [16]. За минимальную подавляющую концентрацию (МПК) препарата принимали его концентрацию в последней прозрачной лунке серии разведения. Первичные результаты обрабатывали с помощью стандартных статистических методов, усредняя результаты, полученные в двух повторах. В качестве сравнения использовали данные De Vita D. [17] по флуконазолу, МПК которого в отношении *C. albicans* – 0,25–16 мкг/мл, в отношении штаммов не-*albicans* видов – 0,5–64 мкг/мл.

Результаты и обсуждение

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследована противогрибковая активность 3 соединений в отношении 2 типовых и 6 клинических штаммов *Candida* spp.: 2 штаммов *C. albicans*, 2 штаммов *C. krusei*, 1 штамма *C. glabrata*, 1 штамма *C. tropicalis*. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Антимикотическая активность изученных соединений в отношении типовых и клинических штаммов *Candida* spp.

Исследуемая культура	МПК, мкг/мл		
	I	II	III
<i>C. albicans</i> NCTC 885-653	1,0	1,0	1,0
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,1	0,6	3,12
<i>C. albicans</i>	6,25	3,12	31,3
<i>C. albicans</i>	0,15	0,2	7,8
<i>C. krusei</i>	3,12	7,8	4,7
<i>C. krusei</i>	4,7	12,5	12,5
<i>C. glabrata</i>	6,25	2,4	37,5
<i>C. tropicalis</i>	9,4	9,3	37,5

Клинические изоляты традиционно проявляли большую устойчивость к соединениям, обладающим противогрибковым действием, нежели типовые штаммы. Тем не менее, соединения I и II проявили высокую антимикотическую активность в отношении как изолятов *C. albicans* (МПК 0,15–6,25 мкг/мл), так и других значимых представителей рода *Candida* (МПК 2,4–12,5 мкг/мл). Важно отметить подавление роста изученными соединениями клинических изолятов *C. krusei*, являющихся проблемными возбудителями поверхностных и инвазивных кандидозов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами получены новые серебряные соли пиразол-3-карбоксамидов, обладающие высокой активностью в отношении представителей *Candida* spp., в ряде случаев превышающие активность препарата сравнения. Выявлены перспективные соединения (I, II), имеющие заместители в 4 положении 5-арильного фрагмента пиразол-3-карбоксамидов, подлежащие дальнейшему изучению как антимикотической активности (расширенный спектр клинических изолятов, скорость формирования резистентности), так и других показателей доклинических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веселов А.В., Климко Н.Н., Кречикова О.И. и др. In vitro активность флуконазола и вориконазола в отношении более 10000 штаммов дрожжей: результаты 5-летнего проспективного исследования ARTEMIS disk в России. Клини. микро-

