

# ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 19 №4



Problems in medical mycology

Vol.19 №4

2017

# ЛОЦЕРИЛ®

## ЛОЦЕРИЛ® СТИЛЬНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ГРИБКА НОГТЕЙ



Reg. удостоверение ПИ №012558/01

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

# ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНГРЕСС ПО МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ, КЛИНИЧЕСКОЙ МИКОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

## XXI КАШКИНСКИЕ ЧТЕНИЯ

6- 8 июня 2018 г., Санкт-Петербург

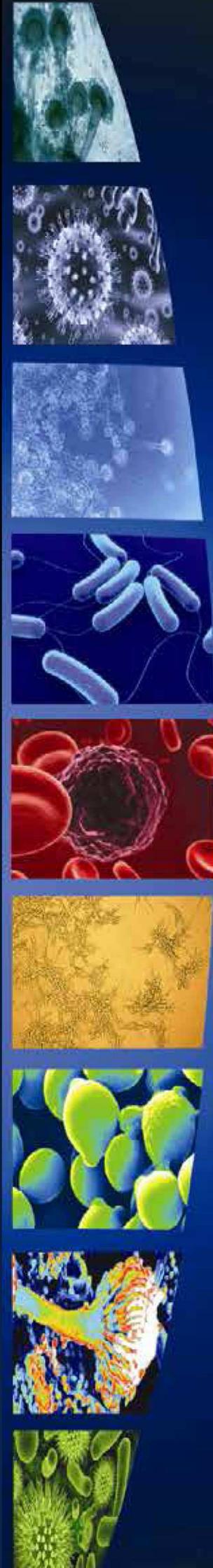
### Место проведения:

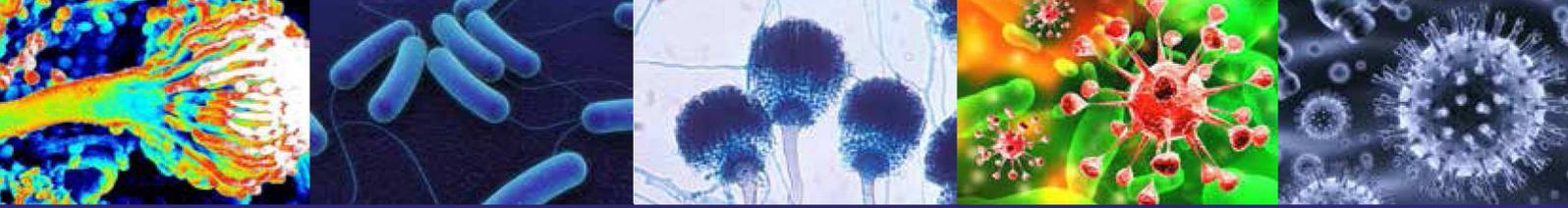
Отель «Санкт-Петербург»  
(Санкт-Петербург, Пироговская наб., 5/2)

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](mailto:mycocongress@szgmu.ru),  
тел./факс: +7 (812) 303-51-40





## РАСПИСАНИЕ ЦИКЛОВ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ МИКОЛОГИИ, БАКТЕРИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ

## РАСПИСАНИЕ ЦИКЛОВ ПО КЛИНИЧЕСКОЙ МИКОЛОГИИ, АЛЛЕРГОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

### КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ СЗГМУ ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА на 2018 год

Наименования кафедр и циклов	Кол-во часов	Сроки проведения
Бактериология (для биологов)	144	10.01 – 30.01 12.03 – 31.03 12.09 – 2.10
Бактериология. Подготовка и прием экзамена на сертификат специалиста (для бактериологов ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии и ЛПУ)	216	10.01 – 9.02 12.03 – 11.04 12.09 – 12.10 16.10 – 16.11 21.11 – 21.12
Острые кишечные инфекции. Современные подходы к микробиологической диагностике (модуль) (для бактериологов ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии и ЛПУ)	36	31.01 – 6.02 12.04 – 18.04 13.12 – 19.12
Бактериология. Подготовка и прием экзамена на сертификат специалиста (для лаборантов-бактериологов со средним медобразованием)	144	14.02 – 7.03 10.05 – 30.05
Лабораторная диагностика. Подготовка и прием экзамена на сертификат специалиста (для лаборантов-бактериологов со средним медицинским образованием)	144	14.02 – 7.03 10.05 – 30.05
Лабораторное дело. Подготовка и прием экзамена на сертификат специалиста (для лаборантов-бактериологов со средним медобразованием ФГУЗ Центров гигиены и эпидемиологии и ЛПУ)	144	14.02 – 7.03 10.05 – 30.05
Лабораторная диагностика микозов кожи (для врачей клинической лабораторной диагностики, бактериологов, микологов, дерматовенерологов)	144	14.05 – 2.06
Микология (модуль) (для врачей-бактериологов)	36	26.02 – 3.03 4.06 – 9.06
Лабораторная микология (для врачей клинической лабораторной диагностики, врачей-бактериологов, паразитологов, микологов, эпидемиологов, инфекционистов, дерматовенерологов, биологов)	144	12.03 – 31.03 2.04 – 21.04 3.09 – 22.09 24.09 – 13.10 15.10 – 3.11 12.11 – 1.12 3.12 – 22.12
Резистентность микроорганизмов (модуль) (для врачей-бактериологов)	36	12.04 – 18.04 13.12 – 19.12
Бактериология. Профессиональная переподготовка. Прием экзамена на диплом и сертификат специалиста (для вирусологов, инфекционистов, врачей клинической лабораторной диагностики, эпидемиологов, лабораторных микологов)	504	3.09 – 15.11
Вирусология. Подготовка и прием экзамена на сертификат специалиста. Подготовка и прием экзамена на сертификат специалиста (для врачей-вирусологов, научных сотрудников, работающих в области вирусологии)	144	10.10 – 30.10

**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.szgm.ru>

тел.: (812) 510-62-69, (812) 303-51-40, факс: (812) 510-62-77

e-mail: tatiyana.bogomolova@szgm.ru

**Бактериология:** тел.: (812) 275-19-04, (812) 275-19-46,

(812) 303-50-00, e-mail: natalya.kalyanova@szgm.ru

**Вирусология:** тел.: (812) 499-15-71,

e-mail: irina.zhilinskaya@influenza.spb.gov.ru

### КАФЕДРА КЛИНИЧЕСКОЙ МИКОЛОГИИ, АЛЛЕРГОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ СЗГМУ ИМ. И.И.МЕЧНИКОВА на 2018 год

Наименования кафедр и циклов	Кол-во часов	Сроки проведения
Аллергология и иммунология. Подготовка и прием экзамена на сертификат специалиста (для аллергологов-иммунологов)	216	15.01 – 14.02 с 10.09 – 10.10
Неотложные состояния в аллергологии. Подготовка и прием экзамена на сертификат специалиста по лечебному делу (для фельдшеров)	144	6.02 – 27.02
Клиническая аллергология и иммунология (для врачей лечебного профиля и педиатров)	144	13.02 – 6.03
Оптимизация лечения внутрибольничных микозов (модуль) (для акушеров-гинекологов, терапевтов, пульмонологов, клинических фармакологов, педиатров, гематологов, инфекционистов)	36	5.03 – 10.03 24.09 – 29.09 22.10 – 27.10 17.12 – 22.12
Аллергология и иммунология. Профессиональная переподготовка. Прием экзамена на диплом и сертификат специалиста (для терапевтов, педиатров, врачей общей врачебной практики)	504	22.03 – 6.06 10.09 – 22.11
Актуальные проблемы аллергологии и иммунологии (модуль) (для аллергологов-иммунологов, терапевтов, педиатров)	36	23.04 – 28.04 10.12 – 15.12
Клиническая микология (для врачей лечебного профиля и педиатров)	144	15.10 – 3.11
Сестринское дело в аллергологии. Подготовка и прием экзамена на сертификат специалиста (для медицинских сестер аллергологических кабинетов)	144	19.11 – 8.12

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, мукоромикоз, 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@szgm.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, № 4, 2017*

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

## ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

*Том 19, № 4, 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

*Расулова С.С., Рябинин И.А.* Низкомолекулярные биологически активные метаболиты *Aspergillus wentii* (краткий обзор) . . . . . 3

### КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

*Рогачева Ю.А., Попова М.О., Волкова А.Г., Екушев К.А., Пирогова О.В., Пинегина О.Н., Игнатьева С.М., Богомолова Т.С., Паина О.В., Быкова Т.А., Дарская Е.И., Владовская М.Д., Смирнов Б.И., Моисеев И.С., Бондаренко С.Н., Зубаровская Л.С., Климко Н.Н., Афанасьев Б.В.* Инвазивные микозы, обусловленные редкими возбудителями, у онкогематологических больных на фоне трансплантации костного мозга и противоопухолевой химиотерапии . . . . . 10

*Мавлянова Ш.З., Есионова Е.В., Алимухамедова Ю.А., Асадов Р.К.* Клинические особенности атопического дерматита с учетом обсемененности кала *Candida* spp. и общего IgE . . . . . 15

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

*Степанова А.А., Ямагучи М., Чибана Х., Васильева Н.В., Шульгина М.В.* Сравнительный ультраструктурный анализ *in vitro* растущих клеток гиф *Scedosporium aurantiacum* . . . . . 18

*Прохватилова Е.В., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Савина Е.В., Пушкар В.Г., Белицкая Л.И., Плеханова Н.Г., Викторов Д.В., Топорков А.В.* Набор реагентов для диагностики *in vitro* кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза: разработка, испытание, государственная регистрация, использование в лабораторной практике . . . . . 26

*Авдеенко Ю.Л., Степанова А.А., Митрофанов В.С., Шульгина М.В.* Гистологическое исследование микотического синусита . . . . . 32

### ХРОНИКА И ИНФОРМАЦИЯ

Памяти главного редактора журнала «Проблемы медицинской микологии» профессора Елинова Николая Петровича . . . . . 41

---

## CONTENTS

### PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

*Rasulova S.S., Ryabinin I.A.* The low-molecular-weight biologically active metabolites of *Aspergillus wentii* (minireview) . . . . . 3

### CLINICAL MYCOLOGY

*Rogacheva Y.A., Popova M.O., Volkova A.G., Ekushev K.A., Pirogova O.V., Pinagina O.N., Ignatieva S.M., Bogomolova T.S., Paina O.V., Bykova T.A., Darskaya E.I., Vladovskaya M.D., Smirnov B.I., Moiseev I.S., Bondarenko S.N., Zubarovskaya L.S., Klimko N.N., Afanasiev B.V.* Invasive mycoses caused by rare pathogens in patients with hematological diseases after hematopoietic stem cell transplantation and chemotherapy . . . . . 10

*Mavlyanova S.Z., Esiionova E.V., Alimukhamedova Yu.A., Asadov R.K.* Clinical features of atopic dermatitis accounting the contamination of the feces of *Candida* spp. and total IgE . . . . . 15

### EXPERIMENTAL MYCOLOGY

*Stepanova A.A., Yamaguchi M.M., Chibana H., Vasilyeva N.V., Shulgina M.V.* Comparative ultrastructural analysis of the *in vitro* growing hyphal cells of *Scedosporium aurantiacum* . . . . . 18

*Prokhvatilova E.V., Novitskaya I.V., Kulakov M.Ya., Savina E.V., Pushkar V.G., Belitskaya L.I., Plekhanova N.G., Viktorov D.V., Toporkov A.V.* Reagent kit for *in vitro* diagnostic of coccidioidomycosis and histoplasmosis: development, testing, state registration, the use of laboratory practice . . . . . 26

*Avdeenko Y.L., Stepanova A.A., Mitrofanov V.S., Shulgina M.V.* Histological investigation of the mycotic sinusitis . . . . . 32

### CHRONICLE AND INFORMATION

To the memory of chief editor of the journal «Problems in medical mycology» professor Yelinov Nikolay Petrovich . . . . . 41

## НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ *ASPERGILLUS WENTII* (КРАТКИЙ ОБЗОР)

Расулова С.С. (студент), Рябинин И.А. (м.н.с., ассистент кафедры)\*

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

© Расулова С.С., Рябинин И.А., 2017

В обзорном сообщении кратко охарактеризованы некоторые вторичные метаболиты *Aspergillus wentii*. Приведены структурные формулы 17 веществ, для 15 из них разными авторами изучены антибактериальное, противогрибковое и противоопухолевое действие (в разной степени подробности). Наиболее полно изложены сведения о антинеопластической активности вентилактона В, активность которого в оригинальной работе выявили на клетках линии гепатомы человека SMMC-7721. Установлено, что это вещество в опухолевых клетках вызывает остановку клеточного цикла в фазе G2 и индуцирует апоптоз. Данный эффект реализуется, главным образом, посредством взаимодействия со звеньями сигнальной системы Ras/Raf/MAPK, увеличения концентрации активных форм кислорода, изменения в системе контроля апоптоза, связанной с митохондриями. Механизм действия вентилактона В сопоставлен с механизмами действия других противоопухолевых метаболитов из *Aspergillus spp.* и *Penicillium spp.*

**Ключевые слова:** апоптоз, вентилактон В, низкомолекулярные метаболиты, противоопухолевые соединения, *Aspergillus wentii*

## THE LOW-MOLECULAR- WEIGHT BIOLOGICALLY ACTIVE METABOLITES OF *ASPERGILLUS WENTII* (MINIREVIEW)

Rasulova S.S. (student), Ryabinin I.A. (junior scientific researcher, assistant of the chair)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kaschkin Research Institute of Medical Mycology, Clinical faculty, Chair of Medical Microbiology, St. Petersburg, Russia

© Rasulova S.S., Ryabinin I.A., 2017

In the review some secondary metabolites of *Aspergillus wentii* are briefly described. Structural formulas of 17 substances are given, for 15 of these substances antibacterial, antifungal and antitumor effects have been studied (to varying degrees) by different authors. The most complete information is presented on the antineoplastic activity of wentilactone B, whose action in the original work was revealed on the cells line of the human hepatoma SMMC-7721. As it turned out, this substance cause the cell cycle arrest in G2-phase and induce apoptosis in tumor cells. This effect is realized mainly through interaction with the Ras/Raf/MAPK signaling system, also by increasing the concentration of reactive oxygen species, and by change in the apoptosis control system associated with mitochondria. The mechanism of action of wentilactone B was compared with the mechanisms of action of other antitumor metabolites from *Aspergillus spp.* and *Penicillium spp.*

**Key words:** antitumor substances, apoptosis, *Aspergillus wentii*, low-molecular-weight metabolites, wentilactone B

## ВВЕДЕНИЕ

Низкомолекулярные вторичные метаболиты (экстролиты) микроскопических грибов привлекают интерес микологов, а также исследователей из других областей биомедицинских наук по различным причинам. Первые этапы истории изучения малых метаболитов связаны с эпохой активного поиска антибиотиков, начавшейся после открытия пенициллина. Однако подавляющее большинство обнаруженных антибактериальных метаболитов оказались слишком токсичными также и для эукариот, поэтому так и не нашли применения в фармакотерапии инфекций. Тем не менее, был накоплен большой опыт по выявлению новых биогенных соединений и изучению их свойств. Эти наблюдения, в свою очередь, оказались полезными для другой отрасли микологии и биохимии, связанной с микотоксигенными грибами. На современном этапе средства аналитической химии, включая высокоэффективную жидкостную хроматографию в сочетании с электро-спрей-ионизационной масс-спектрометрией, позволяют выявлять целый комплекс низкомолекулярных метаболитов и использовать полученные сведения для экспертной видовой идентификации в качестве дополнительного таксономического признака [1].

Сравнительно новое направление исследования экстролитов микроскопических грибов связано с поиском средств терапии новообразований. В данной сфере удалось достичь определенных успехов, в частности, благодаря обнаружению метаболитов трихокомовых аскомицетов из родов *Penicillium* (вместе с *Eurpenicillium*, *Talaromyces*) и *Aspergillus*, обладающих такими свойствами [2].

В данной работе представлены сведения о некоторых низкомолекулярных соединениях редкого в медицинской практике трихокомового аскомицета – *Aspergillus wentii* Wehmer в аспекте их антимикробного и антинеопластического действия.

### *A. wentii* и его метаболиты.

*A. wentii* – представитель аспергиллов секции *Cremeri*, который впервые обнаружили как эндосимбионт бурых водорослей рода *Sargassum* и в настоящее время используют в пищевой промышленности для производства пектиназы и некоторых других ферментов [3]. Также этот гриб выделяли из различных пищевых продуктов, в том числе из соленой рыбы, китайских каштанов и попкорна. Ранее *A. wentii* не ассоциировали с микозами человека [4]. Однако известен редкий случай возникновения некротического наружного отита, вызванного этим аспергиллом [5]. К штаммам данного вида проявляют интерес по причине продукции биологически активных метаболитов: асперолидов А-С, вентилактонов А и В, ботриосферина В, вещества LL-Z1271-β, аспервентинов А-С, икатинов А-С, антрахиноновых соединений и их производных. Структурные формулы этих веществ приведены на рисунке 1. Далее в тексте для удобства вещества обозначены порядковыми номерами, указанными на рисунке.

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

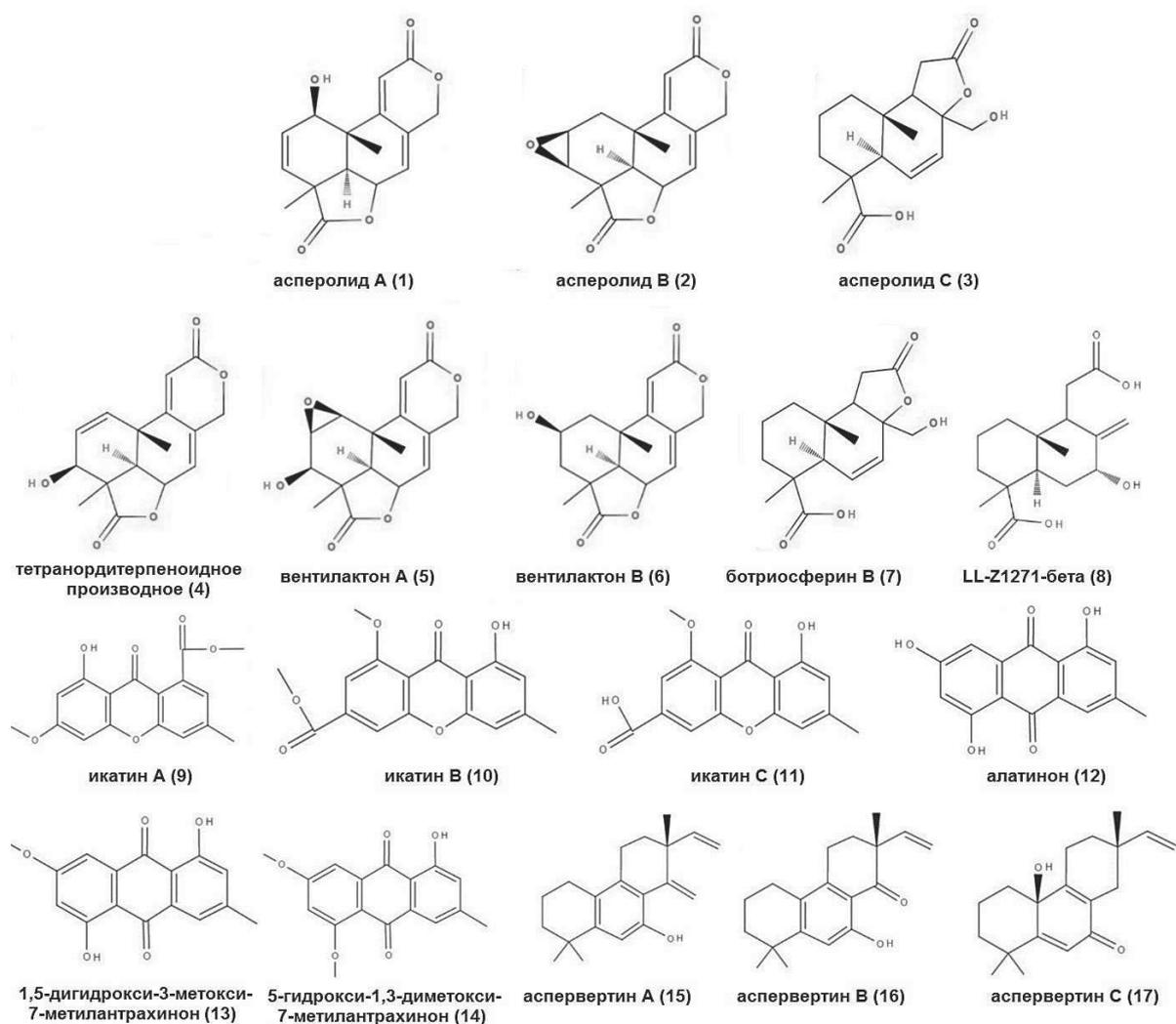


Рис.1. Низкомолекулярные метаболиты («экстролиты») *A. wentii*. Структурные формулы воссозданы по оригинальным публикациям в редакторе (MolView: <http://molview.org/>).

**Исследования антимикробного, противоопухолевого и токсического действия «малых» метаболитов *A. wentii*.**

Соединения, отмеченные на рисунке 1 под №№ 1-8 (тетранорабдановые дитерпеноиды, асперолиды А-С (1-3), вместе с пятью родственными производными (4-8)), изучены группой китайских исследователей в отношении цитотоксической активности против некоторых опухолевых клеточных линий человека:

1. HeLa – классическая линия эпителиоидной карциномы шейки матки;
2. HepG2 и SMMC-7721 – линии гепатокарциномы;
3. MDA-MB-231 и MCF-7 – линии злокачественных новообразований молочной железы;
4. NCI-H460 – линия карциномы легкого;
5. SW1990 – линия опухоли поджелудочной железы.

Ни одно из этих веществ в опыте не проявило значительную цитостатическую активность (константы полуингибирования  $IC_{50} \leq 10$  мкМ), однако соединения 1, 2 и 4-6 оказали слабое действие в отношении различных клеточных линий, которое выражалось значениями  $IC_{50}$ , уступающими 5-фторурацилу, но превосходящими адриамицин, причем вещество 6 (вентилактон В) сочли наиболее активным среди протестированных

соединений ( $IC_{50} = 17$  мкМ). Соединения №№ 1, 4-6 и 8 дополнительно изучены на антибактериальную активность против MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* и *Bacillus subtilis*, а также противогрибковую активность в отношении *Candida albicans* с использованием диско-диффузионного метода. Обнаружили, что соединение 4 (тетранордитерпеноидное производное) до некоторой степени подавляет рост *C. albicans*, что отражает минимальная ингибирующая концентрация, равная 16 мкг/мл, в то время как другие четыре метаболита проявляли более слабое антифунгальное действие.

Также при исследовании культуральной жидкости *A. wentii* обнаружили три новых производных ксантона – икатин А (9), икатин В (10) и икатин С (11), а также три известных производных антрахинона – алатинон (12), 1,5-дигидрокси-3-метокси-7-метилантрахинон (13) и 5-гидрокси-1,3-диметокси-7-метилантрахинон (14) [3]. Икатины изучили на антибактериальную активность в отношении *E. coli* и *Staphylococcus aureus* и на противогрибковую активность в отношении мицелиальных грибов *Colletotrichum lagenarium* (фотопатоген) и *Fusarium oxysporum* с применением диско-диффузионного метода при нагрузке 10 мг на диск, а также

на токсичность в отношении модельного организма *Artemia salina* [6]. Выявили, что икатины В и С активны против кишечной палочки (диаметр зоны задержки роста – 9 мм и 12 мм соответственно). Икатын С обладает способностью ингибировать рост *E. coli* (12 мм), *S. aureus* (7,5 мм) и *C. lagenarium* (11 мм). Икатины проявили слабую токсичность для *Artemia salina* – константы полунгибирования (IC50) для веществ А, В и С составили 0,20; 0,22 и 0,30 ммоль/мл соответственно.

Для оценки биологических эффектов аспервертинов А – С (15-17) их тестировали на токсичность для *A. salina* и трех видов морских фитопланктонных водорослей (*Chattonella marina*, *Heterosigma akashiwo* и *Alexandrium sp.*) [6; Schrader K.K. et al., 1997]. В результате установлено, что для *A. salina* наиболее токсичен аспервертин В (IC50=6,36 мкМ). Кроме того, аспервертин А, в сравнении с прочими соединениями, более активен по отношению к *C. marina* и *H. akashiwo*, с величинами LC50 равными 0,81 и 2,88 мкМ соответственно; аспервертин С был более активным против *Alexandrium sp.* (LC50=8,73 мкМ). Авторы эксперимента заключили, что данные эффекты отражают биологическую значимость наличия для аспервертинов (представителей класса изоимарановых дитерпенов) ароматического кольца в положении В.

#### **Противоопухолевое действие вентилактона В и его молекулярный механизм.**

Среди «малых» метаболитов *A. wentii* наиболее подробно изучены биологические эффекты вентилактона В (Рис. 1 (5)). Показано, что он оказывает цитотоксический эффект в отношении различных клеточных линий из злокачественных новообразований [3]. В частности, это соединение индуцирует апоптоз, а также ингибирует пролиферацию и миграцию клеток линии гепатомы человека SMMC-7721 [7]. Согласно результатам теста оценки клеточного дыхания с солью тетразолия (МТТ), вентилактон В заметно ингибирует пролиферацию клеток линии SMMC-7721, но не снижает жизнеспособность нормальных клеток, что свидетельствует о том, что данное соединение проявляет селективность между нормально дифференцированными и раковыми клетками. В настоящем разделе далее нами приведены сведения о механизмах антионкогенного действия вентилактона В. Для понимания данного материала необходимо краткое представление о молекулярных «звеньях» этого механизма:

**Bcl-2, Вах и Bcl-XL** – группы регуляторных белков, связанные с апоптотическими и антиапоптотическими реакциями.

**CD44** (Р-гликопротеин-1) – тансмембранный белок, находящийся на поверхности многих типов клеток и выполняющий различные функции. По-видимому, в нормально дифференцированных клетках главной функцией CD44 является связывание с гиалуронатом (гликозаминогликаном внеклеточного матрикса), в то же время в атипичных клетках некоторых новообразований гиперэкспрессия изоформ CD44 – один из молекулярных механизмов формирования метастазов [8].

**EGFR** – трансмембранная протеинкиназа, рецептор для эпителиального фактора роста, является мишенью некоторых новых противоопухолевых средств. Известны мутации в гене, кодирующем EGFR, которые ассоциированы с канцерогенезом [9].

**Система MAPK/ERK** – система внутриклеточной

передачи различных внешних (прежде всего – химических) сигналов, участвующая в регуляции клеточного деления, дифференцировки, миграции, старения и апоптоза. Сигнальная система MAPK/ERK включает 4 обособленных сигнальных пути, соответствующих важнейшим протеинкиназам: ERK1/2 и ERK5 (внеклеточный сигнал-опосредующие киназы), JNK (N-концевая киназа Jun), p38-MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа, связанная с критическими воздействиями) [10].

**SP600125** – ингибитор киназы JNK, способствующий образованию полимеризованного тубулина, что приводит к остановке клеточного цикла на этапе смены фаз G2/M, эндодермализации (в эмбриональных тканях) и торможению апоптоза.

**Ras** – семейство ГТФаз, опосредующих передачу различных сигналов с мембраны клетки на различные сигнальные пути (вплоть до изменения экспрессии генов). Являются активаторами звеньев системы передачи сигналов MAPK/ERK. Соматические мутации в генах, кодирующих Ras, – один из наиболее типичных механизмов онкогенеза [11].

**c-Raf** – сериновая/треониновая протеинкиназа, входящая в состав сигнальной системы MAPK (путь ERK 1/2) [Sridhar S.S. et al., 2005].

**p53** – важный фактор транскрипции, связанный с ответом клетки на различные стрессовые воздействия, регулирующий репарацию ДНК, некоторые переключения метаболизма, вход в апоптоз, остановку клеточного цикла. Мутантные варианты p53 свойственны многим типам злокачественных новообразований [12].