- биол. антимикроб. химиотер. 2008; 10 (4): 345-354. [Veselov A.V., Klimko N.N., Krechikova O.I. i dr. In vitro aktivnost flukonazola i vorikonazola v otnoshenii bolee 10000 shtammov drozhzhey: rezultaty 5-letnego prospektivnogo issledovaniya ARTEMIS disk v Rossii. Klin. mikrobiol. antimikrob. himioter. 2008; 10 (4): 345-354. (In Russ)]
2. Анкирская А.С., Муравьёва В.В., Фурсова С.А. и др. Мониторинг видового состава и чувствительности к антимикотикам дрожжеподобных грибов, выделенных из влагалища женщин репродуктивного возраста. Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. 2006; 8 (1): 87-95. [Ankirskaia A.S., Muravyova V.V., Fursova S.A. i dr. Monitoring vidovogo sostava i chuvstvitel'no-sti k antimikotikam drozhzhepodobnykh gribov, vydelennykh iz vlagalischa zhenshin reproduktivnogo vozrasta. Klin. mikrobiol. antimikrob. himioter. 2006; 8 (1): 87-95. (In Russ)]
 3. Клишко Н.Н., Козлова Я.И., Васильева Н.В. и др. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели LIFE program. Проблемы мед. микологии. 2014; 16 (1): 3-8. [Klimko N.N., Kozlova Ya.I., Vasileva N.V. i dr. Rasprostranennost tyazhelykh i hronicheskikh mikoticheskikh zabolevaniy v Rossiyskoy Federatsii po modeli LIFE program. Problemy med. mikologii. 2014; 16 (1): 3-8. (In Russ)]
 4. Sobel J.D. Vulvovaginal candidosis. Lancet 2007; 369: 1961-71.
 5. Leroy O., Gangneux J.-P., et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). Crit. Care Med. 2009; 37: 1612-1618.
 6. Новикова В.В., Кучевасова М.В., Коломойцев А.В. Структура дерматомикозов в Пермском крае: клинико-эпидемиологический анализ. Современные проблемы науки и образования. 2016; 2: 30. [Novikova V.V., Kuchevasova M.V., Kolomoitsev A.V. Struktura dermatomikozov v Permskom krae: kliniko-epidemiologicheskii analiz. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya. 2016; 2: 30. (In Russ)]
 7. Marchaim D., Lemanek L., Bheemreddy, et al. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. Obstetrics & Gynecology. 2012; 120 (6): 1407-1414.
 8. Арутюнян Н.С., Мкртчян А.А., Агафонов П.С. Кандидозные вульвовагиниты у женщин в период беременности. Проблемы медицинской микологии. 2015; 17 (2): 40. [Arutyunyan N.S., Mkrtychyan A.A., Agafonov P.S. Kandidoznyie vulvovaginity u zhenshin v period beremennosti. Problemy meditsinskoy mikologii. 2015; 17 (2): 40 (In Russ).]
 9. Новикова В.В., Езов С.Г., Селиванова А.И. Анализ видового состава и чувствительности клинических изолятов *Candida* spp. к современным антимикотикам. Медицинский альманах. 2017; 2: 138-141. [Novikova V.V., Ezov S.G., Selivanova A.I. Analiz vidovogo sostava i chuvstvitel'nosti klinicheskikh izolyatov *Candida* spp. k sovremennym antimikotikam. Meditsinskiy almanah. 2017; 2: 138-141. (In Russ).]
 10. Куцевалова О.Ю., Янковская Г.В., Аствацатурьян Е.И. и др. Характеристика возбудителей инвазивного кандидоза. Проблемы мед. микологии. 2014; 16 (2): 97. [Kutsevalova O.Yu., Yankovskaya G.V., Astvatsaturyan E.I. i dr. Harakteristika vozбудiteley invazivnogo kandidoza. Problemy med. mikologii. 2014; 16 (2): 97. (In Russ)].
 11. Рауш Е.Р., Выборнова И.В., Шагдильева Е.В. и др. Определение чувствительности возбудителей инвазивного кандидоза к флуконазолу и вориконазолу по международным стандартам. Проблемы мед. микологии. 2013; 15 (2): 60-63. [Rausch E.R., Vybornova I.V., Shagdileeva E.V. i dr. Opredelenie chuvstvitel'nosti vozбудiteley invazivnogo kandidoza k flukonazolu i vorikonazolu po mezhdunarodnyim standartam. Problemy med. mikologii. 2013; 15 (2): 60-63. (In Russ).]
 12. Pfaller M.A., Diekema D.J., Gibbs D.L., et al. Results from the Artemis disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. J. of Clin. Microbiol. 2010; 4: 1366-1377.
 13. Ухов С.В., Коньшин М.Е., Новикова В.В. и др. Синтез и противомикробная активность серебряных солей замещенных амидов 2-иминокумарин-3-карбоновой кислоты. Химико-фармацевтический журнал. 2004; 4: 15-16. [Uhov S.V., Konshin M.E., Novikova V.V. i dr. Sintez i protivomikrobnaya aktivnost serebryanykh soley zameschennykh amidov 2-iminokumarin-3-karbonovoy kisloty. Himiko-farmatsevticheskii zhurnal. 2004; 4: 15-16. (In Russ).]
 14. Русских А.А., Бобровская О.В., Гейн В.Л., Новикова В.В. Синтез и противомикробная активность N-[4-(тиазол-2-илсульфамойл)фенил]-5-арил-1-фенилпиразол-3-карбоксамидов. Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки. Мат. научно-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 80-летию ПГФА (23 ноября 2016 г.). Пермь: ПГФА, 2016; 18: 134-136. [Russkikh A.A., Bobrovskaya O.V., Geyn V.L., Novikova V.V. Sintez i protivomikrobnaya aktivnost N-[4-(tiazol-2-ilsulfamoil)fenil]-5-aryl-1-fenilpirazol-3-karboksamidov. Sozdanie konkurentosposobnykh lekarstvennykh sredstv – prioritetnoe napravlenie innovatsionnogo razvitiya farmatsevticheskoy nauki. Mat. nauchno-prakt. konf. s mezhdunar. uchastiem, posvyasch. 80-letiyu PGFA (23 noyabrya 2016 g.). Perm: PGFA, 2016; 18: 134-136. (In Russ)].
 15. *Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации.* 2015 URL: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinicalrecommendations>. [Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam: klinicheskie rekomendatsii. 2015 (In Russ)].
 16. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.* М.: Гриф и К, 2012: 944 с. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast pervaya. M.: Grif i K, 2012: 944 s. (In Russ).]
 17. De Vita D., Scipione L., Tortorella S., et al. Synthesis and antifungal activity of a new series of 2-(1H-imidazol-1-yl)-1-phenylethanol derivatives. Europ. J. of Med. Chemistry. 2012; 49: 334-342.