**p21** (p21WAF1/Cip1) – ингибитор циклин-зависимой киназы 2, являющийся одним из регуляторов транскрипции генов, процессов дифференцировки клеток, смены стадий клеточного цикла и индукции апоптоза, а также инициаторов репарации ДНК. В определенной степени функции p21 и p53 сходны, но их действие независимо. Ядерная и цитоплазматическая формы p21 иногда проявляют полярно различающиеся по направленности эффекты. В опухолевых клетках значение уровня экспрессии p21 различается у новообразований разных типов: во многих опухолях высокая экспрессия p21 указывает (при наличии соответствующего лечения) на благоприятный прогноз, в других – ассоциирована с инвазией в глубокие ткани и метастазированием [13].

**PARP** – поли-АДФ-рибоза-полимеразы – группа ферментов, активирующих путем АДФ-рибозилирования различные регуляторные белки. Играют роль во многих внутриклеточных сигнальных путях, в том числе инициируют репарацию ДНК, опосредуют (прямо или косвенно) действие регуляторных белков p21 и p53. Разрабатывают приемы ингибирования ферментов типа PARP, чтобы останавливать процесс репарации ДНК в опухолевых клетках, подвергнутых действию химиотерапевтических препаратов [14].

**Циклин В1** – регуляторный белок, инициирующий (в комплексе с циклин-зависимой киназой 1 – ее кодирует ген *cdc2*) начальные этапы митоза [Porter L.A., Donoghue D.J., 2003].

**Каспазы** – ферменты-триггеры различных форм программируемой клеточной гибели;

**z-VAD-fmk** – синтетический ингибитор каспаз (N-бензилоксикарбонил-валил-аланил-аспартил(О-

метил)-фторметилкетон).

При исследованиях, проведенных в отношении влияния вентилактона В на индуцированный апоптоз, выявили, что ключевыми «звеньями» регуляции этого процесса являются антиапоптотический фактор Bcl-2 и проапоптотический фактор Вах. Обработка клеток SMMC-7721 дозами вентилактона В, составившими 20 и 40 мкМ, в течение 24 ч приводила к повышению экспрессии проапоптотического фактора Вах и снижению экспрессии антиапоптотического фактора Bcl-2. Более того, вентилактон В существенно сократил число и размеры колоний опухолевых клеток. Однако, как оказалось, в индуцированном вентилактоном В апоптозе клеток линии SMMC-7721 участвуют также и другие митохондриальные апоптотические пути, не связанные с Вах/Bcl-2-зависимым механизмом. При действии вентилактона В торможение миграции клеток SMMC-7721 происходит за счет подавления экспрессии маркера CD44 и белка EGFR [4].

В последующей работе Zhang Z. и соавторы продемонстрировали, что вентилактон В вызывает апоптоз и подавляет развитие метастазов клеточных линиях НСС (гепатоцеллюлярная карцинома) *in vivo* и *in vitro*. Более того, соединение инициировало остановку клеточного цикла в фазе G2 и индуцировало апоптоз с помощью сигнального пути MAPK. Воздействие вентилактона В на клетки SMMC-7721 также приводит к блокированию фазы клеточного цикла G2, снижению уровня фосфорилированной формы p53, p21 и белков, связанных с переходом фаз G2/М. Сниженная активность гена *cdc25C* (индуктор митоза) и последующее увеличение фосфорилирования продукта гена *cdc2* являются отличительной чертой остановки клеточного цикла на фазе G2/М [Perdiguero E., Nebreda A.R., 2004]. Предполагают, что *cdc25C* регулирует вход в митоз, влияя на активацию комплекса *cdc2*/циклин В1. Продукт гена *cdc25C* обладает низкой активностью в нефосфорилированной форме, но после гиперфосфорилирования он катализирует активацию комплекса *cdc2*/циклин В1 [Gabrielli B.G. et al., 1997]. С другой стороны, комплекс *cdc2*/циклин В1 сам может фосфорилировать продукт ген *cdc25C* [Taylor W.R., Stark G.R., 2001; 15]. Действительно, при анализе клеточного цикла подопытной линии выявили отчетливую остановку на фазе G2 в клетках, обработанных вентилактоном В, а фосфорилирование p53, *cdc2*, *cdc25C* и p21 было усилено. Напротив, активность циклина В1, а также экспрессия генов *cdc2* и *cdc25C* оказалась подавленной. Из вышеизложенного можно заключить, что остановка клеточного цикла в стадию G2 при действии вентилактона В связана с качественными и количественными изменениями в составе регуляторных белков.

Апоптоз – базовый процесс, необходимый для развития и поддержания гомеостаза тканей, является основным механизмом ликвидации злокачественно-измененных клеток [16]. Таким образом, эффективная стратегия профилактики и лечения новообразований, по-видимому, должна быть нацелена на сигнальные промежуточные «звенья» в путях, индуцирующих апоптоз [Sun S.Y. et al., 2004]. Удалось показать экспериментально, что вентилактон В вызывает апоптоз, зависящий по эффективности от времени воздействия и дозы вещества. Одним из начальных, инициирующих этапов апоптоза клеток млекопитающих, является

комплекс цитофизиологических актов, происходящих на уровне митохондрий, тесно связанный с глобальной системой выживания клетки [Hengartner M.O., 2000]. В митохондриях апоптоз инициируется через повышение проницаемости наружной мембраны, уменьшение величины ΔΨ<sub>m</sub> (мембранного потенциала), высвобождение цитохрома С и повышение продукции активных форм кислорода [17]. При воздействии вентилактона В на клетки линии SMMC-7721 наблюдали значительное увеличение протеолитического расщепления каспаз-9, -7, -3 и PARP, но не каспазы-8. Синтетический ингибитор каспазы z-VAD-fmk почти остановил индуцированный апоптоз, что указывает на факт зависимости апоптоза, вызванного вентилактоном В, от событий, происходящих в митохондриях. В то же время увеличение концентрации цитоплазматического цитохрома С, которое происходит за счет его высвобождения из митохондрий в обработанных вентилактоном клетках, указывает на активацию собственного пути апоптоза митохондрий. Кроме того, в апоптоз были вовлечены как проапоптотические, так и антиапоптотические белки семейства Bcl-2 [18]. В клетках, обработанных вентилактоном В, последовательно было обнаружено подавление синтеза Bcl-XL и Bcl-2 и стимулирование проапоптотических белков семейства Вах; все эти факты согласуются с индукцией апоптоза.

Апоптоз, индуцированный вентилактоном В, сопровождался накоплением активных форм кислорода, притом предварительная обработка клеток антиоксидантом N-ацетилцистеином частично предотвращала связанное с эффектом вентилактона В увеличение числа клеток, где возник апоптоз, хотя N-ацетилцистеин почти не восстанавливал до нормального состояния клетки с остановкой в фазе G2. Данное обстоятельство указывает, что вызванная вентилактоном В гибель клеток опосредована активацией апоптотических путей, связанных с гиперпродукцией активных форм кислорода, а также остановку в фазе цикла G2, не связанную с образованием перекисных соединений [7].

Среди внутриклеточных сигнальных путей типа MAPK активацию пути ERK многие исследователи уже давно ассоциируют с пролиферацией и ростом, а в некоторых случаях – и с апоптотическими сигналами. Путь JNK, как правило, ответственный за апоптотический ответ, индуцированный некоторыми агентами, повреждающими ДНК [Shen H.M., Liu Z.G., 2006]. Обработка клеток вентилактоном В приводила к активации фосфорилирования внеклеточной сигнально-регулируемой киназы (ERK) и с-Jun N-концевой киназы (JNK). Анализ результатов проточной цитометрии показал, что только ингибитор JNK заметно подавляет апоптоз, индуцированный вентилактоном В, а ингибитор ERK отменяет вызванную вентилактоном В остановку фазы G2. Кроме того, активация ERK участвует в накоплении фосфорилированной формы продукта гена *cdc2*, что может быть связано с уменьшением биологического эффекта гена *cdc25C*, а это, в конечном счете, приводит к последующей остановке фазы G2. Активация JNK при действии вентилактона В участвует в опосредованном апоптозе, который можно подавлять ингибитором JNK – веществом SP600125. Эти результаты доказывают, что передача биохимического сигнала через ERK опосредует блокирование перехода фаз клеточного цикла G2/М. Кроме того,

можно утвердительно заключить, что при индукции апоптоза вентилактоном В важное значение имеет каскад JNK. Взаимодействие факторов, регулирующих эффект вентилактона В на опухолевые клетки, показано графически на рисунке 2.

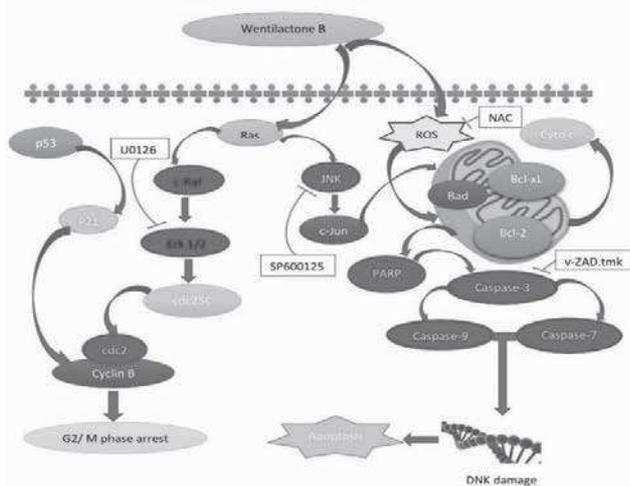


Рис. 2. Система, опосредующая действие вентилактона В на клетки линии SMMC-7721. Схема построена в соответствии с оригинальной схемой по Zhang Z. и соавторам [7]. Условные обозначения: wentialactone В – вентилактон В, NAC – N-ацетилглюкозамин; ROS – активные формы кислорода; Cyto c – цитохром С; apoptosis – апоптоз; DNK damage – повреждение ДНК; G2/M phase arrest – остановка клеточного цикла в фазе G2; U0126 – 1,4-диамино-2,3-дигидро-1,4-бис(2-аминофенилтио)бутадииен (селективный ингибитор протеинкиназы). Прочие обозначения приведены в тексте.

После воздействия вентилактоном В повысился уровень Ras, а также фосфорилирование фактора c-Raf. Очевидно, вентилактон В инициирует передачу сигналов посредством системы Ras. Чтобы лучше понять механизмы того, как Ras/Raf-система активирует путь MAPK (важный в действии вентилактона В), клетки SMMC-7721 трансформировали по мишени RasN17. В результате такого вмешательства в геном оказалось, что у модифицированных клеток, доминантно-негативных по локусу RasN17, вентилактон не может индуцировать типичные для его действия апоптоз и остановку цикла в фазе G2. Таким образом, в вентилактон В-индуцированной активации каскадов ERK и JNK ключевую роль играет передача сигналов через систему Ras/Raf.

Для подтверждения вышеперечисленных явлений, полученных в результате экспериментов, и для дальнейшего изучения возможных эффектов вентилактона В был применен INVdock-анализ (биоинформационное (*in silico*) исследование, нацеленное на поиск вероятных белковых «мишеней» для известного низкомолекулярного соединения), который, как планировали авторы, позволит выявить белки, непосредственно связывающие вентилактон В при реализации его противоопухолевого эффекта. Таким путем в опухолевой линии удалось идентифицировать 69 белков, экспрессия которых была значительно изменена после воздействия вентилактона В. Среди этих белков обнаружены члены семейства p53 и суперсемейства протеинкиназ HRas, BRaf, PAK4 и CDK2, притом все они тесно связаны с каскадом MAPK [7]; более того, пять белков

группы HRas и BRaf являются иерархически вышерасположенными молекулярными компонентами пути MAPK [19; Shields J.M. et al., 2000]. Авторами оригинального сообщения было высказано предположение о том, что изменения в системе Pas/Raf/MAPK может быть вовлечено в онкогенез у человека посредством нерегулярной активации рецепторных тирозинкиназ или мутаций с усилением функции, главным образом, в кодирующих генах RAS или RAF [20]. Кроме того, Ras-GTP обладает высоким родством к многочисленным иерархически нижерасположенным сигнальным белкам-эффекторам [Shields J.M. et al., 2000]. По этой причине для INVdock-анализа с целью прогнозирования способности связывать вентилактон В выбрали именно трехмерную структуру Ras-GTP. В результате INVdock-анализа, а также исследования с использованием SPR-биосенсорного анализа (метод наблюдения кинетики взаимодействия «лиганд – рецептор» в реальном времени на основе поверхностного плазмонного резонанса), оказалось, что вентилактон В способен непосредственно связывать Ras-GTP для активации нисходящего клеточного сигнального пути.

Таким образом стало очевидно, что вентилактон В оказывает противоопухолевый эффект в действии на клетки гепатомы человека линии SMMC-7721, которое опосредовано остановкой клеточного цикла в фазе G2 и апоптозом, возникающим посредством вовлечения митохондрий. Остановка клеточного цикла ассоциирована с действием сигнальной системы Ras/Raf/ERK, а индукция апоптоза – с действием сигнальной системы Ras/Raf/JNK. При реализации своих эффектов вентилактон В модулирует работу звеньев Ras/Raf для активации нисходящего сигнального механизма MAPK. Кроме того, благодаря описанным здесь регуляторным эффектам, вентилактон В как *in vitro*, так и *in vivo* может значительно ингибировать рост гепатоцеллюлярной карциномы. На основании собранных экспериментальных фактов вентилактон В возможно рассматривать как потенциальный терапевтический агент, перспективный для лечения злокачественных новообразований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в приведенной обзорной работе удалось собрать сведения о химическом строении некоторых «малых» метаболитов *A. wentii* и описать их антимикробные и противоопухолевые свойства.

В отношении антибактериальных и противогрибковых эффектов следует заметить, что у исследованных веществ они оказались не ярко выраженными, однако в дальнейшем представляется целесообразным выявить мишени их действия для разработки более высокоактивных синтетических аналогов. Несомненно, среди описанных метаболитов более интересным и перспективным оказалось противоопухолевое действие вентилактона В.

Метаболиты микроскопических грибов, обладающие антинеопластическими свойствами, проявляют свою активность посредством различных молекулярных механизмов. Терреин (метаболит *A. terreus*) оказывает цитотоксическое действие на клетки рака пищевода, в определенной степени сходное с вентилактоном В, здесь также происходит остановка клеточного цикла в фазе G2 и действие на регуляцию экспрессии цикли-

на B1 [21]. Хорошо известный метаболит *Eupenicillium brefeldianum* – брефелдин А – антионкогенный эффект реализует путем ингибирования белка ARF1 (фактор рибозилирования АДФ, специфичный для аппарата Гольджи, представитель суперсемейства Ras), что было доказано на другой линии клеток рака пищевода при действии полусинтетических производных этого вещества [22]. Асперлин, продуцируемый *A. nidulans*, подобно вентилактону В резко повышает образование свободных радикалов и инициирует каспазный каскад, вызывая тем самым также остановку цикла в фазе G2 и апоптоз в клетках линии рак шейки матки. Помимо этого, при действии асперлина выявили активацию сериновой/треониновой протеинкиназы АТМ, которая обычно активируется при образовании двуниевых разрывов ДНК [23]. На каспазный каскад (в данном случае путем ингибирования каспазы-1) действует атинепластический продукт *P. rubrum* и *Talaromyces pinophilus* – пенисимплицисин [24]. Образующий *T. pinophilus* метаболит 3-О-метилфуникон затрагивает не саму регуляцию клеточного цикла и апоптоза, а функционирование цитоскелета клетки. Это вещество в клетках линии рака молочной железы изменяет организацию микротрубочек, что приводит к изменению формы клеток, подавлению их миграции и пролиферации. На молекулярном уровне данный эффект опосредован снижением экспрессии  $\alpha 5$ -интегрина, сурвивина и теломеразы-обратной транскриптазы hTERT (повышенные уровни последних двух белков ассоциированы с прогрессией опухоли), подавлением секреции металлопротеиназы MMP-9 [25]. Трицитринол В из *P. citrinum* является ингибитором топоизомеразы II $\alpha$ , повреждая ДНК опухолевых клеток. Он также вызывает остановку цикла в фазе G2 [26].

В настоящее время в качестве самостоятельного класса антинеопластических соединений рассматривают так называемые «митоканы» – вещества, действу-

ющие на различные молекулярные мишени митохондриальных опухолевых клеток. Одним из классических митоканов является атпенин А5 (из *P. atramentosum*), действующий на сукцинатдегидрогеназный комплекс и приводящий к повышенному образованию свободных радикалов [27].

По-видимому, совершенно обособленным по механизму действия соединением является ботриодиплодин – структурный аналог рибозы из *T. stipitatus*. Теоретически, этот токсин может блокировать различные клеточные процессы, связанные с метаболизмом рибозы, но для этого утверждения еще недостаточно экспериментальных доказательств [28]. С другой стороны, в силу очень простой структурной организации ботриодиплодина его действие на опухолевые клетки, микромицеты и бактерии едва ли является настолько селективным, чтобы использовать в терапевтических целях. Офиоболин А, секретлируемый *Bipolaris setariae*, а также *Aspergillus* spp. секции Usti, блокирует действие внутриклеточных сигнальных путей, вовлеченных в онкогенез, в том числе и путь Ras/Raf/ERK, на который влияет и рассмотренный здесь вентилактон В [29].

Как видно из приведенных данных, несмотря на многообразие молекулярных механизмов действия метаболитов грибов на клетки новообразований, многие из этих веществ, как и подробно рассмотренный вентилактон В, связаны с общими явлениями: взаимодействие со звеньями сигнальной системы Ras/Raf/MAPK, изменение экспрессии циклина B1, повышение продукции свободных радикалов, остановка клеточного цикла в фазе G2 и индукция апоптоза.

В связи доказанным антинеопластическим действием вентилактона В и перспективностью терапевтического внедрения необходимо предпринять поиск штаммов *A. wentii*, подходящих для биотехнологического производства, а также выявить оптимальные условия для продукции этого соединения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Frisvad J.C., Larsen T.O. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2015; 99 (19): 7859-7877.
2. Bladt T.T., Frisvad J.C., Knudsen P.B., Larsen T.O. Anticancer and antifungal compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other filamentous fungi. Molecules. 2013; 18 (9): 11338-11376.
3. Sun H.-F., Li X.-M., Li M., et al. Asperolides A-C, tetranorlabdane diterpenoids from the marine alga-derived endophytic fungus *Aspergillus wentii* EN-48. Journal of Natural Products. 2012; 75 (5): 148-152.
4. Zhang Z., Miao L., Sun W., et al. Wentilactone B from *Aspergillus wentii* induces apoptosis and inhibits proliferation and migration of human hepatoma SMMC-7721 cells. Biol. Pharm. Bull. 2012; 35 (11): 1964-1971.
5. Halsey C., Lumley H., Luckit J. Necrotising external otitis caused by *Aspergillus wentii*: a case report. Mycoses. 2010; 54 (4): 211-213.
6. Miao F.P., Liang X.R., Yin X.L., et al. Absolute configurations of unique harziane diterpenes from *Trichoderma* species. Org. Lett. 2012; 14 (15): 3815-3817.
7. Zhang Z., Miao L., Ly C., et al. Wentilactone B induces G2/M phase arrest and apoptosis via the Ras/Raf/MAPK signaling pathway in human hepatoma SMMC-7721 cells [Electronic resource]. Cell Death and Disease. 2013; 4.
8. Senbanjo L.T., Chellaiah M.A. CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells [Electronic resource]. Frontiers in cell and developmental biology. 2017; 5.
9. Li Y., Xu H., Su S., et al. Clinical validation of a highly sensitive assay to detect EGFR mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced lung adenocarcinoma [Electronic resource]. PLoS One. 2017; 12.
10. Sun Y., Liu W.Z., Liu T. et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. Journal of receptor and signal transduction research. 2015; 35 (6): 600-6004.
11. Fernandez-Medarde A., Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. Genes & Cancer. 2011; 2 (3): 344-358.
12. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. Успехи биологической химии. 2007; 47: 3-52. [Chumakov P.M. Belok p53 i ego universalnyie funktsii v mnogokletochnom organizme. Uspehi biologicheskoy himii. 2007; 47: 3-52. (In Russ)]
13. Abbas T., Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. Nature reviews. Cancer. 2009; 9 (6): 400-414.
14. Morales J., Li L., Fattah F.J., et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for

- targeting in cancer and other diseases. Critical reviews in eukaryotic gene expression. 2014; 24 (1): 15-28.
15. Vousden K.H., Lane D.P. p53 in health and disease. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2007;8 (4): 275-283.
  16. Li S., Dong P., Wang J., et al. Icariin, a natural flavonol glycoside, induces apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells via a ROS/JNK-dependent mitochondrial pathway. Cancer Lett. 2010; 298 (2): 222-230.
  17. Feng B., Guo Y.W., Huang C.G., et al. 2'-epi-2'-O-acetylthevetin B extracted from seeds of *Cerbera manghas* L. induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. Chem. Biol. Interact. 2010; 183 (1): 142-153.
  18. Lin H.H., Chen J.H., Huang C.C., Wang C.J. Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation. Int. J. Cancer. 2007; 120 (11): 2306-2316.
  19. Díez D., Sánchez-Jiménez F., Ranea J.A. Evolutionary expansion of the Ras switch regulatory module in eukaryotes. Nucleic Acids Res. 2011; 39 (13): 5526-5537.
  20. Santarpia L., Lippman S.M., El-Naggar A.K. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. Expert Opin. Ther. Targets. 2012; 16 (1): 103-119.
  21. Wu Y., Zhu Y., Li S., et al. Terrein performs antitumor functions on esophageal cancer cells by inhibiting cell proliferation and synergistic interaction with cisplatin. Oncology letters. 2017; 13 (4): 2805-2810.
  22. He B., Wang Y., Zheng Y., et al. Synthesis and cytotoxic evaluation of acylated brefeldin A derivatives as potential anticancer agents. Chemical Biology & Drug Design. 2013; 82 (3): 307-316.
  23. He L., Nan M.H., Oh. H.C., et al. Asperlin induces G<sub>2</sub>/M arrest through ROS generation and ATM pathway in human cervical carcinoma cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2011; 409 (3): 489-493.
  24. Stierle A.A., Stierle D.B., Girtsman T. Caspase-1 inhibitors from an extremophilic fungus that target specific leukemia cell lines. Journal of natural products. 2012; 75 (3): 344-350.
  25. Buommino E., Boccellino M., de Filippis A., et al. 3-O-methylfunicone produced by *Penicillium pinophilum* affects cell motility of breast cancer cells, downregulating alpha5 beta1 integrin and inhibiting metalloproteinase-9 secretion. Molecular Carcinogenesis. 2007; 46 (11): 930-940.
  26. Du L., Liu H.C., Fu W., et al. Unprecedented citrinin trimer tricitinol B functions as a novel topoisomerase IIa inhibitor. Journal of medicinal chemistry. 2011; 54 (16): 5796-5810.
  27. Kluckova K., Bezawork-Geleta A., Rohlena J., et al. Mitochondrial complex II, a novel target for anti-cancer agents. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. 2013; 1827 (5): 552-564.
  28. Shier W.T., Abbas H.K., Baird R.E., et al. (-)-Botryodiplodin, a unique ribose-analog toxin. Toxin Reviews. 2007; 26 (4): 343-386.
  29. Bhatia D.R., Dhar P., Mutalik V., et al. Anticancer activity of Ophiobolin A, isolated from the endophytic fungus *Bipolaris setariae*. Natural Product Research. 2016; 30 (12): 1455-1458.

Поступила в редакцию журнала 25.10.2017

Рецензент: А.Е. Тараскина



## ИНВАЗИВНЫЕ МИКОЗЫ, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ РЕДКИМИ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ, У ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ НА ФОНЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

<sup>1</sup>Рогачева Ю.А. (студент), <sup>1</sup>Попова М.О. (гематолог)\*, <sup>1</sup>Волкова А.Г. (эндоскопист, пульмонолог, зав. отд.), <sup>1</sup>Екушев К.А. (педиатр), <sup>1</sup>Пирогова О.В. (с.н.с., гематолог), <sup>1</sup>Пинегина О.Н. (биолог), <sup>2</sup>Игнатьева С.М. (в.н.с.), <sup>2</sup>Богомолова Т.С. (зав. лаб.), <sup>1</sup>Пайна О.В. (зав. отд.), <sup>1</sup>Быкова Т.А. (зав. отд.), <sup>1</sup>Дарская Е.И. (зав. отд.), <sup>1</sup>Владовская М.Д. (зав. отд.), <sup>1</sup>Смирнов Б.И. (доцент кафедры, инженер), <sup>1</sup>Моисеев И.С. (зам. директора по научной работе), <sup>1</sup>Бондаренко С.Н. (зам. директора клиники по лечебной работе), <sup>1</sup>Зубаровская Л.С. (профессор кафедры, руководитель отдела), <sup>2</sup>Климко Н.Н. (зав. кафедрой), <sup>1</sup>Афанасьев Б.В. (зав. кафедрой)

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

© Коллектив авторов, 2017

В 2009-2016 гг. в клинике НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой выполнили 1227 трансплантаций аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) и 567 ауто-ТГСК, после которых развилось 30 инвазивных микозов (ИМ), обусловленных редкими возбудителями: алло-ТГСК – 27/1227 (2,2%), ауто-ТГСК – 2/567 (0,3%), противоопухолевая химиотерапия (ПХТ) – 1. Медиана срока возникновения ИМ после алло-ТГСК составила 92 день, после ауто-ТГСК – 138, от начала ПХТ – 134. Факторы риска развития редких ИМ: цитостатическая панцитопения или занофунция трансплантата, острая или хроническая реакция «трансплантат против хозяина», а также высокое содержание ферритина в сыворотке крови. Основными возбудителями (n=20, 66,7%) были мукормицеты: *Rhizopus spp.* – 19 (63,4%) и *Rhizomucor spp.* – 1 (3,3%), реже выявляли *Paecilomyces spp.* – 5 (15,5%), *Fusarium spp.* – 2 (6,6%), *Scopulariopsis gracilis* – 1 (3,3%), *Scedosporium apiospermum* – 1 (3,3%) и *Trichosporon asahii* – 1 (3,3%).

У 55% больных редкие ИМ развились в сочетании или после инвазивного аспергиллеза. Основным клиническим симптомом ИМ было повышение температуры тела > 38 °C (100%), органом поражения – легкие (87%). Антимикотическую терапию проводили 100% пациентов, общая выживаемость (ОВ) в течение 12 недель от диагностики ИМ составила 47%, одного года – 23,3%. Установлено, что комбинированная терапия мукормикоза достоверно улучшает ОВ больных в течение одного года (40% vs 10%, p=0,05).

**Ключевые слова:** острый лейкоз, мукормикоз, редкие грибы, алло-ТГСК, *Mucor*, *Fusarium*

## INVASIVE MYCOSES CAUSED BY RARE PATHOGENS IN PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL DISEASES AFTER HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION AND CHEMOTHERAPY

<sup>1</sup>Rogacheva Y.A. (student), <sup>1</sup>Popova M.O. (hematologist), <sup>1</sup>Volkova A.G. (gastroenterologist, pulmonologist, head of the department), <sup>1</sup>Ekushev K.A. (pediatrician), <sup>1</sup>Pirogova O.V. (senior scientific researcher, hematologist), <sup>1</sup>Pinegina O.N. (biologist), <sup>2</sup>Ignatieva S.M. (leading scientific researcher), <sup>2</sup>Bogomolova T.S. (head of the laboratory), <sup>1</sup>Paina O.V. (head of the department), <sup>1</sup>Bykova T.A. (head of the department), <sup>1</sup>Darskaya E.I. (head of the department), <sup>1</sup>Vladovskaya M.D. (head of the department), <sup>1</sup>Smirnov B.I. (associate professor, engineer), <sup>1</sup>Moiseev I.S. (deputy director for scientific work), <sup>1</sup>Bondarenko S.N. (deputy director of the clinic for medical work), <sup>1</sup>Zubarovskaya L.S. (professor of the chair, head of the department), <sup>2</sup>Klimko N.N. (head of the chair), <sup>1</sup>Afanasyev B.V. (head of the chair)

<sup>1</sup>Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, First St. Petersburg Pavlov State Medical University; <sup>2</sup>North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Chair of Clinical mycology, Allergology and Immunology, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2017

Between 2009 and 2016 1227 allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) and 567 autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT) were performed in Raisa Gorbacheva Memorial Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation of First Pavlov State Medical University of St. Petersburg. After which evolved 30 invasive mycoses (IM) caused by rare pathogens: allo-HSCT – 27/1227 (2,2%), auto-HSCT – 2/567 (0,3%), cancer chemotherapy (CT) – 1.