Поступила в редакцию журнала 26.05.2017

Рецензент: Е.Р. Рауш



ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ В ЖУРНАЛ «ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»

Журнал «Проблемы медицинской микологии» нацелен на публикацию оригинальных, ранее не опубликованных в других изданиях в России или за рубежом, статей, научных обзоров, дискуссий, рецензий на книги, методических разработок, хроники и информации. Предварительные сообщения не принимаются. Статьи необходимо сопровождать направлением от учреждения (-й), в котором (-ых) выполнена работа.

Статьи представляются на русском языке с обязательным расширенным резюме на английском языке объемом не более 20 строк. Можно представлять статьи на английском языке с рефератом на русском языке в объеме до 20 строк.

Статьи представляются в редакцию по почте с приложением диска (с распечаткой текста на бумаге в 2-х экземплярах) или по электронной почте (mycobiota@szgmu.ru), подготовленными в текстовом редакторе Win Word. Статьи должны быть напечатаны шрифтом № 12 через 1,5 интервала. Все страницы должны быть пронумерованы.

Размер рукописей не должен превышать 12 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы, фотографии и подписи к ним, список цитированной литературы, представляемые на отдельных листах. Количество иллюстраций не должно превышать двух страниц при их плотном размещении друг к другу.

Рукопись статьи подписывается автором (соавторами), на отдельной странице написать ф.и.о. (полностью) одного из авторов, его должность, адрес электронной почты (для связи) и номер телефона.

Авторское право.

Согласно статье 1228 (глава 69) Гражданского Кодекса РФ часть 4, раздел VII (Права на результаты интеллектуальной деятельности и средства индивидуализации), автором результата интеллектуальной деятельности признается гражданин, творческим трудом которого создан такой результат.

Не признаются авторами результата интеллектуальной деятельности граждане, не внесшие личного творческого вклада в создание такого результата, в том числе оказавшие его автору только техническое, консультационное, организационное или материальное содействие или помощь либо только способствовавшие оформлению прав на такой результат или его использованию, а также граждане, осуществлявшие контроль за выполнением соответствующих работ.

Правила оформления статей:

Сначала пишется название статьи заглавными буквами (шрифт 12 – жирный). Затем через 2 интервала указываются фамилии авторов, инициалы и должности (шрифт 12 – жирный). Далее через 2 интервала пишется название учреждения, в котором выполнена работа. Затем через 2 интервала печатать резюме на русском языке (без написания слова «резюме»). Через 2 интервала указать до 7 ключевых слов. Затем через 2 интервала (шрифт – 12) пишется заголовок на английском языке, фамилии, инициалы и должности автора (-ов), резюме (без написания слов «abstract, summary») и ключевые слова (не более 7).

Затем через 3 интервала и с красной строки печатать текст статьи в следующем порядке: краткое введение, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, цитированная литература.

Латинские названия грибов необходимо писать курсивом; если в заголовке названы род и вид гриба, то после него следует указывать автора, впервые писавшего вид (например, *Aspergillus fumigatus* Fres.); в тексте такая форма уже не повторяется и при

повторном упоминании гриба название рода сокращают до первой буквы (например, при первом написании в тексте *Aspergillus fumigatus*, при повторениях – *A. fumigatus*).

Автор (-ы) вида должен (-ны) быть указан (-ы) не только в заголовке к статье, но и при первом упоминании в тексте (если нет этого в заголовке) и в возможном списке видов. В подписях к рисункам и в надписях к таблицам полные названия рода и вида приводятся один раз.

Названия учреждений при первом упоминании в тексте даются полностью, и сразу же в скобках приводят их принятые сокращения, которыми пользуются в последующем тексте статьи, например, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (ГБОУ ВПО СЗГМУ), Московская государственная медицинская академия им. И.М. Сеченова (ММА им. Сеченова) и т.д.

Четко писать и различать О, о, и 0 (ноль), 1 и l (единицу и заглавную латинскую I), I и J, q и g, заглавные буквы О по-русски и Q по-английски. Подстрочные примечания должны иметь сквозную нумерацию по всей статье. Содержание таблиц не должно дублировать текст. Таблицы должны иметь порядковые номера, если их больше одной.

Все термины, употребляемые в статье, должны строго соответствовать действующим номенклатурам (анатомической, гистологической и т.д.), названия лекарственных средств – Государственной Фармакопее, единицы физических величин – международной системе единиц (СИ).

Литература, упоминаемая в тексте (не должна быть старше 10 лет), приводится списком в конце статьи **в том порядке, в котором она цитирована в тексте работы**; соответствующие номера статей проставляются в тексте в квадратных скобках.

Рисунки (фото) должны иметь порядковые номера, на которые следует ссылаться в тексте статьи. Рисунки (фото) прилагаются в электронном виде. На микрофотографиях изображается масштаб, в подписях к ним необходимо указывать собственные увеличения объектива и окуляра, и, возможно, коэффициент усиления увеличения за счет дополнительных оптических приспособлений (например, для некоторых бинокулярных микроскопов x 1,5).

Оформление списка литературы.

Для книг указываются фамилии и инициалы авторов, название книги, место издания (город), издательство, год, общее количество страниц, например: *Васильева Н.В., Елинов Н.П.* Микроорганизмы – контаминанты и патогены – индукторы процессов старения больничных зданий и помещений медицинского назначения, а также возбудители некоторых заболеваний людей (учебное пособие) / Под ред. Н. П. Елинова. – СПб.: КОСТА, 2009. 224 с.

Для статей, опубликованных в журналах, указываются фамилии и инициалы авторов, название статьи, название журнала, год, том, номер, первая и последняя страницы статьи, например: *Brinkman C., Vergidis P., Uhl J.* PCR-electrospray ionization mass spectrometry for direct detection of pathogens and antimicrobial resistance from heart valves in patients with infective endocarditis. *J. of Clin. Microbiol.* 2013; 51 (7): 2040-2046.

3. Для статей, опубликованных в сборниках, указываются фамилии и инициалы авторов, название статьи, название сборника, место издания (город), издательство, год, первая и последняя страницы статьи, например: *Елинов Н.П.* Низшие микромицеты и вызываемые ими микозы – беспокойная проблема будущего. Материалы 3-го Всеросс. конгресса по мед. микологии. М., 2005; VI: 44-46.