The median day of onset of IM was 92 days after allo-HSCT, 138 days after auto-HSCT and 134 days after start of CT. Risk factors for development of rare IM were: pancytopenia of graft hypofunction, acute or chronic graft-versus-host disease, as well as high levels of serum ferritin. Major pathogens (n=20, 66,7%) were mucormycetes: *Rhizopus spp.* – 19 (63,4%) and *Rhizomucor spp.* – 1 (3,3%), rarely identified *Paecilomyces spp.* – 5 (15,5%), *Fusarium spp.* – 2 (6,6%), *Scopulariopsis gracilis* – 1 (3,3%), *Scedosporium apiospermum* – 1 (3,3%) and *Trichosporon asahii* – 1 (3,3%). In 55% of patients IM caused by rare pathogens develops after or in combination with invasive aspergillosis. Febrile fever was the main clinical symptom of IM (100%). The main organ of the defeat was lungs (87%). Antifungal therapy was performed in 100% of patients in accordance with the guidelines. Overall survival at 12 weeks from the diagnosis of IFD was 47%, at 1 year – 23,3%. Combination antifungal therapy improves 1 year survival in patients with invasive mucormycosis (40% vs 10%, p=0,05).

**Key words:** acute leukemia, mucormycosis, rare fungi, allo-HSCT, *Mucor*, *Fusarium*

\* Контактное лицо: Попова Марина Олеговна  
e-mail: marina.popova.spb@gmail.com

## ВВЕДЕНИЕ

У гематологических и онкологических пациентов инвазивные микозы (ИМ) являются распространенным осложнением. Это связано с широким применением высокодозной полихимиотерапии (ПХТ) и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Основные возбудители ИМ у онкогематологических больных – *Aspergillus* spp. В последние годы удалось существенно улучшить результаты лечения инвазивного аспергиллеза с помощью ранней диагностики и применения вориконазола [1, 2]. Однако увеличилась частота ИМ, обусловленных мукормицетами (*Rhizopus* spp. и пр.) и другими редкими возбудителями (*Fusarium* spp. и пр.), которые могут быть устойчивы к вориконазолу и другим противогрибковым лекарственным средствам. Количество публикаций о вызванных редкими возбудителями ИМ у гематологических и онкологических пациентов ограничено.

Цель данного исследования – определить распространенность, этиологию, факторы риска, клинические проявления и лечение редких ИМ у гематологических и онкологических больных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ретроспективное исследование включили пациентов, проходивших лечение в клинике НИИ ДОГиТ им. Р.М.Горбачевой с 2009 по 2016 гг. Кроме демографических, оценивали 150 показателей, включающих основное заболевание, данные анамнеза жизни, факторы риска развития ИМ, диагностику и лечение ИМ и т.д. Период наблюдения за пациентами составил от 1 года до 7 лет. Для диагностики и оценки лечения ИМ, вызванных мукормицетами и другими редкими грибами, применяли критерии Европейской организации по изучению и лечению рака (The European Organisation for Research and Treatment of Cancer, EORTC) и исследующей микозы группы (Mycoses Study Group, MCG). Изучали «доказанные» и «вероятные» ИМ в соответствии с критериями EORTC/MSG 2008. Диагноз устанавливали при наличии факторов риска, радиологических признаков инвазивного микоза в сочетании с выявлением возбудителя при микроскопии, гистологическом исследовании и/или посеве БАЛ, крови, материала из очагов поражения. Для диагностики использовали компьютерную томографию (КТ) грудной клетки, брюшной полости и забрюшинного пространства, придаточных пазух носа; магнитно-резонансную томографию (МРТ) головного мозга. Для статистической обработки материалов применяли программы из пакета Microsoft Office 2016 и IBM SPSS Statistics. Результат считали статистически значимым, если  $p < 0,05$ . Выживаемость анализировали при помощи метода Каплана-Мейера с построением графических кривых.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В период с 2009 по 2016 гг. в клинике НИИ ДОГиТ им. Р.М.Горбачевой было выполнено 1794 трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток, из них 1227 – алло-ТГСК и 567 – ауто-ТГСК. За это время у 30 пациентов диагностировали вызванный редкими возбудителями инвазивный микоз. Частота ИМ, обусловленных редкими возбудителями, при алло-ТГСК составила 2,2% ( $n=27/1227$ ), при ауто-ТГСК – 0,3% ( $2/567$ ). Возраст больных варьировал от 2 до 59 лет,

медиана возраста – 22 года; детей – 13 (43,3%), взрослых – 17 (56,7%), женщин – 9 (30%), мужчин – 21 (70%). Структура основных заболеваний кроветворной и лимфатической ткани: острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) – 9 (30%), острый лимфобластный лейкоз – 7 (22%), анемия Фанкони, хронический миелолейкоз, миелодиспластический синдром, лимфома Ходжкина, нейробластома, апластическая анемия, талассемия и саркома Юинга.

Наиболее часто ИМ, обусловленные редкими возбудителями, развивались у пациентов после алло-ТГСК – 27 (90%), реже – после ауто-ТГСК – 2 (6,7%), а также ПХТ – 1 (3,3%). Во время ремиссии фонового заболевания ТГСК была выполнена у 11 больных, вне ремиссии – у 18. Для противогрибковой профилактики использовали флуконазол, вориконазол, позаконазол и каспофунгин. Частота развития редких ИМ у реципиентов алло-ТГСК составила 2,2% ( $n=27/1227$ ), ауто-ТГСК – 0,3% ( $n=2/567$ ). Медиана срока развития редких ИМ после алло-ТГСК – 92 дня, после ауто-ТГСК – 138 дней. У 62% реципиентов алло-ТГСК редкие ИМ возникли на фоне/после острой или хронической реакции «трансплантат против хозяина» (оРТПХ и хрРТПХ). Уровень ферритина в сыворотке крови определили у 13 пациентов с редкими ИМ. У всех больных этот показатель был выше нормы, медиана значения ферритина – 1186 мкг/л (842-1504 мкг/л).

Основными ( $n=20$ , 66,7%) возбудителями были мукормицеты: *Rhizopus* spp. – 19 (63,4%) и *Rhizomucor* spp. – 1 (3,3%), реже обнаруживали *Paecilomyces* spp. – 5 (15,5%), *Fusarium* spp. – 2 (6,6%), *Scopulariopsis gracilis* – 1 (3,3%), *Scedosporium apiospermum* – 1 (3,3%) и *Trichosporon asahii* – 1 (3,3%). Отметим, что мукормицеты выявляли преимущественно в 2009-2013 гг., позднее – *Paecilomyces* spp., *Fusarium* spp., *Scopulariopsis gracilis*, *Scedosporium apiospermum* и *Trichosporon asahii*. У 55% больных редкий ИМ был установлен после или одновременно с инвазивным аспергиллезом.

Поражение легких отмечали у 87% пациентов, из них сочетание поражения легких, печени и кожи – у 9,9%, поражение печени и кожи – у 6,6%, остеомиелит – у 3,3%. У всех больных наблюдали повышение температуры более 38 °С. Клинические признаки поражения легких были неспецифическими: кашель, одышка, боль в груди, реже – кровохарканье.

Всем пациентам проводили антимикотическую терапию (табл.). Комбинированное лечение мукормикоза получали 10 человек, монотерапию – также 10. При ИМ, обусловленных другими редкими грибами, применяли только монотерапию.

Таблица

Антимикотическая терапия инвазивных микозов, обусловленных редкими возбудителями

Мукормикоз	n=20 (66,7%)	Другие редкие микозы	n=10 (33,3%)
<b>Комбинированная:</b>	<b>10</b>	<b><i>Paecilomyces</i> spp.</b>	<b>3</b>
Липидный комплекс Амф В + каспофунгин	5	Липидный комплекс Амф В	
Липидный комплекс Амф В+ каспофунгин + позаконазол	3	Вориконазол	2
Липидный комплекс Амф В + позаконазол	2	<b><i>Fusarium</i> spp.</b>	
<b>Монотерапия:</b>	<b>10</b>	Вориконазол	2
Липидный комплекс Амф В	5	<b><i>Trihosporon asahii</i></b>	

Позаконазол	3	Липидный комплекс Амф В	1
Каспофунгин	2	<i>Scopulariopsis gracilis</i>	
		Вориконазол	1
		<i>Scedosporium apiospermum</i>	
		Липидный комплекс Амф В	1

Общая выживаемость пациентов в течение 12 недель от установления диагноза ИМ составила 47% (Рис. 1а), в группах детей и взрослых – не различалась (46,2% vs. 47,1%, p=0,96); при использовании стартовой комбинированной терапии мукормикоза она была лучше, чем при монотерапии (70% vs 40%, p=0,1) (Рис. 2а).

Общая выживаемость (ОВ) пациентов с редкими ИМ в течение 1 года составила 23% (Рис. 1б). Установлено, что комбинированное лечение мукормикоза статистически достоверно улучшает ОВ больных в течение 1 года (40% vs 10%, p=0,05) (Рис. 2б). У больных с мукормикозом летальный исход был обусловлен прогрессированием инфекции (50%), неэффективностью лечения основного заболевания (43%) и другими причинами (7%). У пациентов с другими редкими ИМ основной причиной летального исхода было прогрессирование основного заболевания (75%), реже – прогрессирование инфекции (25%). У всех умерших от прогрессирования инфекции было сочетание грибковых, бактериальных и вирусных патогенов.

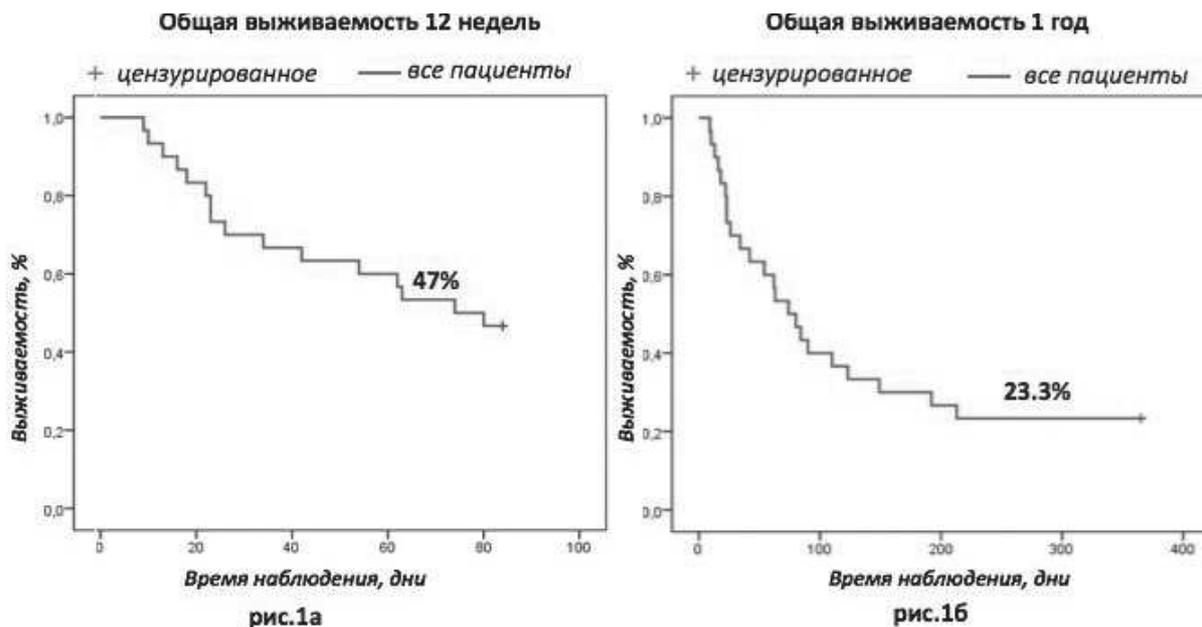


Рис. 1. Общая выживаемость пациентов с инвазивными микозами, вызванными редкими возбудителями: а) в течение 12 недель; б) в течение года.

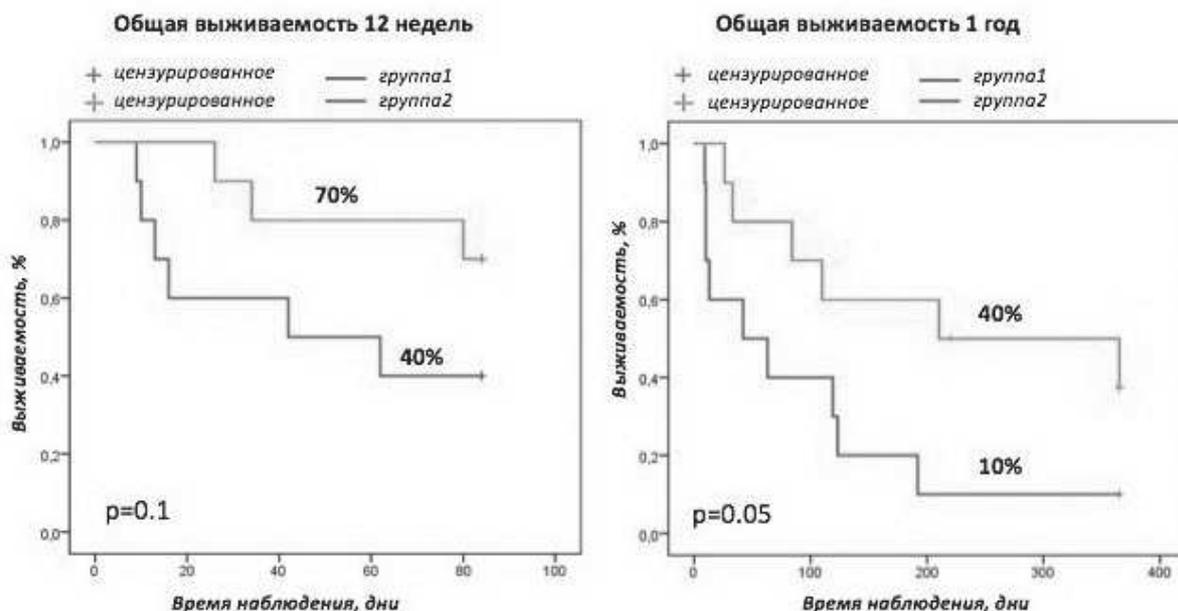


Рис 2. а) выживаемость пациентов с мукормикозом в течение 12 недель: группа 1 – антимикотическая монотерапия, группа 2 – комбинированная терапия, p=0,1; б) выживаемость пациентов с мукормикозом в течение 1 года: группа 1 – антимикотическая монотерапия, группа 2 – комбинированная терапия, p=0,05.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Инвазивные микозы, обусловленные редкими возбудителями, у онкогематологических больных на фоне трансплантации костного мозга и противоопухолевой химиотерапии являются редким событием в практике гематолога как при проведении противоопухолевой химиотерапии, так и при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

При анализе полученных данных, в сравнении с опубликованными исследованиями, можно сделать вывод, что наиболее частыми фоновыми заболеваниями являются ОМЛ и ОЛЛ [3]. В изученной нами группе пациентов, как и в других научных работах, основным органом поражения при ИМ, вызванном мукормицетами и другими редкими грибами, были легкие [4-6].

Одним из значимых факторов риска в настоящем исследовании было развитие ИМ на фоне оРТПХ или хрРТПХ. При этом развитие инвазивного микоза, вызванного редкими грибами, являлось поздним осложнением; это совпадает с данными Кэрл Гарсия-Видаля и др., подтверждающими, что на позднее развитие ИМ, помимо дозы кортикостероидов, ЦМВ-инфекции и частых гемотрансфузий, влияет РТПХ. [7, 8]. Нашим исследованием подтверждены опубликованные данные, что повышенный уровень ферритина является фактором риска развития ИМ, а применение такого представителя хелаторов железа, как дефероксамин, увеличивает рост мукормикоза за счет своего действия, подобно сидерофорам, поставляя железо грибам [9-10]. Ранее обсуждалось, что одним из возможных путей увеличения эффективности терапии мукормикоза является применение хелаторов железа, а именно деферазирокса и деферапрона в комбинации с липосомальным амфотерицином В. Авторы работы DEFEAT Mucor [11] при оценке комбинированной терапии с использованием указанных выше препаратов у 20 пациентов, из которых только 55% окончили 14-дневное лечение, выявили более высокую выживаемость у больных, применявших в качестве монотерапии липосомальный амфотерицин В, а не комбинацию с хелатором железа.

Нами было установлено статистически значимое улучшение выживаемости при применении комбинированной противогрибковой терапии у пациентов с мукормикозом. В большинстве случаев использовали комбинацию АмфВ с каспофунгином. Хороший результат их синергии показан также в крупнейшем 12-летнем клиническом исследовании пациентов с диабетом и доказанным мукормикозом, в котором 31 больной получал монотерапию АмфВ, а 9 – комбинацию АмфВ и каспофунгина. Комбинированное лечение привело к значительному выживанию пациентов через 30 дней после выписки из стационара – 100% против 45% ( $p=0,02$ ) при монотерапии [12]. В работе [13] описан 101 случай мукормикоза, когда 11 человек получили комбинацию АмфВ и позаконазола, 2 – АмфВ и каспофунгина и 1 – вместе три препарата. Значимых различий в выживаемости в зависимости от лечения не отмечали, однако результаты были лучше в группе лиц, применявших комбинированную терапию, в сравнении с группой, получавших монотерапию. Подробный анализ комбинированной терапии мукормикоза был представлен в недавнем ретроспективном исследовании, включающем пациентов из реестров

SEIFEM и Fungiscope. 32 больных лечили липидными препаратами АмфВ и позаконазола; положительный ответ наблюдали у 56% (включая 34% полного и 22% частичных ответов) [14].

В работах последних лет показано, что у иммунокомпрометированных пациентов происходит расширение этиологии ИМ в пользу редких грибов, к которым в настоящем исследовании отнесены *Paecilomyces* spp., *Fusarium* spp., *Scopulariopsis gracilis*, *Trichosporon asahii*, *Scedosporium apiospermum* [15]. Мы связываем подобное явление с усовершенствованием диагностики ИМ, широким внедрением протоколов эффективной первичной и вторичной профилактики, а также с улучшением результатов лечения пациентов с инвазивным аспергиллезом в последние годы.

В большинстве опубликованных случаев в терапии пациентов с гематологическими заболеваниями, обусловленными *S. apiospermum*, применяли комбинации АмфВ с итраконазолом, вориконазола с каспофунгином, а также вориконазола с тербинафином, что, в конечном итоге, привело к различным исходам и невозможности оценить эффективность лечения [16]. Но некоторые авторы отмечали эффективность монотерапии вориконазолом по сравнению с позаконазолом [17, 18]. И, хотя отсутствуют исследования, в которых бы сравнивали монотерапию ИМ, вызванного *S. apiospermum*, с комбинированным лечением, рекомендовано использование вориконазола совместно с тербинафином. [19] Мы применяли АмфВ для лечения пациента со сцедоспориозом, но не достигли эффекта, больной умер от развившихся осложнений – бактериального сепсиса.

Терапию инвазивных фузариозов необходимо начинать как можно быстрее, так как инфекция имеет чрезвычайно скорое развитие и высокую смертность. Эффективное лечение еще не разработано. Для первой линии терапии используют вориконазол. Также хороший результат получили при применении АмфВ, особенно липосомального [20].

В настоящем исследовании продемонстрировано улучшение диагностики ИМ, эффективность первичной и вторичной профилактики, а также успехи в лечении пациентов с наиболее частыми инвазивными микозами, в первую очередь, инвазивным аспергиллезом. Закономерным следствием успехов контроля наиболее частых инвазивных микозов у иммунокомпрометированных пациентов является появление инвазивных микозов, обусловленных редкими возбудителями. Несмотря на большие возможности в диагностике и терапии, в связи с небольшой частотой развития и скромным мировым опытом, проблема редких микозов остается до конца не решенной и требует дополнительных исследований.

## ВЫВОДЫ

Частота редких инвазивных микозов при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток составляет 2,2%, аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток – 0,3%. Редкие инвазивные микозы возникают в позднем посттрансплантационном периоде.

Факторы риска развития редких инвазивных микозов: цитостатическая панцитопения или гипофункция трансплантата, острая или хроническая реакция

«трансплантат против хозяина», высокое содержание ферритина в сыворотке крови.

Основные возбудители редких инвазивных микозов – мукормицеты (66,7%), преимущественно *Rhizopus* spp. (63,4 %), реже – *Paecilomyces* spp. (15,5%), *Fuzarium* spp. (6,6%), *Scopulariopsis gracilis* (3,3%), *Scedosporium apiospermum* (3,3%) и *Trichosporon asahii* (3,3%). Редкие ИМ развивались в сочетании или после инвазивного аспергиллеза у 55% пациентов.

Основным клиническим симптомом ИМ было повышение температуры тела > 38 °С (100%), органом поражения – легкие (87%). Общая выживаемость больных в течение 12 недель от диагностики ИМ – 47%, 1-го года – 23,3%. Комбинированная терапия (липидный комплекс амфотерицина В + каспофунгин, липидный комплекс амфотерицина В + позаконазол) мукормико-за достоверно улучшает общую выживаемость пациентов в течение 1-го года (40% vs 10%, p=0,05).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Arendrup M., Bille J., Dannaoui, E. et al. ECIL-3 classical diagnostic procedures for the diagnosis of invasive fungal diseases in patients with leukaemia. Bone Marrow Transplantation. 2012; 47: 1030-1045.
2. Климко Н.Н., Шадринова О.В., Хостелиди С.Н. и др. Инвазивный аспергиллез: результаты многоцентрового исследования. Онкогематология 2014; 2: 13-19 [Klimko N.N., Shadrivova O.V., Hostelidi S.N. i dr. Invazivnyiy aspergillez: rezultaty mnogotsentrovogo issledovaniya. Onkogematologiya 2014; 2: 13-19 (In Russ)].
3. Klimko N., Khostelidi S., Volkova A., Popova M., et al. Mucormycosis in haematological patients: case report and results of prospective study in Saint Petersburg, Russia. Mycoses. 2014; 57: 91-96
4. Petrikos G., Skiada A., Drogari-Apiranthitou M. Epidemiology of mucormycosis in Europe. Clin. Microbiol. Infect. 2014; 20: 67-73.
5. Hu R., Jiang X., Wu Y. Risk factors for invasive pulmonary fungal infection in patients with hematological malignancies not receiving hematopoietic stem cell transplant. Neoplasma. 2012; 59: 669-675.
6. Montagna M-T, De Giglio O., Napoli C., et al. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies (aurora project): lights and shadows during 18-months surveillance. Int. J. Mol. Sci. 2012;13: 774-787.
7. Климко Н.Н., Хостелиди С.Н., Шадринова О.В. и др. Инвазивный мукормикоз у онкогематологических больных (результаты проспективного исследования). Онкогематология. 2017; 12 (2): 14-22. [Klimko N.N., Hostelidi S.N., Shadrivova O.V. i dr. Invazivnyiy mukormikoz u onkogematologicheskikh bolnyih (rezultatyi prospektivnogo issledovaniya). Onkogematologiya. 2017; 12 (2): 14-22. (In Russ)].
8. 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: 1041-1050.
9. Spellberg B., Kontoyiannis D., Fredricks D., et al. Risk factors for mortality in patients with mucormycosis. Med. Mycol. 2012; 50: 611-618.
10. Danion F., Aguilar C., Catherinot E., et al. Mucormycosis: New developments into a persistently devastating infection. Semin. Respir. Crit. Care Med. 2015; 36: 692-705.
11. Spellberg B., Ibrahim A.S., Chin-Hong P.V., et al. The Deferasirox-ambisome therapy for mucormycosis (DEFEAT Mucor) study: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. J. Antimicrob. Chemother. 2012; 67: 715-722.
12. Reed C., Bryant R., Ibrahim A.S., et al. Combination polyene-caspofungin Curr Fungal Infect Rep treatment of rhino-orbital-cerebral mucormycosis. Clin. Infect. Dis. 2008; 47: 364-71.
13. Lanternier F., Dannaoui E., Morizot G., et al. A global analysis of mucormycosis: The RetroZygo study (2005–2007). Clin. Infect. Dis. 2012; 54: 35-43.
14. Pagano L., Cornely O.A., Busca A., et al. Combined antifungal approach for the treatment of invasive mucormycosis in patients with hematological diseases: a report from the SEIFEM and FUNGISCOPE registries. Haematologica. 2013; 98: 127-130.
15. Jain A., Jain S. and Rawat S. Emerging fungal infections among children: A review on its clinical manifestations, diagnosis, and prevention. J. Pharm. Bioallied Sci. 2010; 2: 314-320.
16. Candoni A., Aversa F., Busca A., et al. Combination antifungal therapy for invasive mould diseases in haematologic patients. An update on clinical data. Journal of Chemotherapy. 2015; 27: 1-12.
17. Cooley L., Spelman D., Thursky K., Slavin M. Infection with *Scedosporium apiospermum* and *S. prolificans*, Australia. Emerg. Infect. Dis. 2007;13: 1170-1177.
18. Wiederhold N.P., Lewis R.E. Antifungal activity against *Scedosporium* species and novel assays to assess antifungal pharmacodynamics against filamentous fungi. Med. Mycol. 2009; 47: 422-432.
19. Blyth C.C., Gilroy N.M., Guy S.D., et al. Consensus guidelines for the treatment of invasive mould infections in haematological malignancy and haemopoietic stem cell transplantation. Internal. Medicine Journal. 2014; 44: 1333-1349.
20. Segal B.H., Almyroudis N.G., Battiwalla M., et al. Prevention and early treatment of invasive fungal infection in patients with cancer and neutropenia and in stem cell transplant recipients in the era of newer broad-spectrum antifungal agents and diagnostics adjuncts. Clin. Infect. Dis. 2007; 44: 402-409.

Поступила в редакцию журнала 21.11.2017

Рецензент: О.В. Шадринова



# КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА С УЧЕТОМ ОБСЕМЕНЕННОСТИ КАЛА CANDIDA SPP. И ОБЩЕГО IGE

**Мавлянова Ш.З. (зав. отд.), Есионова Е.В. (н.с.)\*,  
Алимухамедова Ю.А. (н.с.), Асадов Р.К. (н.с.)**

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр дерматологии и венерологии, Ташкент, Узбекистан

©Коллектив авторов, 2017

Цель работы – изучение состояния микобиоты кишечника и содержания общего Ige у больных атопическим дерматитом (АД) с разными клиническими формами.

Обследованы 167 больных АД в острой стадии в возрасте от 8 до 65 лет; контрольную группу составили 24 практически здоровых лиц того же возраста и пола. Всем пациентам определяли степень тяжести АД согласно индексу SCORAD. Культуральное исследование биосубстратов кишечника на грибы рода *Candida* выполняли на среде Сабуро. Содержание общего Ige в крови больных АД проводили иммуноферментным анализом.

Согласно индексу SCORAD, в 53,3% случаев у пациентов с АД наблюдали тяжелую степень течения заболевания. Средний уровень общего Ige у больных с различными формами АД был повышен в 4,9 раз ( $P < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой. Повышенную колонизацию кишечника *Candida spp.* отмечали у лиц с тяжелой и средней степенями тяжести течения заболевания, которые чаще регистрировали при лихеноидной и пруригинозной формах.

Установлена корреляция обсемененности кишечника *Candida spp.* со степенью тяжести течения АД.

**Ключевые слова:** атопический дерматит, иммуноглобулин E, *Candida spp.*

## CLINICAL FEATURES OF ATOPIC DERMATITIS ACCOUNTING THE CONTAMINATION OF THE FECES OF CANDIDA SPP. AND TOTAL IGE

**Mavlyanova S.Z. (head of the department), Esionova E.V. (scientific collaborator), Alimukhamedova Yu.A. (scientific collaborator), Asadov R.K. (scientific collaborator)**

Republic Specialized Scientific Practical Medical Center of Dermatology and Venereology, Tashkent, Uzbekistan

©Collective of authors, 2017

The aim of this work was to study the state of the intestine mycobiota and the level of total Ige in patients with different forms of atopic dermatitis (AD).

167 patients with acute AD in age from 8 to 65 years were examined; the control group consisted of 24 apparently healthy individuals of the same age and gender. All patients were determined the degree of severity of AD according to the SCORAD index. The cultural investigation of the biosubstrates on *Candida* species was carried out on medium Saburo. The definition of the level of total Ige in patients with AD was done with ELISA.

According to the SCORAD index in 53,3% of cases in patients with AD

\* Контактное лицо: Есионова Елена Владимировна,  
e-mail: yesionova@yandex.ru

the severe degree of the disease was identified. The average level of total Ige in patients with various forms of AD was 4.9 as high as it was in the control group ( $P < 0,05$ ). Increased intestinal colonization of *Candida spp.* was noted in patients with severe and moderate disease, which were often recorded at pruriginous and lichenoid forms.

The correlation of intestinal contamination by *Candida spp.* with the degree of severity of AD was observed.

**Key words:** atopic dermatitis, immunoglobulin E, *Candida spp.*

Важным звеном в патогенезе атопического дерматита (АД) является сдвиг Th-1/Th-2-цитокинового профиля в сторону Th-2 реакций, который сопровождается повышенной секрецией иммуноглобулина E (Ige) [1].

Воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) играют важную роль в формировании АД. Это связано с тем, что ЖКТ является основным резервуаром грибов рода *Candida* (Смирнова Г.И., 2004). *Candida albicans* – причинно-значимые аллергены для 57% больных АД (Сергеев А.Ю., 2001). Кроме того, в желудке и кишечнике пациентов, инфицированных дрожжевыми грибами, формируется эндогенный очаг, оказывающий сенсibiliзирующее действие на организм [2]. Тяжесть течения АД коррелирует с выявлением аллерген-специфических Ige к *C. albicans*, особенно у лиц с колонизацией этого гриба в пищеварительном тракте [3].

Nissen D. и соавторы (1998) установили, что присоединение грибковой инфекции при АД может не только утяжелять клиническое течение, но также вызывать и поддерживать аллергическое воспаление кожи по Ige-зависимому типу аллергических реакций.

Цель исследования – изучить состояние микобиоты кишечника и содержание общего Ige у больных АД с разными клиническими формами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под нашим наблюдением находились 167 больных АД в острой стадии в возрасте от 8 до 65 лет (средний возраст – 37 лет), мужчин – 71 (42,5 %), женщин – 96 (57,5 %). Все больные были распределены по возрастным периодам: до 14 лет – 13 человек, 15-20 лет – 36, 21-30 лет – 42, 31-40 лет – 33, 41-50 лет – 22 и свыше 50 лет – 21. Проявление заболевания пациенты отмечали с раннего детского возраста, оно имело рецидивирующее течение с ремиссиями разной длительности. Всем больным диагноз был установлен на основании больших и малых критериев Hanifin и Raika (1980). Кожно-патологический процесс располагался на лице, верхних и нижних конечностях у 80% лиц, с захватом туловища – у 20%.

Эритематозно-сквамозную форму заболевания выявили у 33 (19,7%) пациентов, эритематозно-сквамозную с лихенификацией – у 37 (22,2%), экссудативную – у 45 (26,9%), пруригинозную – у 24 (14,4%), лихеноидную – у 28 (16,7%).

Из сопутствующей патологии преобладали заболевания ЖКТ – у 79 больных (47,3%) и анемия – у 71 (42,5%). Все пациенты отмечали диспепсические явления – метеоризм.

Степень тяжести АД определяли на основании индекса SCORAD (легкая степень  $iSc < 50$  баллов, средняя степень  $iSc$  – от 50 до 80 баллов, тяжелая степень  $iSc > 80$  баллов).

Контрольную группу составили 24 практически

здоровых лиц того же возраста и пола.

Культуральное исследование биосубстратов кишечника на *Candida* spp. проводили на среде Сабуро.

Содержание общего IgE в крови больных АД осуществляли иммуноферментным анализом тест-системами ООО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия)

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью программы Statistika V.55A с использованием критерия Шапиро-Уилка.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласно индексу SCORAD было выявлено наибольшее количество больных со средней степенью течения заболевания – 89 человек (53,3%), тяжелую степень отмечали 48 (28,7%) и легкую – 30 (18%) (табл. 1).

Таблица 1

Значение индекса SCORAD в зависимости от степени тяжести течения АД (балл)

	Легкая степень, n=30	Средняя степень, n=89	Тяжелая степень, n=48
Больные АД, n=167	41,05±1,3	67,8±0,8	87,3±0,8

Тяжелую степень АД регистрировали чаще у больных с лихеноидной и пруригинозной формами. В данных формах наиболее сильно проявлялись субъективные ощущения и распространенность клинического процесса. Среднюю степень наблюдали у больных с экссудативной и эритематозно-сквамозной формами с лихенификацией (табл. 2).

Таблица 2

Степень тяжести течения АД в зависимости от клинических форм заболевания

Клинические формы АД	Легкая степень, n=30	Средняя степень, n=89	Тяжелая степень, n=48
Эритематозно-сквамозная, n=33	13	20	
Эритематозно-сквамозная с лихенификацией, n=37	7	24	6
Экссудативная, n=45	10	26	9
Лихеноидная, n=28		12	16
Пруригинозная, n=24		7	17

Важнейшей особенностью патогенеза АД является активация гуморального иммунитета, что ведет к гиперпродукции IgE. Так, повышенный уровень общего IgE отмечали у всех исследуемых пациентов. Среднее значение общего IgE у больных АД составило 222,2±11,8 МЕ/мл (в группе контроля – 44,5±3,5 МЕ/мл), что превысило значение в 4,9 раз и имело статистически достоверный характер (P<0,05).

Подверженность грибковым заболеваниям является серьезной проблемой, осложняющей течение кожного процесса и способствующей дополнительной сенсибилизации и гиперпродукции IgE. Персистенция в кишечнике организма причинно-значимых аллергенов *Candida* spp. и взаимодействие их с фиксированными на поверхности тучными клетками, базофилами ведут к активации IgE, высвобождению медиаторов, индуцирующих развитие аллергического воспаления кожи.

Все пациенты отмечали диспепсические явления, метеоризм (64%), болезненность в животе (36%).

У всех больных при культуральном исследовании биосубстратов кишечника на среде Сабуро был зафиксирован рост *Candida* spp.

В результате исследований выявили увеличение обсеменения в 7,5 раз *Candida* spp. в кишечнике в группе больных – 3900±53,2 КОЕ/мл (в группе здоровых лиц – 517±41,4 КОЕ/мл) (P<0,05).

Таблица 3

Состояние индекса SCORAD, общего IgE и колонизации фекалий *Candida* spp. у больных АД с различной степенью тяжести

Степень тяжести АД	индекс SCORAD (балл)	Общий IgE (МЕ/мл)	Колонизация <i>Candida</i> spp. в биосубстратах кишечника (КОЕ/мл)
Легкая степень, n=30	41,05±1,3	205,3±15,3*	2950±43,4*
Средняя степень, n=89	67,8±0,8	230,7±7,7*	3950±35,9*
Тяжелая степень, n=48	87,3±0,8	230,5±12,4*	4800±87,1*
Контрольная группа, n=24		44,5±3,5	517±41,4

\*Показатель достоверности по отношению к группе контроля (P<0,05).

Как видно из таблицы 3, повышенная колонизация *Candida* имела место у больных с тяжелой (iSc>80) и средней степенью тяжести заболевания (iSc от 50 до 80) – 4800±87,1 КОЕ/мл и 3950±35,9 КОЕ/мл, при этом показание общего IgE были на одинаково высоком уровне – 230,5±12,4 и 230,7±7,7 МЕ/мл соответственно. У пациентов с тяжелой степенью заболевания уровень колонизации был превышен в 9,3 раз по сравнению с контрольной группой, со средней степенью – в 7,6 раз и с легкой – в 5,7 раз (P<0,05). Уровень колонизации *Candida* spp. в кишечнике коррелировал со степенью тяжести заболевания (r = 0,5, P < 0,001). Данные доказывают высокую аллергическую активность *Candida* spp., которые также влияют на продукцию иммуноглобулинов класса E.

Наиболее высокую колонизацию грибов в кишечнике отмечали у больных с лихеноидной и пруригинозной формами – 5100±93,52 КОЕ/мл и 4800±52,08 КОЕ/мл соответственно, наименьшую – у пациентов с эритематозно-сквамозной (3100±35,42 КОЕ/мл) и экссудативной (2700±44,57 КОЕ/мл) формами. При этом содержание сывороточного IgE носило выраженный характер во всех клинических формах. Его достоверное повышение наблюдали независимо от степени тяжести процесса (табл. 4).

Таблица 4

Состояние индекса SCORAD, общего IgE и колонизации фекалий грибами рода *Candida* у больных различными формами АД

Клиническая форма АД	индекс SCORAD (балл)	Общий IgE (МЕ/мл)	Колонизация <i>Candida</i> spp. в биосубстратах кишечника (КОЕ/мл)
Эритематозно-сквамозная, n=33	52,4±1,6	217,3±5,7	3100±35,42
Эритематозно-сквамозная с лихенификацией, n=37	67,5±0,7	225,5±6,4	4500±50,64
Экссудативная, n=45	73,8±1,7	195,5±13,8	2700±44,57
Лихеноидная, n=28	85,9±0,6	245,2±8,5	5100±93,52
Пруригинозная, n=24	87,3±0,7	227,5±7,7	4800±52,08

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований выявили, что на степень тяжести АД влияет колонизация кишечника *Candida* spp., а не уровень общего IgE, который достоверно по-

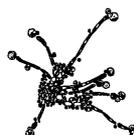
вышен в каждой из них. Поэтому своевременная микодиагностика биосубстратов кишечника будет способствовать успешной терапии и уменьшению тяжелых рецидивирующих форм заболевания.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Akdis M., Blasser K., Akdis C.A. T regulatory cells in allergy. Chem. Immunol. Allergy. 2006; 91: 159-173.
2. Мавлянова Ш.З. Микогенная сенсibilизация при дерматозах. Руководство для врачей. Ташкент, 2014: 183 с. [Mavlyanova Sh.Z. Mikogennaya sensibilizatsiya pri dermatozah. Rukovodstvo dlya vrachev. Tashkent, 2014: 183 s. (In Russ)]
3. Феденко Е.С., Елисютина О.Г. Роль грибковой инфекции в развитии атопического дерматита и целесообразность противогрибковой терапии. Российский аллергологический журнал. 2006; 5: 4-13. [Fedenko E.S., Elisyutina O.G. Rol gribkovoy infektsii v razvitii atopicheskogo dermatita i tselesoobraznost protivogribkovoy terapii. Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal. 2006; 5: 4-13. (In Russ)]

Поступила в редакцию журнала 10.10.2017

Рецензент: Л.М. Леина



## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ *IN VITRO* РАСТУЩИХ КЛЕТОК ГИФ *SCEDOSPORIUM* *AURANTIACUM*

<sup>1</sup>Степанова А.А. (зав. лаб.), <sup>2</sup>Ямагучи М. (главный специалист), <sup>2</sup>Чибана Х. (профессор), <sup>1</sup>Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой), <sup>1</sup>Шульгина М.В. (зам. директора по научной работе)

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

© Коллектив авторов, 2017

При сравнительном ультраструктурном анализе особенностей морфогенеза клеток гиф *Scedosporium aurantiacum* выявили значительные различия между штаммом CBS 136.046 и тремя другими (CBS 116910, CBS 136047, CBS 136049). Показаны различия в характере споруляции изученных культур, размерах интерфазных ядер, морфологии оболочки ядра, присутствии/отсутствии митохондриального ретикулума, а также микротелец, компонентов эндомембранной системы, типе аккумулируемых запасных веществ и внеклеточных вторичных метаболитов. Клетки вегетативного мицелия колоний всех изученных штаммов содержали одно интерфазное ядро с низким уровнем конденсированного хроматина. Выявленные различия в морфогенезе клеток гиф коррелируют с данными по строению стенки конидий и септального порового аппарата изученных штаммов. Впервые склеротии обнаружены в культурах разных штаммов *S. aurantiacum*, а также отмечена важность использования данных ультраструктуры клеток гиф, выращенных *in vitro*, для таксономических исследований.

**Ключевые слова:** сравнительный анализ, клетки гиф, морфогенез, *Scedosporium aurantiacum*, склеротий, *in vitro*, ультраструктура

## COMPARATIVE ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF THE *IN* *VITRO* GROWING HYPHAL CELLS OF *SCEDOSPORIUM* *AURANTIACUM*

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

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

© Collective of authors, 2017

Comparative ultrastructural analyses of the peculiarities of *Scedosporium aurantiacum* hyphal cells show significant differences between the strain CBS 136.046 and another three (CBS 116910, CBS 136047, CBS 136049). Differences in the pattern of sporulation within cultures, interphase nucleus size, morphology of nuclear envelope, presence/absence of the mitochondrial reticulum, and also microbodies, components of endomembrane system, types of accumulated storage substances and extracellular secondary metabolites were revealed. The cells of vegetative mycelium in colony of all studied strains contained one interphase nucleus with lower level of condensed chromatin. The morphological differences in the hyphal cells correlated with the data about the structure of conidial wall and septal pore apparatus of studied strains. For the first time the sclerotia were revealed in cultures of different strains of *S. aurantiacum*; and also importance of the *in vitro* growing hyphal cell ultrastructural data for taxonomical investigations was shown.

**Key words:** comparative analysis, hyphal cells, morphogenesis, *Scedosporium aurantiacum*, sclerotium, *in vitro*, ultrastructure

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

*Scedosporium aurantiacum* Gilgado, Cano, Gené & Guarro – opportunistic pathogenic fungi, was found in soil, sewage and polluted waters [1]. This fungus cause malignant otitis externa, osteomyelitis, invasive sinusitis, keratitis, brain infection, cystic fibrosis and pneumonia [2-5]. The infection developed also after solid organ transplantation [6]. Previously we demonstrated distinct differences in the conidial wall and septal pore apparatus structure of the hyphal cells of *S. aurantiacum* strains and type species of genus *Scedosporium* – *S. apiospermum* [7]. Ultrastructural study of the in vitro growing hyphal cell morphogenesis of *S. aurantiacum* has not been performed. Thus, it may be interesting to study peculiarity in pattern of morphogenesis of vegetative mycelium cells on different *S. aurantiacum* strains and compare these data with the strains of *S. apiospermum* [8].

## MATERIALS AND METHODS

In present work we investigate the cells of four strains of *S. aurantiacum* Gilgado, Cano, Gene & Guarro (CBS 116910, CBS 136046, CBS 136047, CBS 136049, Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre), which were cultured on potato dextrose agar at 28 °C and fixed after 7 and 20 days of culture. The stains were verified by rDNA ITS sequencing. The strain CBS 116910 was isolated from human wound exudate, CBS 136046 – from human lung and CBS 136047, CBS 136049 – from soil.

For scanning electron microscopy the part of fungal colonies with nutrient medium after 7 and 20 days of sowing was transported in 3% glutaraldehyde (on 0,1 M cacodylate buffer) for 3 hour, post-fixed overnight in 1% osmium tetroxide in same buffer, dehydrated by ethanol series (30°→70°), critical-point dried (HCP-2) for 15 min, coated with gold and observed in JSM 35 (JEOL, Tokyo, Japan).

For transmission electron microscopy (TEM) the pieces of medium with different part of fungal colonies were fixed for 3 h in 3% glutaraldehyde and post-fixed in 1% osmium tetroxide for 10 h. Then samples were dehydrated through series of ethanol and acetone and embedded in epon-ardite epoxy resin.

We carried out the light microscopic investigations of the semi-thin epoxy sections (3-5 µm), which were cut on the Pyramitome 1180 (LKB, Bromma, Sweden) using of glass knives and then colored with toluidine blue. After investigations of the semi-thin sections under light microscope Leica DM 4000, we revealed area, which necessary for subsequent target trimming (on aerial or submerged mycelium). Ultrathin sections were cut on Ultratome 2088 (LKB, Bromma, Sweden), stained with uranyl acetate and lead citrate and then examined under transmission electron microscope JEM-100 CX II (JEOL, Tokyo, Japan).

## RESULTS AND DISCUSSION

Longitudinal semi-thin epoxy sections of the 20-days part of strains colonies demonstrated the presence of three distinct layers (Fig. 1 a-c, layers 1-3). The arrows on fig. 1 a-c demonstrated the nutrient medium surfaces. The 1st outer layer was thicker in culture of strain CBS 136049 (Fig. 1 a, layer 1). Contrary in the culture CBS 136046 this layer was very thin (Fig. 1 c, layer 1) and in CBS 116910 and CBS 136047 (Fig. 1 b, layer 1) – with intermediate thickness. In this layer we found dead or on different stage of senescence hyphal cells and mature conidia; there were no intact hyphae

as a rule. The mature conidia of all investigated strains were concentrated in upper part of submerged mycelium (Fig. 1 a-c, layer 2). Concentration on conidia was higher in the semi-thin sections of fungal colony of strains CBS 136049 (Fig. 1 a, layer 2) and CBS 136046 (Fig. 1 c, layer 2). The 3-rd layer in submerged mycelium was composed of practically only with dead hyphae and in different stages of senescence and destruction.

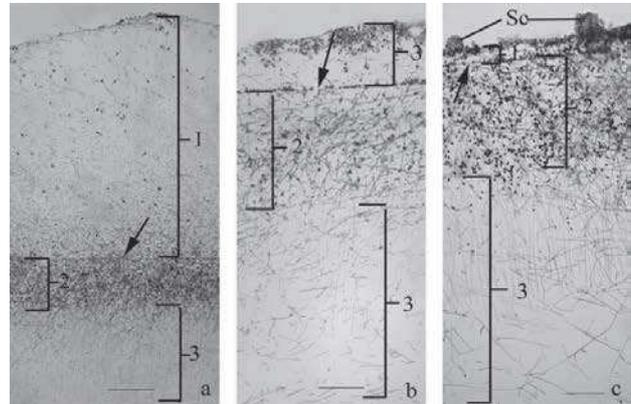


Fig. 1. Light microscopy of longitudinal semi-thin epoxy sections of the mature part of colony *S. aurantiacum*. Sc – sclerotia. ↑ – demonstrated nutrient medium surface; a – CBS 136049, b – CBS 116910, CBS 136047, c – CBS 136.046. Scale: a-c – 100 µm.

During «maturation» of the hyphal cells of aerial mycelium in all strains they produce thin-fibrillar matrix (Fig. 1, layer 1). The upper border of this layer was visible under light (Fig. 1 a-b), TEM (Fig. 2 d, arrows) and SEM (Fig. 4 g, arrow) microscopes. In the mature cultures of strain CBS 136.046 we did not find this border under TEM and the cells of aerial mycelium which produce lipophilic substance (Fig. 3 c, arrows).

The diameter of the mature hyphal cells of aerial and submerged mycelium in cultures of *S. aurantiacum* varied from 3,5 to 4,0 µm. The cells of aerial and submerged mycelium contain one ellipsoidal (Table 1) interphase nucleus (Fig. 2 a, h, 3 h, i) with regular (CBS 116910, CBS 136047, CBS 136049) or irregular (CBS 136.046) envelope. The cells of vegetative mycelium of the strain CBS 136.046 considerably differ from another one by the presence of large interphase nuclei (Table). The interphase nucleus situated in the central part of cells occupied all its lumen and contain moderate level of randomly distributed condensed chromatin. Nucleolus localized near nuclear envelope, is spherical (0,5 µm), and contain granular and fibrillar components, but the former was dominated (Fig. 3 h). The topography, number, sizes and level of chromatization of interphase nuclei in the cells of 4<sup>th</sup> analyzed strains on this and in another stages was similar.

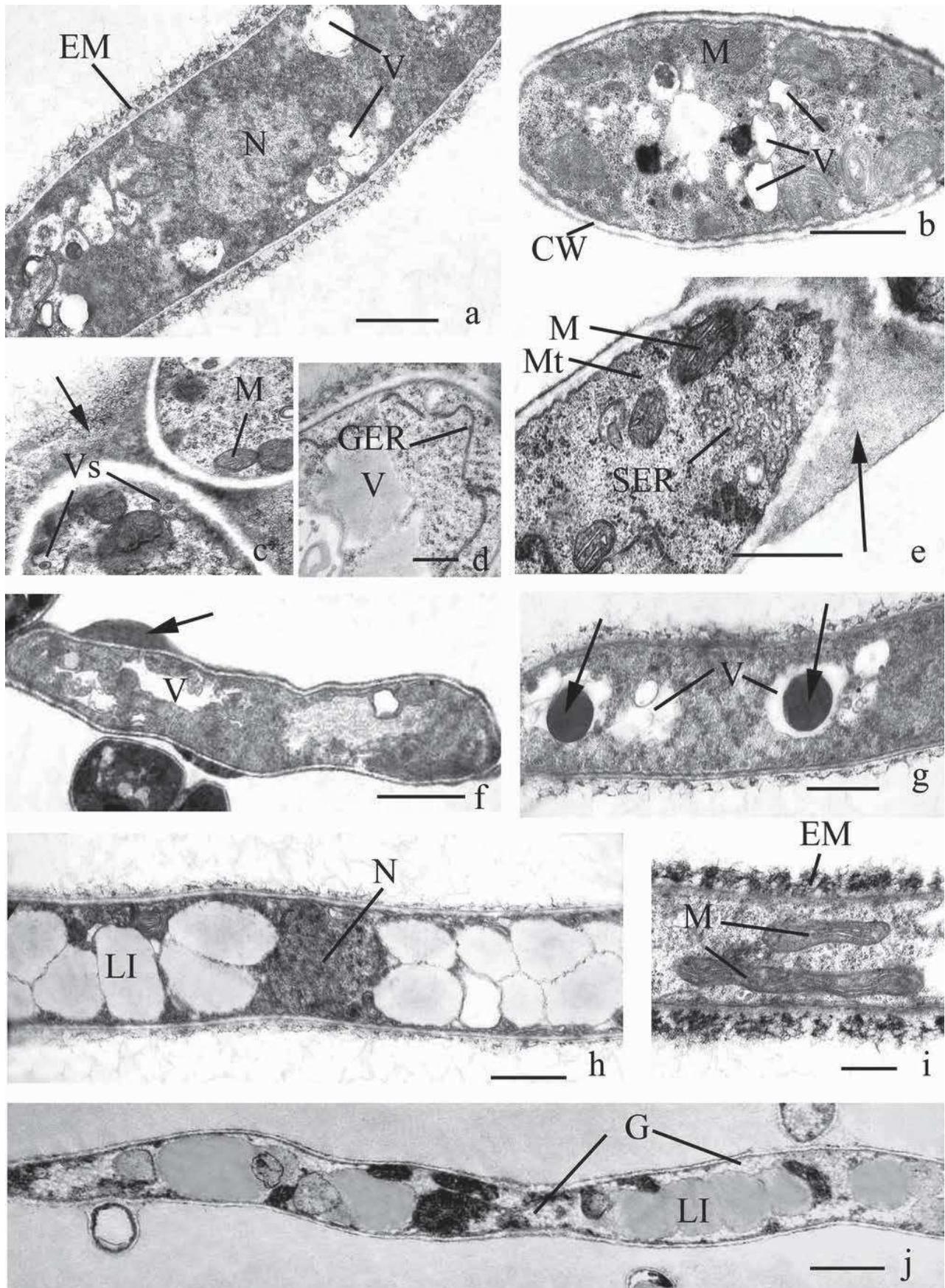


Fig. 2. Ultrastructure of the aerial (a, c, d, f-i) and submerged (b, j) cells of *S. aurantiacum*. a, d - CBS 117410, b, h - 136049, c, e, f, g, i - CBS 136.046, j - CBS 116910. Abbreviations used on this and another figures: C - conidium; CW - cell wall; G - glycogen; GER - granular endoplasmic reticulum; H - hypha(e); LI - lipid inclusion(s); Ls - lomasomes; M - mitochondrion(a); Mt - microtubule; N - nucleus; Nu - nucleolus; S - septum; SER - smooth endoplasmic reticulum; V - vacuole(s), Vs - vesicles. Scale: a, b, e, g, h - 1  $\mu$ m; c, d, i - 0,5  $\mu$ m, f, j - 4  $\mu$ m.

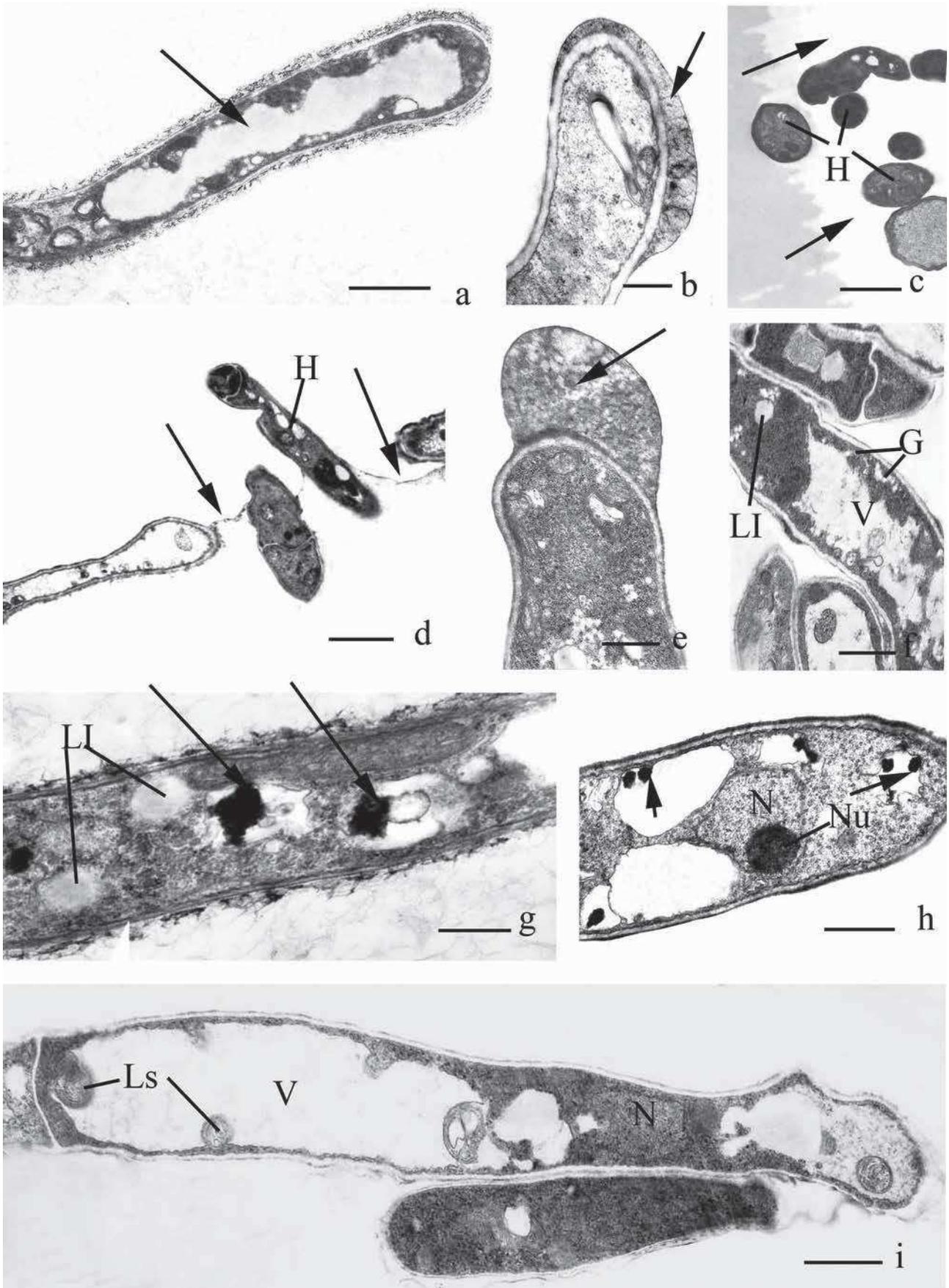


Fig. 3. Ultrastructure of the aerial (a-e, g) and submerged (f, h, i) cells of *S. aurantiacum*. ↑ - on c show extra-cellular matrix, on f - discrete dark external deposition, on g - protein globule in vacuole. a, b, e - CBS 136049, c, d, f, g, i - CBS 136.046, h - CBS 301.79. Scale: a, c, d - 3  $\mu$ m, b, e-h - 1  $\mu$ m, i - 2  $\mu$ m.