4. Для авторефератов диссертаций, например: *Хабибуллина Ф.М.* Почвенная микобиота естественных и антропогенно нарушенных экосистем северо-востока европейской части России: Автореф. дисс... док. биол. наук. Сыктывкар, 2009: 40 с.

Для **русскоязычных литературных источников необходимо транслитерация**, т.е. дублирование в романском алфавите (латиница), например: *Авдеев С.Н., Белобородов В.Б., Белоцер-*

ковский Б.З. и др. Нозокомиальная пневмония у взрослых. Российские национальные рекомендации. М., 2016: 128 с. [Avdeev S.N., Beloborodov V.B., Belotserkovskiy B.Z. i dr. Nozokomialnaya pnevmoniya u vzroslyih. Rossiyskie natsionalnyie rekomendatsii. M., 2016: 128 с.]

Редакция оставляет за собой право сокращать статьи и вносить редакционные исправления.

В случае возвращения автору рукописи статьи на переработку дата ее поступления сохраняется в течение 4 месяцев. При отклонении работы статья не подлежит возвращению автору.

В конце статьи, принятой к публикации, приводится фамилия рецензента.

Частота выпуска журнала: 1 номер в квартал, 1 том в год.

Все статьи публикуются БЕСПЛАТНО.

Подписной индекс в общероссийском каталоге «Роспечать» - 83006

По вопросам размещения рекламы обращаться по адресу редакции (см. ниже).

Вся корреспонденция направляется по адресу: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28, НИИ ММ им. П.Н.Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Тел: (812) 303-51-45; тел./факс: (812) 510-62-77

E-mail: mycobiota@szgmu.ru; elena.gukova@szgmu.ru

Заведующая редакцией: Гукова Елена Станиславовна

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ СТАТЕЙ!

Направляя статью для размещения в журнале ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (далее – Университет) «Проблемы медицинской микологии» автор статьи предоставляет Академии право использовать статью в любой форме и любым способом, предусмотренными п. 2 ст. 1270 Гражданского Кодекса Российской Федерации, в том числе: воспроизведение статьи; распространение статьи путем продажи или иного отчуждения его оригинала или экземпляров; сообщение в эфир; сообщение по кабелю; перевод или другая переработка статьи; доведение статьи до всеобщего сведения; передача права использования статьи третьим лицам (сублицензионный договор); извлечение и обработка метаданных статьи.

Автор статьи гарантирует, что он является обладателем передаваемых Университету прав (правообладателем). Территория, на которой допускается использование прав на статью, не ограничена.

Передача прав на статью осуществляется без выплаты автору статьи вознаграждения. Университет вправе использовать ста-

тью в течение срока действия исключительного права правообладателя на статью. Автор предоставляет Университету право обработки своих персональных данных.

В связи с вышеизложенным, редакционная коллегия журнала «Проблемы медицинской микологии» просит авторов, **вместе с сопроводительным письмом от организации, присылать документ с текстом следующего содержания:**

«Направляя статью для размещения в журнале ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (далее – Университет) «Проблемы медицинской микологии» я (мы) _____ (указать ФИО) предоставляю (ем) Университету право использовать мою (нашу) статью _____ (название статьи) в любой форме и любым способом, указанным в «Правилах предоставления рукописей авторами» журнала «Проблемы медицинской микологии».

Сопроводительное письмо к статье должно быть написано и подписано собственноручно автором (авторами) статьи.



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

**North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
Kashkin Research Institute of Medical Mycology**
Address of Editorial Office: Santiago-de-Cuba str., 1/28, Saint Petersburg, 194291, RUSSIA. Tel.: (812) 303-51-45, Fax (812) 510-62-77
E-mail: mycobiota@szgmu.ru. Manager of Editorial Office: E.S.Gukova

«ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»

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

Журнал включен в реферативный журнал и базы ВИНТИ.

Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной системе по периодическим и продолжающимся изданиям «Ulrich's Periodicals Directory».

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

Подписано в печать 10.10.2017. Формат 60×90 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 20.5. Тираж 999 экз.