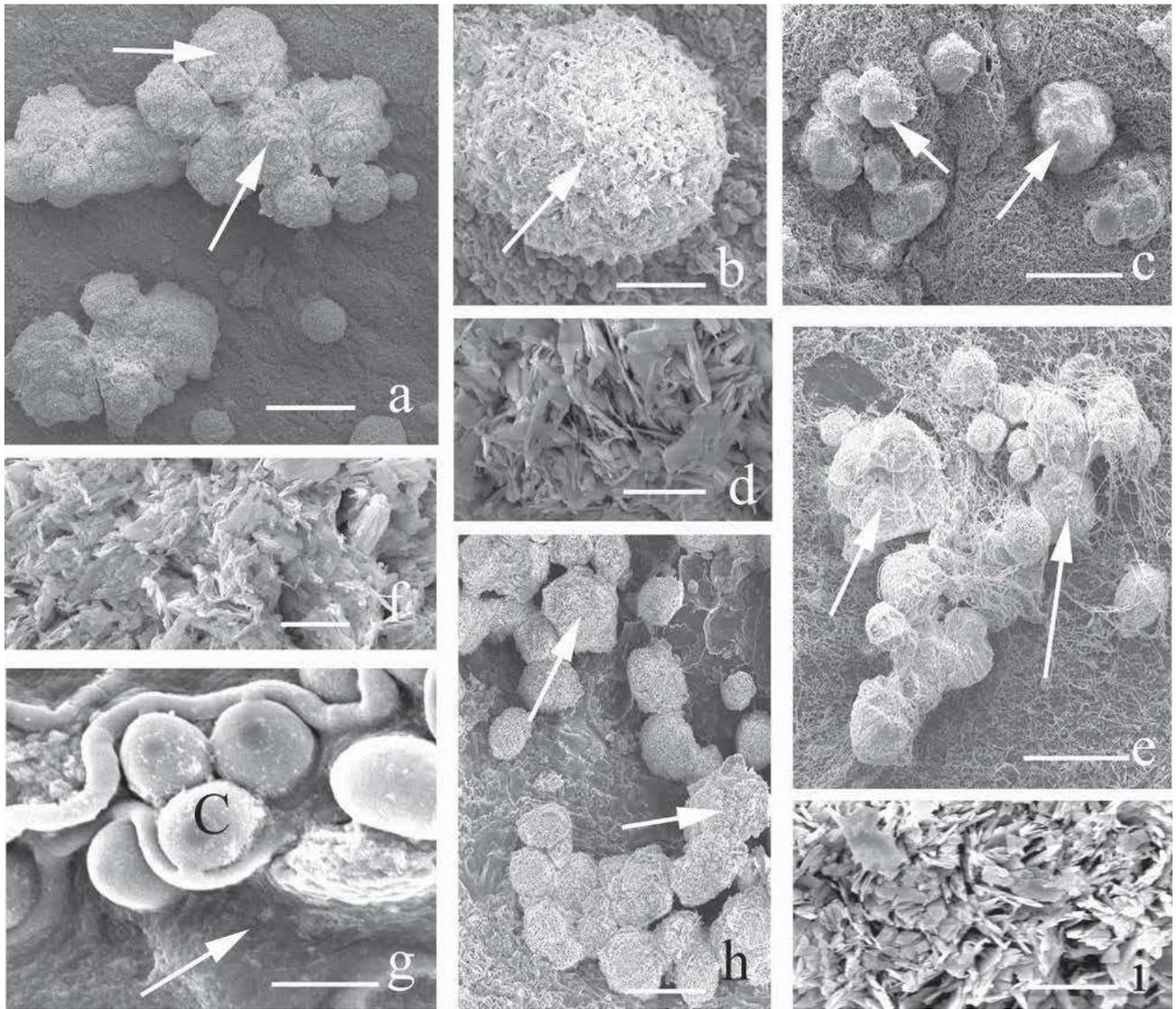


Fig. 4. Ultrastructure of the sclerotium in cultures of *S. aurantiacum*. ↑ - on a, b, c, h - demonstrated sclerotium, on g - the outer surfaces of the thin-fibrillar matrix. a, b - CBS 116910, c, d - CBS 136047, e, f - CBS 136049; g, h, i - CBS 136.046. Scale: a, c, e, h - 100 μm; b - 30 μm; d, f, i - 5 μm.

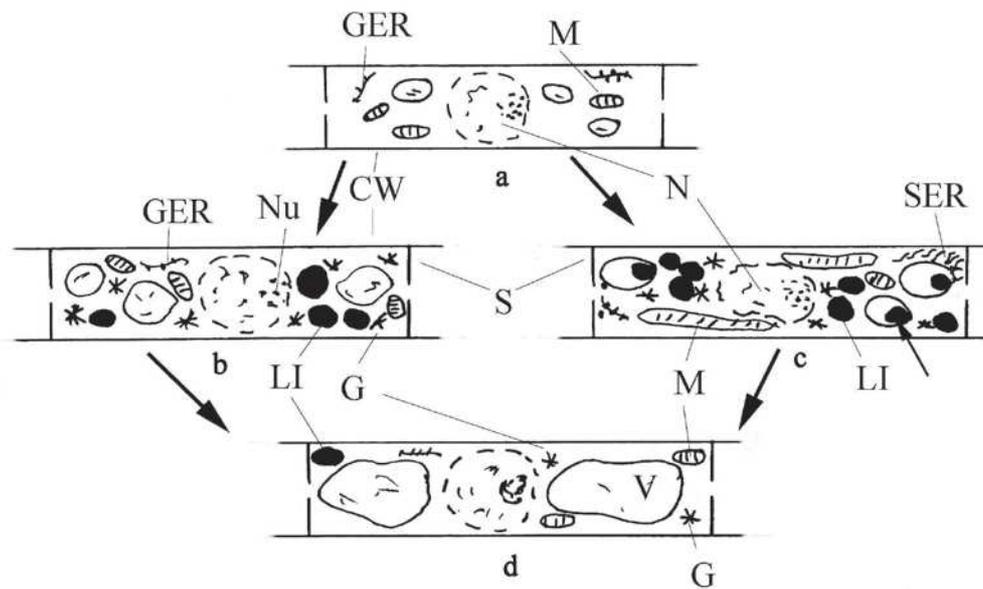


Fig. 5. Schematic drawing of *S. aurantiacum* young actively growing (a), mature (b, c) and in early stage senescence hyphal cells (d). a, b, d - CBS 116910, 136047, 136049; a, c, d - CBS 136046.

Table

The main cytological characteristics of in vitro growing *S. aurantiacum* strains

Strains (CBS)	The sizes of mature sclerotium, $\mu\text{m}$	The number of inter-phase nucleus, $\mu\text{m}$	Diameter of the inter-phase nucleus, $\mu\text{m}$	The level of chroma-tization	The contour of nuclear envelope	The presence of mitochondrial reticulum in aerial and submerged mycelium	The types of storage substances in mature cells	The presence of GER and SER	The presence of micro-bodies	The presence of extra-cellular lipophilic substance	The presence of extracellular slime and dark external substance
116910	100-120	1	1,78 x 1,42	Low	Regular	-/-	LI, $\alpha$	+/-	-	-	+/-
136047	80-110	1	1,80 x 1,6	Low	Regular	-/-	LI, $\alpha$	+/-	-	-	+/-
136049	90-100	1	1,70 x 1,4	Low	Regular	-/-	LI, $\alpha$	+/-	-	-	+/-
136.046	40 x 60 -70 x 80	1	2,5 x 2,0	Low	Irregular	+/+	LI, LIV, $\alpha$ , GV	++	+	+	+/+

**Notice:**  $\alpha$  – alpha glycogen; GER – granular endoplasmic reticulum; GV – protein granule in vacuole; LI – lipid inclusions in cytosole; LIV – lipophilic substances in vacuole; SER – smooth endoplasmic reticulum.

Under TEM the morphogenesis of the cells of aerial and submerged mycelium in all analyzed strains pass on three main stages: 1) growth, 2) maturation and 3) senescence. The 1<sup>st</sup> (Fig. 5 a) and 3<sup>rd</sup> (Fig. 5 d) stages in all strains pass regarding the one «scenario», but in 2<sup>nd</sup> stage the significant differences were found between the strain CBS 116910, 136047 136049 (Fig. 5 b) and CBS 136046 (Fig. 5 c).

In the young active growing cells of mycelium, vacuoles were uniformly localized in cytosol. They were a few in number, small in size and show the light content or filled thin-fibrillar material (Fig. 2 a). Mitochondria as a rule situated near lateral cell wall (Fig. 2 a-e). The number on median section of cell varied from 5 to 8. They were single or in small groups, spherical (0,4-0,5  $\mu\text{m}$ ) or ellipsoidal (0,5 x 0,6  $\mu\text{m}$ ) in form. They have more electron dense matrix in comparison with the cytosol.

The growing hyphal cells differ according the type of endoplasmic reticulum (ER, Table). The long slightly curved cisterns of rough ER (Fig. 2 d) were found in the hyphal cells of all studied strains. The aggregations of the curved and tightly oriented tubular smooth ER were detected in the cells of aerial mycelium in only one strain (CBS 136.046, fig. 2 e). They formed the large (0,8-12,0  $\mu\text{m}$ ) single irregular in form aggregations near cell wall (Fig. 2 e). Small number (from 3 to 7 on median cell section) of single (Fig. 2 c) secretory vesicles (60-70 nm) with thin-fibrillar content was distributed near cell wall. We found such types of vesicles in the hyphal cells of aerial mycelium in cultures of all investigated strains. In the hyphal cells of *S. apiospermum* [8] we also observed secretory vesicles with the same morphology. Only in the content of cells of aerial mycelium of one strain (CBS 136.046) we find large (90-110 nm) vesicles (Fig. 2 c) with more dark tightly oriented microfibrills. We did not find the possible sources of secretory vesicles – single Golgi cisterns, in the cells of mycelium of all investigated strains. For comparison, we observed the rare single horseshoe-shaped Golgi cisterns in the in vitro growing cells of *S. apiospermum* [8].

In the cytosol of investigated hyphal cells we did not find microbodies (Table). Contrary, in the hyphal cells of in vitro growing *S. apiospermum* [8] we observed them. Several single short straight microtubules were found deep in the cytosol (Fig. 2 e). Cytosol had moderate electron density and posses with numerous free ribosomes.

Plasma membrane was three-layered, closely contact with the cell wall. The cell wall was thin (0,05  $\mu\text{m}$ , Fig. 2 b) and two-layered. For the cell walls of submerged hyphae were typical the presence the outer dark so-called «extracellular matrix» (Fig. 2 a, i), which consisted of tightly localized dark microfibrills. The thickness of extracellular matrix

was identical in all investigated strains cells and in 6 times thicker than the cell walls [7]. On the surfaces of living and senescent cells of aerial hyphal cells of all studied strains we found the discrete accumulations of thin-fibrillar slime (Fig. 2 c, e, 3 b, e, arrows). Another type of external fungal metabolite, which is typical for cells of aerial mycelium, was the discrete dark small practically homogenous deposition (Fig. 2 f, arrow). Very often the large amount of external slime and dark substances was also found between adjacent cells. In a whole, the amount of slime was predominated. Slime was also found on the surfaces of hyphal cells of aerial mycelium in *S. apiospermum* [8]. For this species the dark external substances was not typical. We suppose that in analyzed strains colonies *S. aurantiacum* the secretory vesicles with thin-fibrillar content participate in synthesis and secretion of external slime and the same with more dark content – the external dark substances.

During the maturation of the hyphal cells of *S. aurantiacum* the synthesis of storage substances (lipid inclusions, rosettes of  $\alpha$ -glycogen, protein globules and lipophilic substances in vacuoles, Table, Fig. 5 b, c) were start. Lipid inclusions uniformly distributed in the hyphal cell cytosol and variable in size (0,4-0,7  $\mu\text{m}$ , Fig. 2 h, j, 3 g) and with median electron density. Initially in some cells the synthesis of lipid inclusions (Fig. 2 h) was start, but in another – lipid inclusions and rosettes of  $\alpha$ -glycogen (Fig. 2 j). As a rule, in last type of mature cells lipid inclusions oriented in its central part and closely one to another. They were large sizes (1,0-1,6 x 0,5-0,8  $\mu\text{m}$ ) and surrounded with aggregation of light rosettes of  $\alpha$ -glycogen. The light color of last, perhaps, may be result of its elution during sample preparation. Only in vacuolar content of the mature hyphal cells of strain (CBS 136.046) we found the large (0,8-1,0  $\mu\text{m}$ ) dark protein globule in vacuolar content (Fig. 2 g, arrows, 5 c, arrow) which localized near tonoplast and lipophilic substances (Fig. 3 g). In mature cells of vegetative mycelium of all analyzed strains in depending from its type (aerial, submerged) the amount of storage substances were identical.

In all analyzed strains cultures the number of mitochondria were increased (before 11-18 on median section) during the growth of the cells of aerial and submerged mycelium. They were polymorphic (0,2-0,4  $\mu\text{m}$ ), straight or slightly curved and situated in near cell wall and in the space between the nucleus and cell wall. Only on serial sections of aerial and submerged cells of mycelium of the strain CBS 136.046 we revealed long (3,0-4,0  $\mu\text{m}$ ) profiles of the one giant organelle, so called «mitochondrial reticulum» (Fig. 2 i, Table). In *S. apiospermum* [8] giant mitochondrion was developed also in all cells of mycelium of the two compared strains.

The cells of aerial mycelium in mature cultures (strain CBS 136.046), contrary with submerged, produced the third type of secondary lipophilic substance metabolite – homogenous median electron density external (outside the cell walls) and often in extracellular space (Fig. 3 c, arrows). It was interesting that in vacuolar content of mature aerial hyphae (Fig. 3 a) we also found this lipophilic substance. Previously we found the same type of external metabolite in the mature cultures of 2-wo strains of *S. apiospermum* [8]. But in mature cultures of last species this layer external occupied the lower part of aerial mycelium and so that not visible under SEM. Also we observed in the cells of aerial mycelium of this strains special type of tubular smooth endoplasmic reticulum which in our opinion may participate in the synthesis of lipophilic substances. Previously we suppose that in *S. apiospermum* [8] this lipophilic substance contain pigment, which presence of in extracellular space of aerial mycelium determinate its yellow color [8].

In the final stage of hyphal cells morphogenesis – senescence, large central vacuole was developed (Fig. 3 i, 5 d). The volume of cytosol, the amount of the storage substances and cell organelles significantly decrease (Fig. 3 f, i, 5 d). The volume of the protein globules (Fig. 3 g, h, arrows) and lipophilic substances in vacuoles gradually decreased and they finally disappeared. Numerous lomasomes (Fig. 3 i) were present near cell wall. In the whole, process of senescence pass according the way, which was described for another species of filamentous fungi [9-10; Stepanova A.A., Vasilyev A.E., 1994], including *S. apiospermum* [8].

Under the light (Fig. 1 c) and SEM (Fig. 4 a-i) microscopes in the surfaces of central mature parts of 20 days cultures of all investigated *S. aurantiacum* strains we found the single small or variable in sizes clusters of bodies (Fig. 4 e, h, arrows). In cultures of the strains CBS 116910, CBS 136047 and CBS 136049 they were spherical in size (100-135 µm, Fig. 4 a-f, Table). The specific peculiarities of these bodies in culture of strain CBS 136047 was the presence in its apical part spherical flat smooth areas (Fig. 4 c, arrows). In culture of strain CBS 136.046 such type of bodies ellipsoidal in form (Fig. 4 h) and smaller in sizes (40-60 x 70-80 µm). For wall surfaces of this morphological formation was typical uniformly good pronounced external crystalline texture (Fig. 4 b, d, f, i) and epidermoidea type of surfaces, which were typical for *Pseudallescheria* [2]. Only in strain CBS 136049 this bodies were covered with rare randomly distributed hyphae, which typical for ascomata of *Pseudallescheria* species [2]. The teleomorph stage for *S. aurantiacum* was unknown [2]. According the morphological characteristics it may be sclerotia. For comparison, in previously studied strains cultures of type species from genus *Scedosporium* – *S. apiospermum* we did not find the similar morphological formations [8].

Comparative analyses of the peculiarities of the morphogenesis of analyzed *S. aurantiacum* strains show significant differences between the strain CBS 136.046 and remains ones. Differences in the amount of formed conidia under light microscope were revealed – more numerous conidia we observed in the 20-days cultures of strains CBS 136049 and CBS 136.046.

The cells of the vegetative mycelium in cultures of all investigated strains contain one interphase nuclei with lower level of condensed chromatin, what was typical for

previously investigated strains *S. apiospermum* [7]. For the hyphal cells of strain CBS 136.046, in contrast to another one, was typical presence the large interphase nucleus with irregular outer envelope. For growing hyphal cells of this strain also were typical presence of the mitochondrial reticulum which demonstrated the evidence of its higher level of functional activity in comparison of another studied strains. The mature cells in cultures of strain CBS 136.046 accumulated not only lipid inclusions and α-glycogen, as other ones, but also large protein granule and lipophilic substances in vacuolar content. This data indicate about the differences in their physiology during growth on the same medium. The specific ultrastructural feature of the cells of this strain was the absence of microbodies and presence of the tubular smooth endoplasmic reticulum, which presence demonstrated the ability of this strain to synthesize the external lipophilic substances by the cells of aerial part of mycelium, what was also typical for growing in vitro *S. apiospermum* strains [8].

All cells of aerial mycelium of investigated strains synthesized and secreted the external secondary metabolites – slime and only hyphal cells of strain CBS 136.046 – discrete dark small droplets and homogenous median electron density lipophilic substance. It was interesting, that according the date Frisvad J.C. and Nielsen K.F. [11] strains of the *S. aurantiacum*, which we investigated in present work, divided on two groups according its possibility to produce the secondary metabolites: 1) CBS 116910, CBS 136046 and 2) CBS 136047, CBS 136049. As decided this authors, this distinction demonstrated its functional (physiological) relationship, rather than a taxonomical. Contrary, previously discovered differences in the ultrastructure of conidial sporoderm and septal pore apparatus between, at first time, *S. apiospermum* and *S. auratiacum*, and, at second time, different strains of last species [7] correlated with ultra-structural distinction in its hyphal cells in vitro morphogenesis [*S. apiospermum*: 8; *S. aurantiacum*: data of the present work]. For the first time we observed in the colony of investigated strains *S. auratiacum* presence of sclerotia, what significantly distinguished this species from type species – *S. apiospermum* for which typical only large cleistothecia, but sclerotia – not [2]. From the members of the genus *Scedosporium* sclerotia were described for *S. boydii* [2]. For the strain CBS 136.046, contrary with another one, was typical ellipsoidal sclerotia. According the data of several authors [12; Chang P.-K., Bennett J. W., Cotty P.J., 2001] in filamentous fungi were present the correlation between the secondary metabolism and production of sclerotia. The opinion of Calvo A.M. and Cary J. W. [12] that «they represent the principal source of primary inoculum for some phytopathogenic fungi» actually also for investigated in present work human pathogenic fungus and give them additional «card blanche» in confrontation with environmental condition, perhaps including the host tissues.

There were few studies on differences in pattern of morphogenesis between the strains of one filamentous fungal species in vitro [8]. We found that the main pattern of morphogenesis of three analyzed *S. aurantiacum* strains (CBS 116910, CBS 136047, CBS 136049) were identical. They were common also according to mature conidia sporoderm and septal pore apparatus ultrastructure [7]. These strains differ concordant the volume of accumulated external slime in layer 1: the cells of strains culture CBS

136049 was more active.

For comparison the similarity in ultrastructural aspects of the morphogenesis was typical for two strains previously investigated another species from the genus *Scedosporium* – *S. apiospermum* [8]. In last cases differences only in the area of sporulation and level of accumulated lipophilic substances were revealed what demonstrated the mediate influence of the secondary metabolites on the level of sporulation and inter strains differences.

Thus, the investigated *S. aurantiacum* strain CBS 136.046 significantly differ in comparison with the another one according the presence of ellipsoidal sclerotia, differences

in size and contour of nuclear envelope, presence of mitochondrial reticulum, diversity of accumulated storage substances and secreted secondary metabolites. Before we revealed considerable differences of the strain CBS 136.046 from another investigated in respect to sporoderm and septal pore apparatus ultrastructure [7]. Presented data, for the first time, demonstrated importance of TEM morphogenetic data for the hyphal cell ultrastructure for taxonomical investigations.

## ACKNOWLEDGEMENT

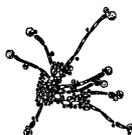
We are sincerely thanks to Prof. G. Sybren de Hoog for providing the *Scedosporium auraticum* cultures.

## REFERENCES

1. Kaltseis J., Rainer J., De Hoog G.S. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med. Mycol.* 2009; 47: 398-405.
2. Hoog, G.S. de, et al. Atlas of clinical fungi (a recent electronic version 3.1, 2011).
3. Kaur J., Duan S.Y., Vaas L.A.I, et al. Phenotypic profiling of *Scedosporium aurantiacum*, an opportunistic pathogen colonizing human lungs. *PLOS One.* 2015; 10 (3).
4. Heath C.H., Slavin M.A., Sorrell T.C., et al. Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: epidemiology, disease manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; 15: 689-693.
5. Cortez K.J., Roilides E., Quiroz-Telles F, et al. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21: 157-197.
6. Kim S.-H., Ha Y.E., Youn J.-C., et al. Fatal scedosporiosis in multiple solid organ allografts transmitted from a nearly-drowned donor. *Am. J. of Transpl.* 2015;15 (3): 833-840.
7. Stepanova A.A., de Hoog G.S., Vasilyeva N.V. Intra- and interspecific diversity of ultrastructural markers in *Scedosporium*. *Fungal Biol.* 2016; 120: 147-154.
8. Stepanova A.A., de Hoog G.S., Vasilyeva N.V. Cytological study of the in vitro growing *Scedosporium apiospermum* cells of vegetative mycelium. *Problems in medical mycology.* 2017; 19 (1): 24-30.
9. Степанова А.А., Сеницкая И.А. Ультраструктурные аспекты старения клеток некоторых видов рода *Aspergillus*. *Проблемы медицинской микологии.* 2009; 11 (4): 24-29. [Stepanova A.A., Sinitzkaya I.A. Ultrastrukturnye aspekty stareniya kletok nekotoryih vidov roda *Aspergillus*. *Problemy meditsinskoj mikologii.* 2009; 11 (4): 24-29 (In Russ)].
10. Савицкая Т.И., Степанова А.А., Сеницкая И.А., Краснова Е.В. Ультраструктурные аспекты старения клеток вегетативного мицелия некоторых видов рода *Trichophyton*. *Проблемы медицинской микологии.* 2011; 13 (2): 106. [Savitskaya T.I., Stepanova A.A., Sinitzkaya I.A., Krasnova E.V. Ultrastrukturnye aspekty stareniya kletok vegetativnogo mitseliya nekotoryih vidov roda *Trichophyton*. *Problemy meditsinskoj mikologii.* 2011; 13 (2): 106 (In Russ)].
11. Frisvad J.C., Nielsen K.F. Can metabolites add significant taxonomic data in *Scedosporium*? *Abstr. Meeting of the ISHAM Working Groups on Barcoding and Scedosporium.* The Netherlands, Utrecht, 2014: 17.
12. Calvo A.M., Cary J.W. Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. *Front. Microbiol.*, 2015.

Поступила в редакцию журнала: 16.10.2017

Рецензент: В.Г. Корнишева



## НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO КОКЦИДИОИДОМИКОЗА И ГИСТОПЛАЗМОЗА: РАЗРАБОТКА, ИСПЫТАНИЕ, ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ

**Прохватилова Е.В. (доцент, зав. отделом)\*, Новицкая И.В. (доцент, зав. отделом), Кулаков М.Я. (с.н.с.), Савина Е.В. (н.с.), Пушкар В.Г. (с.н.с.), Белицкая Л.И. (н.с.), Плеханова Н.Г. (зав. лаб.), Викторов Д.В. (доцент, зам. директора по научно-экспериментальной работе), Топорков А.В. (директор института)**

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

©Коллектив авторов, 2017

Разработан набор реагентов для клинической диагностики *in vitro* кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза с помощью реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), проведены испытания, завершены этапы экспертизы и регистрации в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения как медицинских изделий. Оценена эффективность применения набора реагентов для обнаружения антигенов возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза в биологическом (клиническом) материале и выделенных культурах микромицетов методом РНГА. Критериями диагностической ценности набора реагентов являлись показатели чувствительности, специфичности (аналитической и диагностической). При проведении клинических испытаний установлено, что показатель диагностической чувствительности набора реагентов для выявления возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза методом РНГА составил не менее 99%, диагностической специфичности – не менее 98%, с достоверной вероятностью 90% при анализе каждого из показателей.

**Ключевые слова:** кокцидиоидомикоз, гистоплазмоз, иммунологические методы, набор реагентов, реакция непрямой гемагглютинации

## REAGENT KIT FOR IN VITRO DIAGNOSTIC OF COCCIDIOIDOMYCOSIS AND HISTOPLASMOSIS: DEVELOPMENT, TESTING, STATE REGISTRATION, THE USE OF LABORATORY PRACTICE

**Prokhvatilova E.V. (associate professor, head of the department), Novitskaya I.V. (associate professor, head of the department), Kulakov M.Ya. (senior scientific collaborator), Savina E.V. (scientific collaborator), Pushkar V.G. (senior scientific collaborator), Belitskaya L.I. (scientific collaborator), Plekhanova N.G. (head of the laboratory),**

\* Контактное лицо: Прохватилова Елена Валерьевна, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru

**Viktorov D.V. (associate professor, deputy director of scientific and experimental programs), Toporkov A.V. (director of the institute)**

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia

©Collective of authors, 2017

The reagent kit for the clinical *in vitro* diagnostics of *coccidioidomycosis* and *histoplasmosis* using the reaction of indirect hemagglutination (IHA) has been constructed, tested and registered in the Federal Service for Supervision in the sphere of health care as a medical devices. The effectiveness of application of the reagent kit for the detection of antigens of *coccidioidomycosis* and *histoplasmosis* agents in a biological (clinical) material and isolated cultures of micromycetes by the reaction of indirect hemagglutination have been evaluated. The criteria of the diagnostic value of the reagent kits were the sensitivity and specificity (analytical and diagnostic). When conducting clinical tests it has been determined that the rate of diagnostic sensitivity of the reagent kit for the detection of *coccidioidomycosis* and *histoplasmosis* agents by the reaction of indirect hemagglutination is not less than 99%, the diagnostic specificity – not less than 98%, with a confidence level of 90% in the analysis of each of the indicators.

**Key words:** *coccidioidomycosis*, *histoplasmosis*, immunological methods, reaction of indirect hemagglutination, reagents kit

## ВВЕДЕНИЕ

Кокцидиоидомикоз и гистоплазмоз относят к особо опасным (глубоким) микозам, мало известным работникам здравоохранения нашей страны, поскольку достоверных случаев заболеваний, вызываемых данными возбудителями, в Российской Федерации не зарегистрировано. Эндемичными регионами данных микотических инфекций являются страны Северной, Южной, Центральной Америки, Юго-Восточной Азии и Африки, где инфицированность населения очень высокая [1]. Наибольшему риску инфицирования и развития различных форм гистоплазмоза и кокцидиоидомикоза подвержены лица, посещавшие эндемичные регионы, а также ВИЧ-инфицированные больные, пациенты, перенесшие операции по трансплантации органов, проходящие иммуносупрессивную терапию и другие иммунокомпрометированные лица [1-3].

Учитывая интенсивное развитие туристических, миграционных, торговых, транспортных связей между странами, весьма вероятно возможность завоза кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза на территорию Российской Федерации [2]. В связи с этим, с целью обеспечения готовности медицинских учреждений к проведению исследований по лабораторной диагностике особо опасных микозов необходимо внедрение в практику здравоохранения новых эффективных диагностических средств для обнаружения данных возбудителей [4].

Возбудители кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза – это диморфные грибы родов *Coccidioides* spp., *Histoplasma* spp. II группы патогенности (опасности). Общим для них является то, что они вызывают инфекции, относящиеся к категории «респираторных», т.е. основной путь инфицирования – аэрогенный [1, 2]. В настоящее время грибы рода *Coccidioides* разделены на два вида – *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* и включены в перечень потенциальных агентов биотерроризма в связи с высокой опасностью ингаляторного заражения человека артроспорами гриба, высокой устойчивостью артроконидий *Coccidioides* к факторам окружающей среды, сложностью терапии, диагностики и отсутствием средств специфической профилактики кокцидиоидомикоза [Онищенко Г.Г. и др. Лаборатор-

ная диагностика опасных инфекционных болезней. М., 2013]. Род *Histoplasma* включает 3 варианта: *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*, отличающиеся преимущественно по географическому распространению и молекулярно-генетическим характеристикам возбудителя [1, 2].

При культивировании возбудители кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза в условиях роста на стандартных питательных средах (Сабуро, Чапека) развиваются в виде мицелиальной формы, а в организме человека и некоторых животных гриб конвертирует в тканевую форму, представленную сферами *Coccidioides* sp. или дрожжеподобными клетками *Histoplasma* sp. [1, 2, 5, 6]. Реализация патогенных свойств диморфных грибов связана, прежде всего, с возможностью существовать внутри макроорганизма в виде паразитической (тканевой) формы [1, 5, 6]. Организм человека не обладает естественным иммунитетом к данным микромицетам, поэтому восприимчивость человека к ним считают всеобщей. Клиническая картина гистоплазмоза и кокцидиоидомикоза имеет схожий между собой комплекс симптомов и синдромов, как правило, неспецифичный. Спектр клинических проявлений кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза широко варьирует от бессимптомной инфекции до форм заболеваний с первичным поражением дыхательной системы, а при диссеминированной форме – с вовлечением в инфекционный процесс разнообразных органов и систем и формированием очагов инфекции, что, в значительной мере, затрудняет их клиническую и дифференциальную диагностику [1].

В соответствии с Международной статистической классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем, 2003 г. (МКБ-10), кокцидиоидомикоз отнесен к разделу В38, который включает нозологические формы легочного микоза (острый, хронический), диссеминированную, а также кожную и менингеальную. В отличие от кокцидиоидомикоза, гистоплазмоз помещен в отдельный раздел В39 (острая, хроническая легочная инфекция, диссеминированный гистоплазмоз, гистоплазмоз неуточненный, ВИЧ-ассоциированные инфекции и др.).

В Российской Федерации для осуществления эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями, в перечень которых входят гистоплазмоз и кокцидиоидомикоз, действует приказ Роспотребнадзора №88 от 17.03.2008 г. «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней». В соответствии с данным приказом были созданы национальные, региональные и референс-центры по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней с функциями и деятельностью, определенными требованиями международного медико-санитарных правил 2005 года. На базе ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора» функционирует референс-центр по мониторингу за возбудителями глубоких микозов (далее – референс-центр), который оказывает научную, консультативно-методическую и практическую помощь учреждениям Роспотребнадзора и медицинским организациям.

Совершенствование методов диагностики особо опасных (глубоких) микозов является одним из важ-

ных направлений деятельности референс-центра, в задачи которого входит проведение научно-исследовательских работ по изучению структуры и биологических свойств микромицетов и разработке диагностических и индикационных наборов реагентов, обеспечивающих с высокой чувствительностью и специфичностью выявление возбудителей особо опасных микозов [2].

Цель настоящего исследования – разработка, испытание и внедрение в практику клинических лабораторий новых наборов реагентов для диагностики гистоплазмоза и кокцидиоидомикоза с помощью РНГА.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали «Набор реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой». В состав медицинского изделия (МИ) входят следующие компоненты:

1. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой 10% – 5 ампул.
2. Взвесь инактивированной культуры возбудителя кокцидиоидомикоза  $1 \cdot 10^9$  кл/мл – 1 ампула.
3. Эритроциты барана формализированные 50% – 2 ампулы.
4. Сыворотка кокцидиоидомикозная агглютинирующая козья сухая 1:10 – 1 ампула.
5. Сыворотка нормальная кроличья сухая – 1 ампула.

Область применения МИ – клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический мониторинг. «Набор реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» (далее – «диагностикум») предназначен для обнаружения антигенов возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза в биологическом материале и выделенных культурах микромицетов методом РНГА.

Исследуемые культуры получали из лаборатории коллекционных штаммов микроорганизмов ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора».

Для постановки РНГА с диагностикумом использовали: 26 штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза *Coccidioides* sp. (8 штаммов *C. posadasii* и 18 штаммов *C. immitis*), 18 штаммов *H. capsulatum*, 4 штамма *H. capsulatum* var. *duboisii*, 1 штамм *H. capsulatum* var. *farciminosum*, 5 штаммов *H. capsulatum* в дрожжевой фазе роста, 5 штаммов дрожжеподобных грибов (*Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans* 4N, *Cryptococcus neoformans* 9/22, *Rhodotorula mucilaginosa*), 17 штаммов плесневых грибов и дерматомицетов III-IV групп патогенности (*Absidia (Mycocladius) hyalospora*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium sambucinum*, *Gibberella zeae*, *Geotrichum candidum*, *Malbranchea manginii*, *Paecilomyces variottii*, *Penicillium citreoviridae*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Phialophora verrucosa*, *Rhizopus microsporus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichophyton crateriforme*), 1 штамм *Brucella suis*, 2 штамма *Yersinia* sp. (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*), 2 штамма *Burkholderia pseudomallei*, 2 штамма *Burkholderia mallei*.

При исследовании культур методом РНГА обеззараженные взвеси возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза разводили с помощью 0,9% стерильного раствора натрия хлорида, рН (7,2±0,2) до концентрации 1·10<sup>8</sup> кл/мл, взвеси гетерологичных микроорганизмов – до 4·10<sup>8</sup> кл/мл (в соответствии с отраслевым стандартом мутности ОСО 42-28-85 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), а затем применяли для постановки РНГА.

Имитацию проб клинического материала (сыворотки крови, мокроты, промывных вод бронхов), а также биологического материала (суспензии органов: легкие, печень и селезенка) мелких млекопитающих осуществляли путем их контаминирования суспензиями *C. immitis*, *C. posadasii*, *H. capsulatum* и гетерологичными микроорганизмами (*Penicillium citreoviridae*, *Burkholderia mallei*) с концентрацией 3,12·10<sup>6</sup> кл/мл и 5·10<sup>7</sup> кл/мл соответственно.

#### Подготовка проб клинического и биологического материала.

**Пробы сыворотки крови человека** отбирали по 0,9 мл в 7 центрифужных пробирок, в каждую из которых добавляли 0,1 мл клеточной суспензии *C. posadasii* 36 S с концентрацией 3,12·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл суспензии *C. immitis* 158 с концентрацией 3,12·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл бактериальной суспензии *H. capsulatum* 6650 в дрожжевой фазе с концентрацией 3,12·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл клеточной суспензии *C. posadasii* 36 S с концентрацией 6,25·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл суспензии *C. immitis* 158 с концентрацией 6,25·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл бактериальной суспензии *H. capsulatum* 6650 в дрожжевой фазе с концентрацией 6,25·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл суспензии *P. citreoviridae* 51 с концентрацией 5·10<sup>8</sup> кл/мл соответственно. В подготовленные пробы добавляли мертиолят натрия до конечной концентрации 1:10000 (10 мкл 1%-го раствора мертиолята натрия на 1 мл сыворотки) и прогревали на водяной бане при 56 °С в течение 30 мин. Затем пробы сывороток адсорбировали добавлением 50%-ной взвеси формализированных эритроцитов барана (0,1 мл взвеси эритроцитов на 1 мл сыворотки крови) с инкубацией в течение 30 мин при температуре (37±1) °С. Эритроциты осаждали центрифугированием в режиме 2500-3000 об/мин – 5 мин. Полученную инактивированную и адсорбированную сыворотку разводили 1:5 с помощью 0,15 М раствора хлорида натрия (к 1,0 мл сыворотки добавляли 4 мл 0,15 М раствора хлорида натрия), после чего исследовали в РНГА.

**Пробы мокроты.** Мокроту забирали в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые градуированные стерильные пробирки с широким горлом и завинчивающимися крышками объемом 50 мл. Для разжижения мокроты применяли раствор «Муколизин» (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,0774 моль, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0226 моль, бета-МЭ 0,094 моль, 5% азид натрия в конечной концентрации 0,05%). Пробу смешивали с пятикратным объемом раствора «Муколизин» (ООО «ИнтерЛабСервис»). Пробы перемешивали покачиванием в течение 20-30 сек и инкубировали в течение 20-30 мин, периодически встряхивая. Затем отбирали по 0,9 мл разжиженной мокроты и помещали в 7 центрифужных пробирок, в каждую из которых добавляли 0,1 мл клеточной суспензии *C. posadasii* 36 S с концентрацией 3,12·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл суспензии *C. immitis* 158 с концентрацией 3,12·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл бактериальной суспензии *H. capsulatum*

6650 в дрожжевой фазе с концентрацией 3,12·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл клеточной суспензии *C. posadasii* 36 S с концентрацией 6,25·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл суспензии *C. immitis* 158 с концентрацией 6,25·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл бактериальной суспензии *H. capsulatum* 6650 в дрожжевой фазе с концентрацией 6,25·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл суспензии *P. citreoviridae* 51 с концентрацией 5·10<sup>8</sup> кл/мл соответственно. Пробы центрифугировали при 2500 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в 100 мкл 0,15 М раствора натрия хлорида и исследовали в РНГА.

**Пробы промывных вод бронхов.** Полученные при бронхоскопии пробы лаважной жидкости переносили по 0,9 мл в 7 центрифужных пробирок, в каждую из которых добавляли 0,1 мл клеточной суспензии *C. posadasii* 36 S с концентрацией 3,12·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл суспензии *C. immitis* 158 с концентрацией 3,12·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл бактериальной суспензии *H. capsulatum* 6650 в дрожжевой фазе с концентрацией 3,12·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл клеточной суспензии *C. posadasii* 36 S с концентрацией 6,25·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл суспензии *C. immitis* 158 с концентрацией 6,25·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл бактериальной суспензии *H. capsulatum* 6650 в дрожжевой фазе с концентрацией 6,25·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл суспензии *P. citreoviridae* 51 с концентрацией 5·10<sup>8</sup> кл/мл соответственно. Пробы центрифугировали при 2500 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в 100 мкл 0,15 М раствора натрия хлорида и исследовали в РНГА.

**Суспензии органов.** Кусочки печени и селезенки общей массой 1-2 г помещали в 3 стерильные ступки, растирали и добавляли 0,15 М раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (вес/объем). Надосадочную жидкость отбирали по 0,9 мл с помощью пипетки через ватный тампон в 7 центрифужных пробирок, в каждую из которых добавляли 0,1 мл клеточной суспензии *C. posadasii* 36 S с концентрацией 3,12·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл суспензии *C. immitis* 158 с концентрацией 3,12·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл бактериальной суспензии *H. capsulatum* 6650 в дрожжевой фазе с концентрацией 3,12·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл клеточной суспензии *C. posadasii* 36 S с концентрацией 6,25·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл суспензии *C. immitis* 158 с концентрацией 6,25·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл бактериальной суспензии *H. capsulatum* 6650 в дрожжевой фазе с концентрацией 6,25·10<sup>7</sup> кл/мл, 0,1 мл суспензии *P. citreoviridae* 51 с концентрацией 5·10<sup>8</sup> кл/мл соответственно. Для исследования пробы дополнительно разводили 0,15 М раствором натрия хлорида с 4% формалина из соотношения 1:50 с последующей экспозицией в течение 24 ч при комнатной температуре или в течение 2 ч при (37±1) °С. После обеззараживания пробы адсорбировали добавлением 50% взвеси формализированных эритроцитов из расчета 0,1 мл на 1 мл пробы, инкубировали смесь 30 мин при (37±1) °С или 1-2 ч при (22±2) °С. Эритроциты осаждали центрифугированием в режиме 2500-3000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость исследовали в РНГА.

В РНГА также исследовали образцы сывороток, суспензии органов (легкие, печень, селезенка) лабораторных животных, используемых в качестве биомоделей экспериментального кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза. Заражение белых мышей линии BALB/c осуществляли клетками возбудителей особо опасных микозов в доз(ах) 5(10) LD50.

#### Подготовка проб зараженных экспериментально животных.

**Пробы сыворотки крови.** Сыворотку крови после образования сгустка отбирали пастеровской пипеткой в отдельную пробирку, консервировали добавлением мертиолята натрия в конечной концентрации 1:10000 (10 мкл 1%-ного раствора мертиолята натрия на 1 мл сыворотки) и прогревали на водяной бане при 56 °С в течение 30 мин. Затем пробы сывороток адсорбировали добавлением 50%-ной взвеси формализированных эритроцитов барана (0,1 мл взвеси эритроцитов на 1 мл сыворотки крови) с инкубацией в течение 30 мин при температуре (37±1) °С. Эритроциты осаждали центрифугированием в режиме 2500-3000 об/мин – 5 мин. Полученную инактивированную и адсорбированную сыворотку разводили 1:5 с помощью 0,15 М раствора хлорида натрия (к 1,0 мл сыворотки добавляли 4 мл 0,15 М раствора хлорида натрия), после чего исследовали в РНГА.

**Суспензии органов от зараженных экспериментально животных.** Кусочки печени и селезенки общей массой 1-2 г помещали в 3 стерильные ступки, растирали и добавляли 0,15 М раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (вес/объем). Надосадочную жидкость отбирали через ватный тампон в отдельные пробирки по 0,9 мл.

Для исследования пробы дополнительно разводили в соотношении 1:50 0,15 М раствором натрия хлорида, содержащим 4% формалина, с последующей экспозицией в течение 24 ч при комнатной температуре или в течение 2 ч при (37±1) °С. После обеззараживания пробы адсорбировали добавлением 50% взвеси формализированных эритроцитов из расчета 0,1 мл на 1 мл пробы, инкубировали смесь 30 мин при (37±1) °С или 1-2 ч при (22±2) °С. Эритроциты осаждали центрифугированием в режиме 2500-3000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость исследовали в РНГА.

Каждый образец исследуемой пробы был объемом не менее 0,5 мл. Все пробы до постановки опыта хранили при температуре минус 18 °С, во время опыта – при плюс 4 °С, но не более 3 суток. Все пробы одновременно исследовали методом РНГА с применением испытываемых наборов реагентов и микологическим методом. Обеззараживание проб проводили в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

**Проведение РНГА.** Постановку РНГА (в микроили макрварианте) осуществляли в лунках микроили макропланшета по 0,025 (0,05 мл) соответственно по стандартной методике. Результаты учитывали через 2-3 ч и окончательно – на следующие сутки. Для подтверждения специфичности РНГА использовали реакцию ее торможения (РТНГА).

**Проведение исследований микологическим методом.** Культивирование *H. capsulatum*, *S. immitis*, *S. posadasii* и других микромицетов выполняли в пробирках на плотной питательной среде Сабуро, содержащей 5% левомицетина (рН 6,8±0,2), и инкубировали при температуре (28±1) °С в течение 30-45 суток. Конверсию *H. capsulatum* в тканевую фазу осуществляли на питательной среде, предложенной Френсисом: мясо-пептонном агаре, содержащем 5% цистеина и 5% дефибринированной крови, в течение 7 – 14 суток при

37 °С. Учет и интерпретацию результатов анализа при микологическом исследовании проводили визуально по появлению роста микромицетов.

Бактериальные культуры II-IV групп патогенности рассеивали на чашки Петри с агаром Хоттингера рН (7,2±0,1) и инкубировали в течение 24-48 ч при температуре (37±1) °С, после чего смывали и инактивировали в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Результаты клинических испытаний статистически обрабатывали в соответствии с «Методическими рекомендациями по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий», 2013 г. Статистическую достоверность полученных результатов испытаний оценивали в зависимости от числа параллельных опытов при доверительной вероятности 90%, используя формулу биномиального распределения Бернулли.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ввиду полиморфизма клинических проявлений в диагностике кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза лабораторным методам исследования отводят основную роль [1, 2]. Выделение культур *Coccidioides* spp. и *Histoplasma* spp. микологическим методом или гистологическая идентификация микромицетов в тканях являются традиционными, однако данные методы длительны и инвазивны, и для их постановки, в среднем, требуется 1-3 недели. Наиболее доступные для своевременной диагностики и определения тактики лечения больного кокцидиоидомикозом и гистоплазмозом – метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и экспрессные иммунологические методы, предназначенные для обнаружения циркулирующих и клеточных антигенов в различных пробах клинического материала (кровь, моча, мокрота и др.) [2, 4]. Определение антигена в клинических образцах, в том числе с помощью РНГА, чаще всего проводят при диссеминированных формах, в остром периоде развития микотических инфекций, а также на этапе индикации и идентификации выделенных культур [4].

Поскольку *Coccidioides* spp. и *Histoplasma* spp. имеют близкое генетическое родство, обеспечивающее экспрессию антигенных комплексов, включающих множество общих детерминант, специалисты референс-центра разработали группоспецифический набор реагентов для одномоментного выявления комплексного общего антигена возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза с помощью РНГА [7]. Кроме того, при разработке диагностикума учитывали то, что оба патогенных биологических агента (*Coccidioides* spp., *Histoplasma* spp.) являются возбудителями особо опасных (глубоких) микозов, в ряде случаев, в условиях чрезвычайных ситуаций для их индикации и идентификации предпочтительно использование группоспецифического иммунодиагностического препарата [7].

Согласно конструкторской документации, диагностикум предназначен для идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза в выделенных культурах микромицетов, а также в пробах биологического материала (сыворотка крови, мокрота,

промывные воды бронхов, суспензии органов – легкие, печень, селезенка). В микроварианте РНГА с использованием данного набора реагентов показатель аналитической чувствительности для возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза составил  $3,12 \cdot 10^6$  кл/мл, в макроварианте РНГА –  $1,56 \cdot 10^6$  кл/мл. При определении показателя аналитической специфичности установлено, что диагностикум не должен выявлять в РНГА гетерологичные микромицеты в концентрации  $5 \cdot 10^7$  кл/мл.

Для подтверждения нормированных технических характеристик медицинских изделий (спецификации) и согласования нормативно-эксплуатационных документов в 2013 году проведены технические испытания МИ испытательной лабораторией на базе кафедры клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России (Москва). В результате были согласованы вид, класс потенциального риска применения МИ в соответствии с их номенклатурной классификацией. В ходе испытаний выполнен анализ и доработка технической и эксплуатационной документации, оценка и анализ данных, относящихся к МИ, для проверки безопасности и оформлен акт технических испытаний. Полученные результаты эксперты оценили как положительные и подтвердили качество и безопасность применения диагностического набора реагентов. Установлено, что набор реагентов может быть использован для проведения клинической диагностики гистоплазмоза и кокцидиоидомикоза.

В 2015 году «Набор реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» был представлен к государственной регистрации Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения в качестве медицинского изделия. В соответствии с Правилами государственной регистрации медицинских изделий, утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416, регистрацию МИ осуществляли на основании результатов технических и клинических испытаний, а также данных экспертизы представленных документов.

При проведении клинических испытаний с целью контроля чувствительности при анализе 264 проб (216 проб суспензий микромицетов и 48 проб биологического и клинического материала), содержащих возбудители кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза, в концентрации  $3,12 \cdot 10^6$  кл/мл в микроварианте РНГА получен положительный результат в 100% случаев, в концентрации  $1,56 \cdot 10^6$  кл/мл в макроварианте РНГА – положительный результат в 100% случаев. Внутрипостановочную и межсерийную воспроизводимость оценивали в 2 повторах и на 2 сериях диагностикума. Результаты испытаний по оценке показателя чувствительности диагностикума представлены в таблице 1.

Таблица 1.

**Результаты исследований в РНГА чувствительности «Набора реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой»**

Наименование проб	Число проб	Положительный результат в РНГА	
		Серия 98/15	Серия 99/15
Положительные пробы, содержащие суспензии <i>C. immitis</i> , <i>C. posadasii</i> , <i>H. capsulatum</i> в концентрациях $3,12 \cdot 10^6$ кл/мл, $1,56 \cdot 10^6$ кл/мл	108	108 (100%)	108 (100%)
Положительные пробы биологического (клинического) материала, содержащие <i>C. immitis</i> , <i>C. posadasii</i> , <i>H. capsulatum</i> в концентрациях $3,12 \cdot 10^6$ кл/мл, $1,56 \cdot 10^6$ кл/мл	12	12 (100%)	12 (100%)
Положительные пробы биологического материала, содержащих <i>C. immitis</i> , <i>C. posadasii</i> , <i>H. capsulatum</i> , полученного от экспериментальных лабораторных животных	12	12 (100%)	12 (100%)
Итого положительных проб, содержащих <i>C. immitis</i> , <i>C. posadasii</i> , <i>H. capsulatum</i>	132	132 (100%)	132 (100%)

Примечание: «\*» - образцы анализировали в 2 повторах; «\*\*» - использовали микро- и макроварианты РНГА; «\*\*\*» - результаты РНГА подтверждены микологическим методом выделения культур.

При проведении клинических испытаний с целью контроля показателя специфичности при анализе 128 проб, содержащих гетерологичные микроорганизмы, имеющих схожую морфологию клеток тканевой фазы, отрицательный результат получен в 100% случаев (табл. 2).

Таблица 2.

**Результаты исследований в РНГА специфичности «Набора реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой».**

Наименование проб	Число проб	Отрицательный результат в РНГА	
		Серия 98/15	Серия 99/15
Пробы, содержащие суспензии гетерологичных микроорганизмов в концентрации не менее $5 \cdot 10^7$ кл/мл ( <i>C. guillemontii</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. neoformans</i> 4N, <i>C. neoformans</i> 9/22, <i>R. mucilaginosa</i> , <i>A. hyalospore</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>G. zeae</i> , <i>G. candidum</i> , <i>M. manginii</i> , <i>P. variotii</i> , <i>P. citreoviridae</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. verrucosa</i> , <i>R. microsporus</i> , <i>S. brevicaulis</i> , <i>T. crateriforme</i> , <i>B. suis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>B. pseudomallei</i> , <i>B. mallei</i> )	56	56 (100%)	55 (98,2%)
Пробы клинического материала, содержащие <i>P. citreoviridae</i> в концентрации $3,12 \cdot 10^6$ кл/мл	4	4 (100%)	4 (100%)
Пробы биологического материала, содержащие <i>P. citreoviridae</i> , полученного от экспериментальных лабораторных животных	4	4 (100%)	4 (100%)
Итого отрицательных проб	64	64 (100%)	63 (98,2%)

Примечание: «\*» - образцы анализировали в 2 повторах.

«\*\*» - использовали микро- и макроварианты РНГА; «\*\*\*» - результаты РНГА подтверждены микологическим методом выделения культур

При проведении клинических испытаний доказана

эффективность применения набора реагентов: диагностическая чувствительность – не менее 99% с доверительной вероятностью 90%; диагностическая специфичность – не менее 98% с доверительной вероятностью 90%. Внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для положительных образцов составила 100%. В качестве контрольного использовали микологический метод.

Поскольку аналогов вышеназванным наборам реагентов, зарегистрированным на территории Российской Федерации, не существует, испытания проводили без использования препарата для сравнения.

После завершения регламентированной процедуры государственной регистрации Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения в 2016 г. принято решение о регистрации МИ, оформлено регистрационное удостоверение и разрешены производство, реализация и применение МИ в медицинской лабораторной практике.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка и внедрение в практику здравоохранения новых диагностических и индикационных наборов реагентов, обеспечивающих с высокой чувстви-

тельностью и специфичностью выявление возбудителей особо опасных микозов в выделенных культурах и клиническом (биологическом) материале, развитие научно-производственной деятельности, ориентированной на выпуск эффективных и надежных диагностических наборов отечественного производства, а также своевременное информирование специалистов медицинских организаций о новых зарегистрированных наборах микологических наборов, являются важными направлениями деятельности референс-центра по мониторингу за возбудителями глубоких микозов на базе ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора».

В настоящее время набор реагентов для экспресс-диагностики гистоплазмоза и кокцидиоидомикоза с помощью РНГА выпускается на производственной базе ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора». В РНГА с использованием данного набора реагентов предварительный результат может быть получен через 2-3 ч от начала исследования, что особенно важно при верификации диагноза и определении тактики ведения больного на этапах клинической диагностики кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.А., Липницкий А.В., Гришина М.А. и др. Особо опасные микозы. Под ред. академика РАМН В.В. Малеева. Волгоград: Волга-Паблицер, 2013:193 с. [Antonov V.A., Lipnitskiy A.V., Grishina M.A. i dr. Osobo opasnyie mikozyi. Pod red. akademika RAMN V.V. Maleeva. Volgograd: Volga-Pablicher, 2013:193 s. (In Russ)]
2. Попова А.Ю., Топорков А.В., Липницкий А.В. и др. Распространение в мире особо опасных микозов. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016; 3: 120-6. [Popova A.Yu., Toporkov A.V., Lipnitskiy A.V. i dr. Rasprostranenie v mire osobo opasnyih mikofov. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. 2016; 3: 120-6. (In Russ)]
3. Ampel N.M. Coccidioidomycosis in persons infected with HIV-1. Ann. N-Y Acad. Sci. 2007; 1111: 336-342.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В. и др. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Под ред. акад. РАМН Г.Г. Онищенко. Практическое руководство. 2-е изд. М.: ЗАО «Шико», 2013: 560 с. [Onischenko G.G., Kutyrev V.V. i dr. Laboratornaya diagnostika opasnyih infektsionnyih bolezney. Pod red. akad. RAMN G.G. Onischenko. Prakticheskoe rukovodstvo. 2-e izd. M.: ZAO «Shiko», 2013: 560 s. (In Russ)]
5. Di Caudo D. J. Coccidioidomycosis: a review and update. J. Am. Acad. Dermatol. 2006; 55 (6): 929-942.
6. Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. Clin. Microbiol. Rev. 2007; 20 (1):115-132.
7. Kuberski T., Myers R., Wheat L.J., et al. Diagnosis of coccidioidomycosis by antigen detection using cross-reaction with a *Histoplasma* antigen. Clin. Infect. Dis. 2007; 44 (5): 50-54.

Поступила в редакцию журнала 10.06.2017

Рецензент: С.М. Игнатъева



## ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МИКОТИЧЕСКОГО СИНУСИТА

**Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.), Степанова А.А. (зав. лаб.)\*, Митрофанов В.С. (зав. отд.), Шульгина М.В. (зам. директора по научной работе)**

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

© Коллектив авторов, 2017

*В данной работе изучены гистологические особенности четырех случаев микотического синусита, обусловленных дрожжевыми (один случай) и мицелиальными (три случая) грибами. Детально описаны особенности анатомического строения аспергиллем при синусите у пациентов. Суммированы и проанализированы данные литературы по видовому разнообразию грибов, вызывающих синуситы у человека.*

**Ключевые слова:** аспергиллема, микотический синусит, смешанные микозы

## HISTOLOGICAL INVESTIGATION OF THE MYCOTIC SINUSITIS

**Avdeenko Y.L. (senior scientific collaborator), Stepanova A.A. (head of the laboratory), Mitrofanov V.S. (head of the department), Shulgina M.V. (deputy director for scientific work)**

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

© Collective of authors, 2017

*In this work the histological features of the four cases of fungal sinusitis caused by yeast (one case) and filamentous fungi (three cases) were studied. The peculiarities of the anatomical structure of aspergillomas in patient with sinusitis were described in details. The data of the literature about fungal diversity caused sinusitis in patients were summarized and analyzed.*

**Ключевые слова:** aspergilloma, paranasal sinusitis, mixed mycoses

## ВВЕДЕНИЕ

Грибы являются важной этиологической причиной синусита у людей, частота встречаемости которого в последнее время значительно возросла. Данные гистологических исследований имеют важное значение при постановке диагноза, выбора тактики лечения и составления возможного прогноза течения инфекционного процесса.

Цель работы – провести детальное гистологическое изучение микотического синусита разной этиологии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Изучена гистопатология микотического синусита на примере четырех пациентов.

Для гистологических исследований операционный материал из пазухи носа закладывали в биопсийные кассеты, фиксировали 6 часов 10% забуференным раствором формалина. Затем биопсийные кассеты с материалом помещали в аппарат для гистологической обработки биологических тканей Tissue-Tek®VIPTM 5Jr. (фирма Sakura, Япония) для проведения проводки через серию изопропанола (IsoPrep). Последующую заливку в среду Biomix осуществляли с помощью модульной системы заливки Tissue-Tek®TECTM (фирма Sakura, Япония). Срезы толщиной 3 мкм получали на санном микротоме Slide 2003 (группа компаний Stormoff) и затем монтировали на предметные стекла с применением адгезивной жидкости фирмы Biovitrum. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином (Г-Э) для описания характера воспалительной реакции и выявления элементов гриба (по методу PAS и Гомори-Грокотт). Окрашенные срезы заключали в заливочную среду Bio Mount (фирмы Bio-Optica). Препараты изучали и фотографировали в световом микроскопе AxioLab.A1 (фирма Zeiss, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Случай 1.** У пациента Б. (1999 г.р.) с подозрением на образование в правой гайморовой пазухе при гайморотомии выявлено гнойно-некротическое воспаление. Зоны некроза были окружены лейкоцитарно-фибринозным экссудатом (Рис. 1 а, стрелки). Сохраненные фрагменты слизистой оболочки выстланы реснитчатым эпителием с очаговой густой воспалительной лейкоцитарной (нейтрофильной и умеренной эозинофильной), лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрацией собственной пластинки, отмечены картины формирования грануляционной ткани (Рис. 1 б).

\* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна, Тел.: (812) 303-51-45

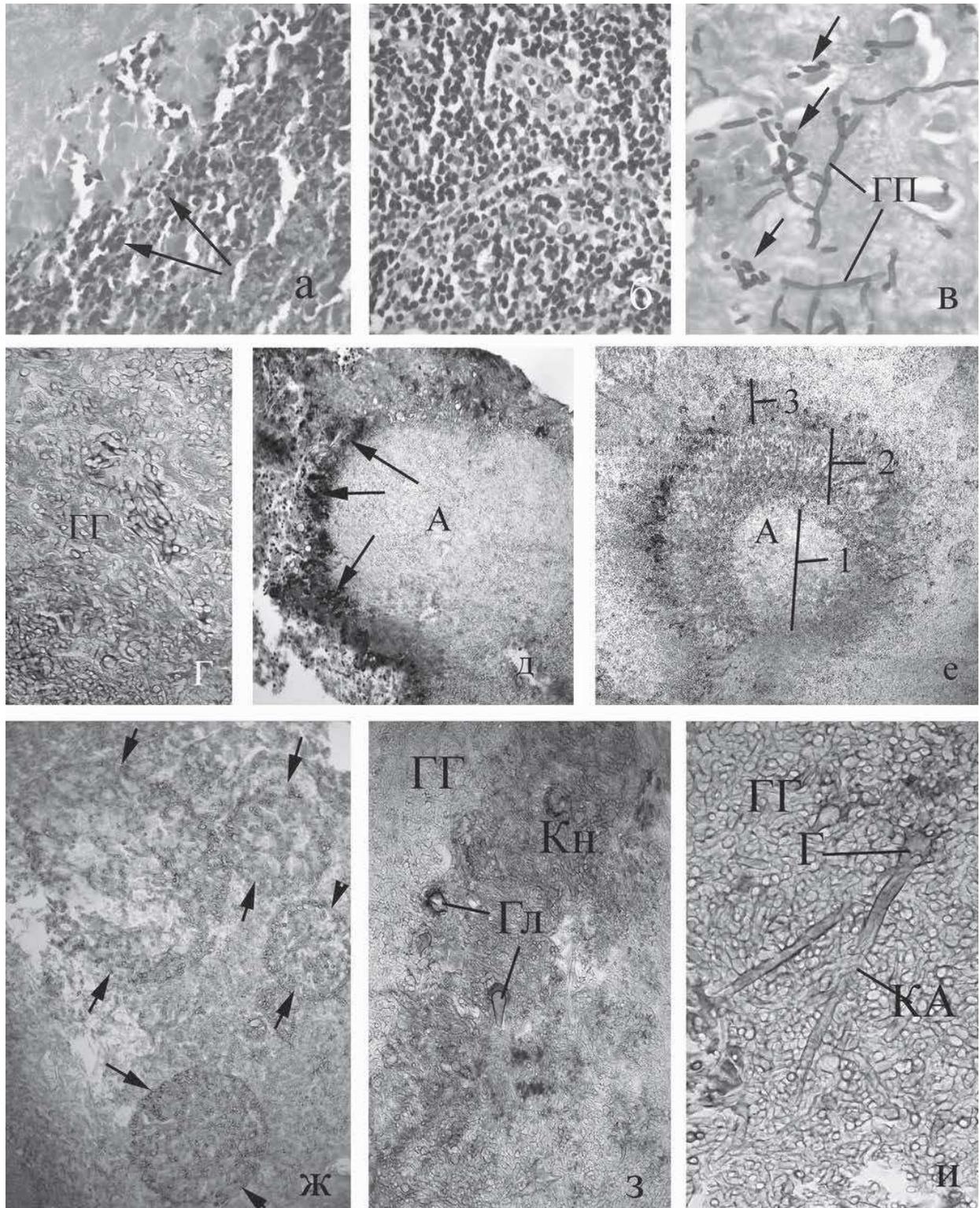


Рис. 1. Светооптические особенности строения содержимого околоносовых пазух у больных синуситом. Условные обозначения здесь и на рисунке 2: А – аспергиллема, ГГ – гифы гриба, ГЛ – головки, КА – конидиогенные аппараты, Кн – конидии. а, б, г-и – Г-Э; в – PAS; Ув.: а-г- х400; д, е – х 100; ж, з- х 400; и – х800.

При гистологическом исследовании (Г-Э, PAS) тканей пазухи наблюдали обширные очаги некроза, содержащие скопления гиф псевдомицелия и дрожжевых клеток. Выявлены очаги концентрации элементов гриба, представленные гифами псевдомицелия и дрожжевыми клетками (Рис. 1 в). Гифы мицелия имели, в среднем, диаметр 5,5 мкм. Они располагались хаотично, редко ветвились, плотность их локализации

имела очаговый характер. Гифы псевдомицелия доминировали (Рис. 1 в). Дрожжевые клетки отмечали в умеренном числе (Рис. 1 в, стрелки), как правило, одиночные, эллипсоидной формы (в среднем – 5,0-5,8 x 6,0-11,7 мкм), иногда почкующиеся. Судя по особенностям микроморфологии грибных элементов можно заключить, что в данном случае возбудитель инфекции, скорее всего, представлен *Candida* spp.

**Случай 2.** Пациентке Д. (1960 г.р.) был поставлен клинический диагноз «аспергиллема левой гайморовой пазухи».

В изученных микропрепаратах ткань пазухи не была представлена. На срезах (Г-Э) отмечены: 1) обширные скопления тонких грибных гиф (со средним диаметром 5,4 мкм), которые располагались плотно и хаотично относительно друг друга, формируя скопления по типу ложной ткани (Рис. 1 г); 2) массивные образования округлой формы (от 1000 до 1600 мкм (Рис. 1 д, е) по типу «аспергиллемы»; 3) более мелкие, по сравнению с аспергиллемой, скопления гиф округлой формы (Рис. 1 ж, стрелки показывают границы скоплений гриба) разного диаметра (от 20 до 90 мкм).

Скопления гиф гриба **первого типа** обширные. Гифы гриба тонкие (в среднем – 5,4 мкм), септированные, расположенные по типу ложной ткани – плотно и хаотично относительно друг друга (Рис. 1 г).

В более мелких, сферической (диаметром 1000 мкм) или слегка эллипсоидальной формы (900 x 1000 мкм) скоплениях **второго типа** – аспергиллемах (Рис. 1 д) – гифы тонкие (в среднем – 5,0 мкм), плотно и хаотично ориентированные по типу ложной ткани, светло-голубого цвета (Г-Э). По 2/3 периметра такого образования наблюдали плотное скопление из клеток иммунной системы, имевшее вид темно окрашенного ореола (Рис. 1 д, стрелки). Это можно объяснить наличием здесь лейкоцитов (нейтрофилов). В более зрелой аспергиллеме (Рис. 1 е) четко выделялись три слоя. Внутренний сферической формы слой диаметром 800 мкм состоял из плотно и хаотично расположенных тонких (в среднем – 5,0 мкм), слабоокрашенных в голубой цвет гиф (Рис. 1 е, 1). За ним следовал полусферической формы средний слой толщиной 500 мкм (Рис. 1 е, 2), отличительными особенностями строения которого были более рыхлая ориентация гиф и наличие ярко-синей окраски. Наконец, третий завершающий слой этого образования был толщиной 300 мкм. Он отличался высоким контрастом, обусловленным наличием пигментированных гиф, находящихся в основании многочисленных также высококонтрастных конидиогенных аппаратов (Рис. 1 е, 3). В составе последних присутствовали одиночные либо в группах (от двух до трех) конидиогенные аппараты (Рис. 1 з, и). Конидиеносцы высотой от 100 до 200 мкм, гладкие (Рис. 1 и), слегка расширяющиеся вблизи булавовидной (Рис. 1 з, и) головки диаметром 14-16 мкм. Стеригмы (фиалиды) однорядные (высотой 9-10 мкм и шириной 2,5-3,0 мкм), формировались только в верхней 2/3 части головки. Конидиогенные аппараты отличал высокий контраст и темно-коричневая окраска, что обусловлено наличием меланина в их клеточных стенках. Конидии непосредственно в апексе стеригм отсутствовали. Вблизи головок в грибной ложной ткани отмечали обширные скопления неровных очертаний, состоящие из многочисленных темноокрашенных зрелых конидий (Рис. 1 з). Это является показателем того, что конидиальное спороношение уже завершено. Иногда наблюдали головки сильно деформированные, характерные для стареющих конидиофоров. Как видно из рисунков (Рис. 1 з, и), конидиогенные аппараты окружены плотно и хаотично расположенными гифами ложной ткани. По особенностям строения описанные конидиогенные аппараты характерны для *A. fumigatus*. Морфологиче-

ской особенностью аспергиллемы данного вида гриба являлось наличие асимметричной реакции клеток иммунной системы вблизи еще «молодой» аспергиллемы и такого же спороношения в зрелой, а также наличие меланина в клеточных стенках конидиогенных аппаратов и подстилающих их гиф, что не характерно для культуральных форм данного вида гриба.

**Третий тип** гифальных скоплений (Рис. 1 ж, границы показаны стрелками) в описываемом случае был выявлен вблизи аспергиллем. Такие скопления локализовались рядом, имели варьирующие размеры (от 25,0 до 55,0 мкм), сферическую форму, четкий ровный ограничивающий контур и состояли из хаотично ориентированных тонких (в среднем – 5,0 мкм) септированных гиф. По мере увеличения диаметра таких образований плотность расположения гиф в них возрастала. В самых крупных скоплениях отмечали просветление некоторых участков, обусловленное отсутствием гиф. Трудно определить функциональную специализацию таких образований: что это – начальные стадии формирования аспергиллем из существующих гиф или совершенно необычные способы «не радиального» роста многочисленных конидий? Нельзя исключать и присутствие гиф другого вида гриба, которые располагались обособленно и не вступали в непосредственный контакт с окружающими гифами ложной ткани.

Наличие уже отмерших (без конидий в апексе стеригм) конидиогенных аппаратов на поверхности зрелых аспергиллем было показателем давности инфекционного процесса. Присутствие многочисленных конидий среди гиф ложной ткани гриба, безусловно, может быть причиной вторичного инфекционного процесса.

**Случай 3.** У пациентки (В., 1962 г.р.) были произведены правосторонняя гайморотомия и вазотомия нижних носовых раковин, поставлен диагноз «хронический правосторонний гайморит микотической этиологии».

При гистологическом исследовании (PAS) выявлен эрозивный полипозный хронический синусит с выраженной альтеративно-продуктивной реакцией, десквамацией эпителия, эрозивованием, воспалительной инфильтрацией слизистой оболочки лейкоцитами (нейтрофилами и эозинофилами), лимфоцитами и макрофагами (Рис. 2 а, стрелки).

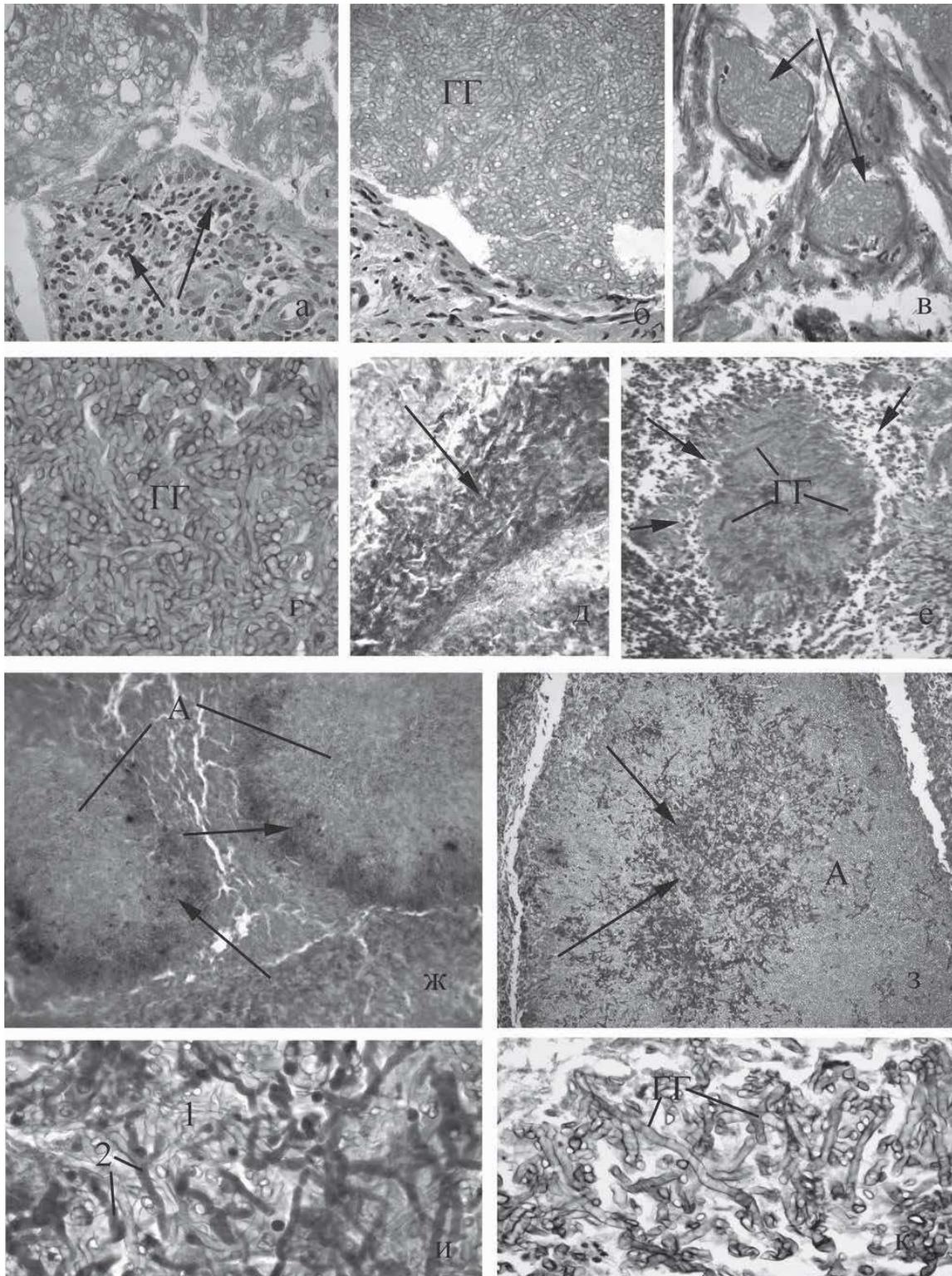


Рис. 2. Особенности строения компонентов микотической инфекции в слизистой оболочке пазухи носа пациентов. а - в - PAS; г - к - Г-Э. Ув.: а, б, в, д, е, ж - x200; г, и, к - x800; з - x 40.

В верхне-челюстной пазухе носа наблюдали: 1) массивное сферическое (1100 мкм) скопление гиф гриба (Рис. 2 б) и 2), более мелкие (10-15 x 25-30 мкм) и многочисленные скопления эллипсоидной формы (Рис. 2 в, стрелки). Гифы гриба тонкие (5,5-6,0 мкм), хаотично ориентированные. По плотности расположения гиф и их строению эти два типа скоплений не различались между собой. Вокруг более крупного скопления гиф

имела место скудная воспалительная инфильтрация, эпителиальная выстилка местами отсутствовала. Небольшие по размерам скопления гиф гриба, окруженные лейкоцитарным валом и фибрином, контактирующие с эрозивной поверхностью слизистой оболочки, расценены нами как начальные стадии инвазии. Если допустить, что массивное образование гиф гриба представляет собой аспергиллему, то, по сравнению

со вторым случаем настоящего сообщения, она имела более простое строение. В ней отсутствовала дифференциация на отдельные слои разной морфологии и поверхностная зона конидиального спороношения с конидиеносцами. Можно допустить, что более мелкие и многочисленные скопления гиф гриба – это начальные стадии формирования аспергиллемы. Судя по однообразному строению гиф гриба (идентичные размеры, однотипное окрашивание клеточных стенок), в данном случае имеет место синусит, вызванный одним видом гриба.

**Случай 4.** У пациентки Г. (1980 г.р.) первоначально был выявлен хронический синусит неясной этиологии. В микропрепаратах (Г-Э) слизистая пазухи не представлена. В содержимом околоносовой пазухи присутствовали скопления гиф гриба разнообразного анатомического строения, которые различались по размерам, форме и морфологии составляющих их гиф.

Наблюдали обширные, по типу ложной ткани, скопления гиф со средним диаметром 7,0 мкм. Они имели неровный контур и были представлены плотно и беспорядочно ориентированными слабоокрашенными гематоксилин-эозином гифами (Рис. 2 г). Редко отмечали оформленные в виде полос толщиной от 10 до 20 мкм скопления из более широких (в среднем – 12,8 мкм), хаотично и рыхло расположенных гиф, отличительной особенностью строения которых было отсутствие септ, ветвления и наличие клеточных стенок темно-синего цвета (Рис. 2 д, стрелка). Также наблюдали довольно рыхлые скопления тонких (в среднем – 7,0 мкм), слабоокрашенных, септированных гиф гриба (Рис. 2 е) с характерным радиальным ростом, окруженные многочисленными лейкоцитами (Рис. 2 е, стрелки).

Встречались также сферической формы скопления (от 1000 до 1500 мкм) гиф по типу аспергиллемы (Рис. 2 ж). Они состояли из плотно и хаотично расположенных тонких скоплений (в среднем – 7,0 мкм), формирующих ложную ткань с неровным интенсивно окрашенным краем и скудной периферической лейкоцитарной инфильтрацией (Рис. 2 ж, стрелки). Мы выявили одну аспергиллему больших размеров (1500 x 3000 мкм) и эллипсоидной формы (Рис. 2 з), составленную из двух типов гиф разной морфологии. Основную ее часть составляли тонкие (в среднем 7,0 мкм), слабоокрашенные гифы, локализующиеся по типу ложной ткани. В центральной части такой аспергиллемы присутствовали более темноокрашенные гифы (Рис. 2 з, стрелки) со средним диаметром 10,0 мкм и темно-синим окрашенным содержимым. Они располагались беспорядочно, но плотность их размещения постепенно снижалась по мере приближения к периферии аспергиллемы.

Данный случай интересен тем, что при гистологическом исследовании выявлены различные морфологические грибные образования и три типа гиф, из которых доминировали узкие слабоокрашенные гифы, сходные с аспергиллами. Более широкие гифы с темно-синими клеточными стенками, скорее всего, принадлежат муковому грибу (Рис. 2 к). Идентификация видовой принадлежности третьего типа гиф (Рис. 2 з, стрелки, 2 и, 2) не представлялась возможной.

Отметим, что при изучении данного случая микстинфекции мы никогда не наблюдали картин плотного контакта или топографического «смешивания» гиф аспергилла и мукора, что является показателем алле-

лопатии – антагонистического «неприятя» этих двух видов, обусловленного характером выделяемых ими соединений, способных ингибировать рост конкурента. В научной литературе [1] описан уникальный пример совместного существования и взаимодействия между гифальными элементами *A. fumigatus* и *A. flavus* в просвете бронхов и тканях легких пациента, больного аспергиллезом, что, безусловно, заметно утяжеляет ход течения инфекционного процесса. Интересно, что при смешанной (*Mucor* sp., *Aspergillus* spp. и *Candida* spp.) форме генерализованного микоза [2] нами также не были выявлены картины контакта или «смешивания» грибных элементов представителей этих родов. По данным Хостелиди С.Н. с соавторами [3], у больных с острым лейкозом сочетанная инфекция аспергиллеза и мукороза имела место в 73% случаев.

В наиболее крупной аспергиллеме (случай 4) нам удалось выявить топографическое сосуществование двух морфологически различающихся гиф, скорее всего, принадлежащих двум разным видам. В доступной нам литературе мы не нашли аналогичных случаев анатомического строения аспергиллемы. Иными словами, здесь мы имеем дело с аспергиллемой смешанного типа, формирование которой было возможным благодаря «благодарному» влиянию внеклеточных метаболитов этих двух видов. Судя по анатомическому строению такой аспергиллемы, гифы гриба с темноокрашенным содержимым не формируют ложную ткань, характерную для «основного тела» аспергиллемы. Мы связываем это с отсутствием снаружи их клеточных стенок внеклеточного матрикса, обуславливающего адгезивные свойства гиф аспергиллов. Совершенно очевидно, что гифы гриба, находящиеся внутри аспергиллемы, оказываются как бы «замурованными» в ее ложной ткани и, следовательно, являются недоступными для клеток иммунной системы хозяина. Вполне ясна роль такой аспергиллемы в качестве «тройного коня».

В таблице 1 представлено разнообразие клеток иммунной системы изученных в данном сообщении пациентов с синуситом околоносовых пазух.

Таблица 1

**Сравнительный анализ видов грибов, типов их клеток, грибных образований и клеток, участвующих в воспалении, при синусите у пациентов**

Номер случая	Род или вид гриба	Типы клеток грибов и образований из них	Типы клеток иммунной системы
1	<i>Candida</i> spp.	Псевдомциелий и дрожжевые клетки	Лейкоциты (нейтрофилы и эозинофилы), лимфоциты и макрофаги
2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ложная ткань, аспергиллема, формирующаяся и зрелая с конидиогенными аппаратами, зрелые конидии в ложной ткани, мелкие сферические обособленные скопления	Лейкоциты (нейтрофилы)
3	<i>Aspergillus</i> spp.	Аспергиллемы варьирующих размеров	Лейкоциты (нейтрофилы и эозинофилы), лимфоциты и макрофаги

4	<i>Aspergillus</i> spp., мукор и темноокрашенный мицелиальный гриб	Ложная ткань, широкие полосы из гиф мукора без септ, рыхлые скопления узких гиф с радиальным ростом, аспергиллемы средних размеров из одного типа гиф без конидиогенных аппаратов, аспергиллема крупная из двух типов гиф без конидиального спороношения	Лейкоциты (нейтрофилы)
---	--	--	------------------------

Как видно из таблицы, существенных различий в характере воспалительной инфильтрации при кандидозном и аспергиллезном синуситах не было. Интересно, что в двух случаях (второй и четвертый) из четырех, в которых обнаружили наибольшее количество клеточных типов и образований гриба, а также большое число возбудителей (четвертый случай), была выявлена реакция клеток иммунной системы в виде лейкоцитов. По данным литературы, при аллергическом типе синусита имеет место эозинофильно-лимфоцитарная клеточная реакция [4]. Возможно, что присутствие эозинофилов при описании первого и третьего случаев также свидетельствует о наличии аллергического компонента. Мы допускаем, что в третьем случае аспергиллемы, в отличие от остальных, были на стадии роста и развития, чем можно объяснить присутствие в ткани разных типов клеток иммунной системы, включая макрофаги, которым отводится главная роль в гифоцитозе при аспергиллезе [5].

Из четырех изученных случаев синусита один – приходился на долю гриба рода *Candida* (табл. 1). У пациентов с синуситом, обусловленным дрожжевыми грибами, на настоящий момент выявлены: 1 вид из рода *Cryptococcus* (*C. neoformans*) и 4 вида рода *Candida* (*C. albicans*, *C. kefyr*, *C. stellatoidea* и *C. glabrata*). Наиболее часто у больных с синуситом обнаруживают *albicans*. В исследованиях Ma L. и соавторов [6] показано, что из 180 изученных случаев синуситов 16 приходилось на долю *C. albicans*. В работе Кунельской В.Я. [7] отмечено, что из 240 больных с микозами околоносовых пазух у 28% заболевание было вызвано *C. albicans* и *C. stellatoidea*. Согласно данным Chakrabarti A. и Sharma S.C. [8], из 176 случаев синусита только один был обусловлен *C. albicans*. Mohammadi A. с соавторами [9] установили, что из 100 изученных случаев синусита на долю *C. glabrata* приходилось 15%. В литературе [10] также описан редкий случай смешанного синусита, вызванного и *A. niger* и *C. tropicalis* (табл. 2).

Таблица 2

Список видов грибов, вызывающих синуситы

№ п/п	Вид(ы) патогенного(ых) гриба(ов)	Авторы, год издания
Синуситы, вызываемые одним видом гриба		
1	<i>Candida</i> spp.	[11]
2	<i>Candida albicans</i>	[6-8, 12-15]
3	<i>Candida kefyr</i>	[16]
4	<i>Candida stellatoidea</i>	[7]
5	<i>Candida glabrata</i>	[9, 12]
6	<i>Cryptococcus neoformans</i>	[4, 17]
7	<i>Aspergillus fumigatus</i>	[7, 8, 12, 13, 18-23]
8	<i>Aspergillus flavus</i>	[7-10, 12, 13, 20, 21, 23-29]
9	<i>Aspergillus niger</i>	[7, 10, 12, 13, 20, 23]
10	<i>Aspergillus terreus</i>	[12, 13]
11	<i>Aspergillus nidulans</i>	[13]

12	<i>Aspergillus ustus</i>	[23]
13	<i>Aspergillus ochraceus</i>	[23]
14	<i>Aspergillus glaucus</i>	[12]
15	<i>Mucor heimalis</i>	[13]
16	<i>Mucor racemosus</i>	[13]
17	<i>Mucor cercinelloidea</i>	[13]
18	<i>Rhizopus microsporus</i>	[13]
19	<i>Rhizopus arrhizus (stolonifer)</i>	[8, 13, 25, 29]
20	<i>Rhizomucor pusillus</i>	[13]
21	<i>Apophysomyces elegans</i>	[8]
22	<i>Lichtheimia (Absidia) corymbifera</i>	[13]
23	<i>Conidiobolus</i> spp.	[27]
24	<i>Bipolaris</i> spp.	[30, 31]
25	<i>Bipolaris spicifera</i>	[32, 33]
26	<i>Rhinosporidium seeberi</i>	[27]
27	<i>Pseudallescheria boydii</i>	[11, 12]
28	<i>Paecilomyces variotii</i>	[34]
29	<i>Scedosporium apiospermum</i>	[34]
30	<i>Fusarium</i> spp.	[35, 36]
31	<i>Fusarium proliferatum</i>	[29]
32	<i>Fusarium solani</i>	[13]
33	<i>Cladosporium bantianum</i>	[11]
34	<i>Alternaria</i> spp.	[7, 8]
35	<i>Alternaria alternata</i>	[37]
36	<i>Exserohilum rostratum</i>	[38]
37	<i>Curvularia lunata</i>	[8, 39, 40]
38	<i>Penicillium tardum</i>	[7]
39	<i>Penicillium chrysogenum</i>	[9]
40	<i>Penicillium mameffeii</i>	[13]
41	<i>Penicillium rugulosum</i>	[37]
42	<i>Exophiala verrucosa</i>	[13]
43	<i>Cephalosporium</i> spp.	[7]
44	<i>Shizophyllum commune</i>	[29]

Смешанные синуситы

45	<i>A. niger</i> + <i>Candida tropicalis</i>	[10]
46	<i>A. nidulans</i> + <i>A. fumigatus</i>	[41]
47	<i>A. flavus</i> + <i>A. niger</i>	[10]
48	<i>A. flavus</i> + <i>Rhizopus arrhizus (stolonifer)</i>	[10]
49	<i>A. niger</i> + <i>Rhizopus arrhizus (stolonifer)</i>	[10]
50	<i>A. niger</i> + <i>Penicillium</i> spp.	[10]

В остальных трех случаях настоящего исследования основными возбудителями были аспергиллы. Во втором и третьем случаях синусит был обусловлен присутствием одного вида гриба – аспергилла, видовая принадлежность которого была определена для второго из них (табл. 1). Как видно из таблицы, один вид гриба может вызывать формирование разных типов клеток и морфологических образований в пазухе носа пациентов.

В двух случаях синусита, вызванных аспергиллами, в пазухе носа обнаружены скопления гиф по типу ложной ткани (Табл. 1). Сходное морфологическое образование было описано ранее [1] в легких больного аспергиллезом. Формирование такой ткани возможно благодаря присутствию снаружи гиф тканевых форм аспергиллов внеклеточного матрикса [42], который выступает в роли адгезирующего, цементирующего и протективного компонента клеточной стенки гриба.

Во всех трех изученных случаях синусита с участием аспергиллов были выявлены аспергиллемы разного анатомического строения и стадии зрелости. Во втором случае на поверхности зрелой аспергиллемы наблюдали многочисленные конидиогенные аппараты. Такое конидиальное спороношение характерно для аспергиллемы легких [43, 44] и пазухи носа [44]. Отметим, что в ткани легких больного формирование конидиогенных аппаратов возможно и вне связи с аспер-

гиллемой [1]. В четвертом случае нами установлены аспергиллемы двух типов: средних размеров (из одного типа гиф) и более крупные (из двух типов гиф), на их поверхности конидиогенные аппараты отсутствовали. Способность гриба формировать на поверхности аспергиллем конидиогенные аппараты может указывать на его высокую вирулентность и метаболическую активность. Интересным представляется вопрос о том, какие виды аспергиллов способны формировать «спороносящие» аспергиллемы в тканях человека. В литературе есть сообщения об образовании конидиального спороношения аспергиллемой, выявленной при поражении тканей глаза у пациента [45].

К настоящему времени (табл. 2) обнаружено 8 видов аспергиллов, вызывающих синусит у человека – *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. ustus* и *A. ochraceus*, наиболее частым агентом этого заболевания является *A. flavus*. По данным Подковальникова С.Л. с соавторами [23], в Санкт-Петербурге инвазивный аспергиллез околоносовых пазух отмечали преимущественно у гематологических больных (63%), основным возбудителем его был *A. fumigatus* (37%), *A. flavus* и *A. niger* составляли, соответственно, 32% и 21%.

В литературе данные о частоте встречаемости того или иного вида аспергилла у больных синуситом варьируют. Исследованиями Ma L. соавторами [6] показано, что из 180 изученных случаев микотического синусита 166 – приходилось на виды рода *Aspergillus*. Согласно наблюдениям Chakrabarti A. и Sharma S.C. [8], из 176 случаев синусита наиболее частыми возбудителями были *A. flavus* (80%) и *A. fumigatus* (9,7%). В работе Кунельской В.Я. [7] было показано, что из 240 случаев микозов околоносовых пазух 23% приходилось на долю аспергиллов (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*). Mohammadi A. с соавторами [9] выявили, что у 44,5% из 100 больных с синуситом доминирующим видом был *A. flavus*. Преобладание *A. flavus* (77,7% из 31 случая синусита) было зарегистрировано и Badiee P. с соавторами [15].

До настоящего времени в качестве возбудителей синусита были диагностированы 8 видов мукооров (Табл. 2) из 6 родов (*Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Arophysomyces*, *Lichtheimia*, *Conidiobolus*), а также 17 видов представителей 14 других родов (*Bipolaris*, *Rhinosporidium*, *Pseudallescheria*, *Scedosporium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Exserohilum*, *Curvularia*,

*Penicillium*, *Paecilomyces*, *Exophiala*, *Cephalosporium* и *Shizophyllum*).

Нами в четвертом случае был выявлен синусит смешанного типа, предположительно, обусловленный наличием трех видов грибов (аспергилл, мукор и еще один неизвестный вид с темноокрашенным содержимым гиф). В литературе приведено описание шести случаев микотического синусита, вызванного одновременно двумя видами грибов (табл. 2). В двух случаях смешанной инфекции был обнаружен *Rhizopus arrhizus (stolonifer)* в комбинации с *A. flavus* и *A. niger*. Известен также случай смешанной диссеминированной микотической инфекции у больного с лимфобластным лейкозом [2], вызванной представителями трех родов – *Mucor*, *Aspergillus* и *Candida*.

Известно, что аспергиллема является наиболее частой формой микотического синусита [15]. В нашем исследовании наличие синусита, сопровождающегося формированием аспергиллемы, коррелировало с хронической формой этого заболевания. Безусловно, что наличие покоящихся зрелых конидий (второй случай) в грибных скоплениях носовых пазух намного облегчает течение хронической формы инфекции, поскольку эти клетки устойчивы к лечению и в любой момент могут привести к рецидиву заболевания, которое имеет место в 60%, что связано с наличием устойчивых штаммов грибов, неадекватной антимикотической терапией, тяжелой соматической патологией и поздней коррекцией иммунодефицита [46]. Опосредованно присутствие зрелых конидий может указывать на «зрелый возраст» инфекционного процесса.

Проведенные гистологические исследования помогли подтвердить (второй и третий случаи) и выявить (первый и четвертый случаи) присутствие грибов в качестве возбудителей синусита у пациентов. Наличие псевдомицелия при синусите, обусловленным *Candida* spp. (первый случай), расположенного в некротических тканях позволяет расценивать инфекционный процесс как инвазивный. Поскольку в третьем случае синусита были выявлены картины контакта небольших скоплений гиф гриба с эрозированной поверхностью слизистой, то здесь очевидна возможность их инвазии в слизистую оболочку. Во втором и четвертом случаях скорее всего имела место не инвазивная форма инфекционного процесса, поскольку зоны некроза вблизи грибных скоплений отсутствовали и не было их контакта со слизистой пазухи носа.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Степанова А.А., Васильева Н.В., Борзова Ю.В. и др. Электронно-микроскопическое изучение аспергиллеза легких человека на примере архивного материала. Проблемы медицинской микологии. 2014; 16 (3): 70-79. [Stepanova A.A., Vasileva N.V., Borzova Yu.V. i dr. Elektronno-mikroskopicheskoe izuchenie aspergilleza legkih cheloveka na primere arhivnogo materiala. Problemy meditsinskoj mikologii. 2014; 16 (3): 70-79. (In Russ)].
2. Иоакимова К.Г., Степанова А.А., Богомолова Т.С. и др. *Mucor* species и его ассоцианты – *Aspergillus* spp. и *Candida* spp. при диссеминированном микозе у пациента с лейкозом. Проблемы медицинской микологии. 2013; 15 (3): 73-78. [Ioakimova K.G., Stepanova A.A., Bogomolova T.S. i dr. *Mucor* species i ego assotsiantyi – *Aspergillus* spp. i *Candida* spp. pri disseminirovannom mikoze u patientsa s leykozom. Problemy meditsinskoj mikologii. 2013; 15 (3): 73-78. ) In Russ]
3. Хостелиди С.Н., Шадривова О.В., Борзова Ю.В. и др. Мукоороз и инвазивный аспергиллез у онкогематологических больных в Санкт-Петербурге. Проблемы медицинской микологии. 2016; 18 (2): 18-22. [Hostelidi S.N., Shadrivova O.V., Borzova Yu.V. i dr. Mukoroz i invazivnyy aspergillez u onkogematologicheskikh bolnykh v Sankt-Peterburge. Problemy meditsinskoj mikologii. 2016; 18 (2): 18-22 ) In Russ]
4. Ferraro A., Ivanidze J., Margolske E., et al. Invasive granulomatous cryptococcal sinusitis in an adult with multiple mycetoma. Clinical Imaging. 2017; 41: 65-68.
5. Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Yamaguchi M., et al. Ultrastructural aspects of the interactions between the murine lungs macrophages and the *Aspergillus fumigatus* hyphal cells. Problems in medical mycology. 2016; 18 (1): 20-25.

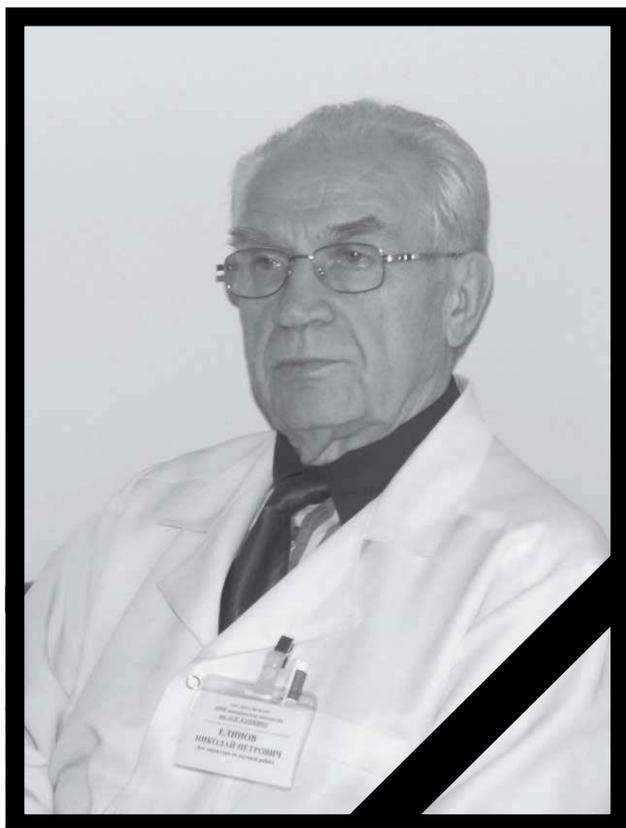
6. Ma L., Xu R., Shi J., Zhou W., et al. Identification of fungi in fungal ball sinusitis: comparison between MUC5B immunohistochemical and Grocott methenamine silver staining. *Acta Otolaryngol.* 2013;133 (11): 1181-1187.
7. Кунельская В.Я. Микозы в оториноларингологии. М.: Медицина, 1989: 44-98. [Kunelskaya V.Ya. Mikozyi v otorinolaringologii. M.: Meditsina, 1989: 44-98. (In Russ)].
8. Chakrabarti A., Sharma S.C. Paranasal sinus mycosis. *Indian J. Chest Dis. Allied Sci.* 2000; 42: 293-304.
9. Mohammadi A., Hashemi S. M., Abtahi S. H., et al. An investigation on non-invasive fungal sinusitis; molecular identification of etiologic agents. *J. Res. Med. Sci.* 2017; 22: 67.
10. Chander J., Jain R., Singla N., et al. *Aspergillus* fungal rhinosinusitis histopathological categorization and correlation with total serum ige anibg patients presenting to tertiary care centre in northern India. *Abst. 7<sup>th</sup> Advances Against Aspergillosis Conference.* 2016.
11. Bassiri J.S., Khaksar A.A. Paranasal sinus mycosis in suspected fungal sinusitis. *Iranian J. Clin. Infect. Dis.* 2006; 1 (1): 25-29.
12. Willinger B., Obradovic A., Selitsch B., et al. Detection and identification of fungi from fungus balls of the vaxillary sinus by molecular techniques. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41 (2): 581-585.
13. Zhao Z., Li L., Wan Z., Chen W., et al. Simultaneous Detection and Identification of *Aspergillus* and *Mucorales* species in tissues collected from patients with fungal rhinosinusitis. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49 (4): 1501-1507.
14. Kogan M., Castilo C.C., Barber M.S. Chronic rhinosinusitis and irritable bowel syndrome: a case report. *Integr. Med.* 2016; 15 (3): 44-54.
15. Badiee P., Moghadami M., Rozbehani H. Comparing immunological and molecular tests with conventional methods in diagnosis of acute invasive fungal rhinosinusitis. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2016; 31 (10): 90-95.
16. Swarajyalakshmi M., Jyothilakshmi G. *Candida kefyr* in invasive paranasal sinusitis. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2014; 66 (1): 371-374.
17. Dai L. D., Yang H., Xu B., et al. Primary cryptococcosis of paranasal sinus in immunocompetent patient: two cases report and review of literature. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2017; 10 (1): 1339-1344.
18. Stammberger H., Jakse R., Beaufort M.D. Aspergillosis of the paranasal sinusitis. *Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology.* 1984; 1 (1): 251-256.
19. Stammberger H. Aspergillosis of the paranasal sinuses. X-ray diagnosis, histopathology and clinical aspects. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1989; 93: 251-256.
20. Shah P.D., Deokule J.S. Isolation of *Aspergillus nidualans* from a case of fungal rhinosinusitis: a case report. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2007; 50 (3): 677-678.
21. Shah N.J., Rathore A. Intracranial extension of fungal sinusitis. *Otorhinolaryngol Clin. Int. J.* 2009; 1 (1): 55-61.
22. Pagella F., Pusateri A., Matti E., et al. Spheroid sinus fungus ball: our experience. *Am. J. Rhinol. Allergy.* 2011; 25 (4): 276-280.
23. Подковальников С.Л., Шадривова О.В., Хостелиди С.Н. и др. Инвазивный аспергиллез околоносовых пазух у больных в Санкт-Петербурге. Проблемы медицинской микологии. 2016; 18 (3): 16-19. [Podkovalnikov S.L., Shadrivova O.V., Hostelidi S.N. i dr. Invazivniy aspergillez okolonosovyih pazuh u bolnyih v Sankt-Peterburge. Problemy meditsinskoy mikologii. 2016; 18 (3): 16-19. (In Russ)].
24. Rudwan M.A., Sheikh H.A. Aspergilloma of paranasal sinuses - a common cause of unilateral proptosis in Sudan. *Clin. Radiol.* 1976; 27 (4): 497-502.
25. Byard R.W., Richard A. Bonin R.A., et al. Invasion of paranasal sinuses by *Aspergillus oryzae*. *Mycopathologia.* 1986; 96 (1): 41-43.
26. Dhaliwall M., Bal A., Das A., et al. Fungal rhinosinusitis: experience at a tertiary case centre in India. *Absr. 4<sup>th</sup> Advance Against Aspergillosis.* 2010.
27. Singhal N., et al. Fine needle aspiration cytology: a useful technique for diagnosis of invasive fungal rhinosinusitis. *Head and Neck Pathol.* 2013; 7: 236-240.
28. Шагдилеева Е.В., Хостелиди С.Н., Рауш Е. Р. и др. Случай успешного лечения микст-микоза – инвазивного кандидоза (кандемии) и неинвазивного аспергиллеза (легких, придаточных пазух и мягких тканей носа) у пациента с неходжкинской лимфомой. Проблемы медицинской микологии. 2013; 15 (1): 22-26. [Shagdileeva E.V., Hostelidi S.N., Raush E. R. i dr. Sluchay uspešnogo lecheniya mikst-mikoza – invazivnogo kandidoza (kandedemii) i neinvazivnogo aspergilleza (legkih, pridatochnyih pazuh i myagkih tkaney nosa) u patsienta s nehodzhhinskoy limfomoy. Problemy meditsinskoy mikologii. 2013; 15 (1): 22-26 (In Russ).]
29. Nazeri M., Hashemi S.J., Ardehali M., et al. Fungal rhino sinusitis in Tehran, Iran. *Iran J. Public Health.* 2015; 44 (3): 374 - 379.
30. Marple B.F. Allergic fungal sinusitis: A review of clinical manifestations and current treatment strategies. *Medical Mycology.* 2006; 44: 277-284.
31. Glass D., Amedee R.G. Allergic fungal rhinosinusitis. A Review. *The Ochsner J.* 2011; 11: 271-275.
32. Schubert M.S. Fungal rhinosinusitis: diagnosis and therapy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2001; 1: 268-276.
33. Buzina W., Braun H., Schimpl K., et al. *Bipolaris spicifera* causes fungus balls of the sinuses and triggers polypoid chronic rhinosinusitis in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41 (10): 4885-4887.
34. Swami T., Pannu S., Kumar M., Gupta G. Chronic invasive fungal rhinosinusitis by *Paecilomyces variotii*: a rare case report. *Indian J. Med. Microbiol.* 2016; 34 (1): 103-106.
35. Sangoi A.R., Rogers W.M., Longacre T.A., et al. Challenges and pitfalls of morphologic identification of fungal infections in histologic and cytologic specimens. A ten-years retrospective review at a single institution. *Am. J. Pathol.* 2001; 131: 364-375.
36. Gamba P., Lombardi C. Eosinophil fungal rhinosinusitis caused by *Fusarium* infection secondary to odontogenic maxillary sinus disease: when collaboration between otolaryngologist and allergologist leads to the correct diagnosis and therapy. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 2017; 49 (3): 138-142.
37. Vennewald I., Henker M., Klemm E., Seebacher C. Fungal colonization of the paranasal sinuses. *Mycoses.* 1999; 42 (2): 33-36.
38. Gupta A., Xess I., Sharma S.C., Mallick S. Invasive rhinosinusitis by *Exserohilum rostratum* in an immunocompetent child. *DMJ Case Rep.* 2014; 7.
39. Bartynski J.M., Mc Caffrey T.V., Frigas E. Allergic fungal sinusitis secondary to dematiaceous fungi *Curvularia lunata* and

- Alternaria*. Otolaryngol. Head Neck Surg. 1990; 103: 32-39.
40. Cavanna C., Seminari E., Pusateri A., et al. Allergic fungal rhinosinusitis due to *Curvularia lunata*. New Microbiol. 2014; 37 (2): 241-245.
  41. Doby J.M., Kombila-Favry M. Présence de formes sexuées (cleistothéces et Hülle cells) dans un cas humain d'aspergillose du sinus maxillaire chez *Aspergillus nidulans* associé à *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia*.1978; 64:157.
  42. Степанова А.А., Сеницкая И.А., Авдеенко Ю.Л. Субмикроскопическое изучение клеток вегетативного мицелия *Aspergillus fumigatus* Fres. Проблемы медицинской микологии. 2004; 6 (3): 34-40. [Stepanova A.A., Sinitzkaya I.A., Avdeenko Yu.L. Submikroskopicheskoe izuchenie kletok vegetativnogo mitseliya *Aspergillus fumigatus* Fres. Problemyi meditsinskoy mikologii. 2004; 6 (3): 34-40.(In Russ)].
  43. Latgé J.-P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin. Microbiol. Rev. 1999; 12 (2): 310-350.
  44. Zhang J., Debets A.J., Verweij P.E., et al. Asexual sporulation facilities adaptation: the emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Evolution. 2015; 10: 2573-2586.
  45. Naik M.N., Vemuganti G.K., Honavar S.G. Primary orbital aspergilloma of the exenterated orbit in an immunocompromised patient. Case Report. 2006; 24 (3): 233-234.
  46. Metson M.D., Mardon N., Ralph B. Fungal sinusitis. The Harvard medical school guide to healing your sinuses. New York, 2005: 153-157.

Поступила в редакцию журнала 24.10.2017

Рецензент: Шевяков М.А.





**ПАМЯТИ ГЛАВНОГО  
РЕДАКТОРА ЖУРНАЛА  
«ПРОБЛЕМЫ  
МЕДИЦИНСКОЙ  
МИКОЛОГИИ» З.Д.Н. РФ,  
Д.Б.Н., ПРОФЕССОРА  
ЕЛИНОВА НИКОЛАЯ  
ПЕТРОВИЧА**

2 ноября 2017 г. на 90-м году жизни после продолжительной тяжелой болезни скончался профессор Николай Петрович Елинов – почетный доктор СЗГМУ им. И.И. Мечникова, академик СПБИА, з.д.н. Российской Федерации, д.б.н., профессор, выдающийся ученый с мировым именем, внесший существенный вклад в развитие медицинской микробиологии, микологии и биотехнологии в Российской Федерации.

Николай Петрович – разносторонне образованный учёный в области микробиологии, биохимии, биотехнологии, микологии и фармации, педагог и организатор – ярчайший пример человека, достигшего профессионального совершенства упорным трудом.

Уроженец деревни Сыромьяские Выселки Сосновоборского района Пензенской области, получивший аттестат о неполном среднем образовании в день начала Великой отечественной войны, был направлен в числе 5% отличников после окончания фармацевтического училища в Ленинградский химико-фармацевтический институт. Будущий профессор Елинов начинал свою научную деятельность в студенческом научном обще-

стве под руководством заведующего кафедрой микробиологии профессора Павла Николаевича Кашкина, став его лучшим учеником, а, впоследствии, и преданным другом. В последующем их близкая дружба и сотрудничество продолжались в течение 45 лет – с 1947 до 1992 года.

С отличием завершив обучение в ЛХФИ по фармацевтической специальности в 1950 году, Н.П. Елинов сохранил свою приверженность *alma mater*, продолжив научную работу в качестве аспиранта сначала на кафедре технологии антибиотиков, а затем – на кафедре микробиологии. Изучая влияние антибиотиков на изменчивость патогенных кокков, он впервые обнаружил в крови кроликов фактор, обеспечивающий завершенность фагоцитоза гонококков и менингококков, и, напротив, отсутствие такого фактора в крови человека. После защиты кандидатской диссертации в 1953 г. Николай Петрович был назначен деканом двух факультетов ЛХФИ – инженерно-микробиологического и фармацевтического одновременно (1953-1956 гг.), проявив свои организаторские способности и выраженную склонность к научно-исследовательской работе. В 1961 г. его рекомендовали для поездки в США в целях изучения микромицетов – возбудителей особо опасных эндемических микозов – кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и некоторых бластомикозов у известных микологов США (Ч. Эммонса, Р.О. Эгберга, Х.Ф. Хасекливера, Дж. Беннетта, К.Дж. Квон-Чунг и др.). Привезенные из командировки грибы-патогены при системных микозах составили основу Российской коллекции патогенных грибов, с которыми были проведены и выполняются в настоящее время различные важные научные исследования в нашей стране.

В 1963 г. он блестяще защитил диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических наук на тему «Биология дрожжеподобных грибов рода *Candida*» в Ленинградском ГИДУВе (ныне – СЗГМУ им. И.И. Мечникова) и был утвержден в ученом звании профессора, а в 1968 г. – избран Ученым Советом ЛХФИ на должность заведующего кафедрой микробиологии. Николай Петрович переизбирался на эту должность до 1997 г., возглавляя кафедру без малого 29 лет, где под его руководством впервые в нашей стране были созданы оригинальные учебные дисциплины: химическая микробиология, микробиология продуцентов биологически активных веществ, основы биотехнологии, основы промышленной асептики. Им же написаны соответствующие учебники и учебные пособия, которыми пользуются преподаватели и студенты вузов России и в настоящее время.

Особого упоминания заслуживает стремление Н.П. Елинова получить медицинское образование, учитывая его научную работу для здравоохранения по биологии возбудителей кандидоза. В 1966 г. Николай Петрович с отличием закончил Ленинградский Педиатрический медицинский институт по специальности «педиатрия».

Работая в течение 12 лет в должности проректора по научной работе, и, затем, с 1972 г. по 1986 г. возглавляя ЛХФИ, Н.П. Елинов создал эффективную систему образования, при которой вуз стал основным поставщиком высокообразованных инженеров-технологов, впоследствии составивших ядро инженерно-технических кадров, обеспечивавших пуск новых заводов и

цехов предприятий на территории бывшего СССР, где производили все необходимые лекарственные препараты для населения.

Интенсивная организационная работа сопровождалась активной научной деятельностью: профессор Н.П. Елинов первым в нашей стране поставил проблему «микробные полисахариды» на «рельсы» комплексной разработки; в результате исследований грибных эндо- и экзогликанов им, вместе с коллективом учеников и помощников, были расшифрованы химическое строение и биологические свойства аубазидана из *Aureobasidium pullulans* (штамм №8), родэксмана из *Rhodotorula mucilaginosa* (*R. rubra*, штамм №14) из большинства известных видов криптококков и др. Многоплановые исследования микробных полисахаридов были завершены не только познанием их химического строения и биологической активности, но и внедрением в практику (аубазидан, аубазипор, родэксман, ронасан и ряд других препаратов на их основе), а также предложением уточненной классификации углеводов в 1989 г.

Еще в начале 70-х годов XX в. Н.П. Елинов выдвинул плодотворную гипотезу об общебиологической защитной роли углеводов на молекулярном и всех других уровнях организации живой материи. Опираясь на нее, руководимый им коллектив нашел в природных гликанах обширный запас новых веществ, полезных для различных сфер человеческой деятельности (лекарственные, пищевые, технические средства, адъюванты, иммуномодуляторы, детоксикаторы и пр.); впервые было доказано противоопухолевое и противовоспалительное действия ряда дрожжевых гликанов.

Николай Петрович индуцировал исследования в области действия и эффектов поверхностно-активных веществ (ПАВ) на микроорганизмы и обосновал необходимость включения в физико-химическую характеристику веществ природного и синтетического происхождения показателей их поверхностной активности, от которых во многом зависят побочные (в том числе – токсические) реакции, например, некоторых лекарственных препаратов на макроорганизм.

По инициативе Н.П. Елинова ПАВ были изучены и применены в защите различных материалов и конструкций от биоповреждений микроорганизмами (включая грибы).

Его обширная библиография включает более 500 научных публикаций: множество монографий, учебников, научно-методических пособий, 70 авторских свидетельств на изобретения и патентов, дипломов на открытие.

Следует особо подчеркнуть факт создания Николаем Петровичем школы учеников и последователей, включающей 11 докторов и 52 кандидата наук. Являясь строгим научным руководителем, Николай Петрович верил в успехи своих учеников, поддерживал, прислушивался к их мнению и помогал воплощать идеи.

Многолетнее изучение дрожжевых организмов и их результаты привлекли внимание международной научной общественности – в 1968 г. Николай Петрович был избран в состав Дрожжевой Комиссии Международной Ассоциации Микробиологических Обществ (МАМО). В 1979 г. в.н.с. Всероссийской коллекции микроорганизмов института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН В.И. Голубев назвал выделен-

ный им новый вид дрожжей как *Cryptococcus elinovii*, учитывая заслуги Н.П. Елинова в изучении этой группы микромикетов.

В 1997 г. Н.П. Елинов получил приглашение на работу в качестве ведущего научного сотрудника и заместителя заведующего научно-исследовательского отдела консервации и реставрации фондов библиотеки РАН, где за короткий период он внедрил с коллективом сотрудников бицид из группы ПАВ под названием «Ликводек» – деконтаминирующий раствор, используемый против широкого спектра микроорганизмов – контаминантов, способных нанести значительный ущерб сохраняемым фондам.

В 1998 г. профессор Елинов Н.П. приступил к работе в качестве заместителя директора по научной работе в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования – СПб МАПО (ныне – СЗГМУ им. И.И. Мечникова).

Н.П. Елинов активно участвовал в подготовке всех необходимых материалов для открытия учебных специальностей «Клиническая микология» и «Лабораторная микология», что и было реализовано в изданных Министерством здравоохранения приказах от 21 марта 2003 г. №115 и №116. Тем самым, впервые за всю историю медицинского образования в России была узаконена сертифицированная подготовка врачей – клинических микологов и врачей – лабораторных микологов. За пять лет первичную сертифицированную подготовку по медицинской микологии (клинической и лабораторной) прошли около 300 специалистов.

В 1999 г. им создана редакционная коллегия и научно-редакционный совет нового, оригинального научно-практического профессионального журнала «Проблемы медицинской микологии». Журнал включен в Перечень «Ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук», в Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), а также в реферативный журнал и базы Всероссийского института научной и технической информации РАН (ВИНИТИ). Ныне журнал приобрел известность в нашей стране и за рубежом.

Профессор Елинов Н.П. – учёный с мировым именем, многократно представлявший нашу страну на международных симпозиумах и конференциях, также он активно участвовал в организации и проведении ежегодных конференций по медицинской микробиологии (Кашкинские чтения).

Труд профессора Елинова отмечен правительственными наградами: орденом «Знак Почета», орденом «Трудового Красного Знамени», медалью «Ветеран Труда», а также знаками «Отличник здравоохранения», «Отличник медицинской промышленности», Золотой медалью М.В. Ломоносова и др. За выдающиеся заслуги в развитии отечественной микологии в 2004 г. профессор Елинов Н.П. был первым награжден дипломом лауреата премии им. П.Н. Кашкина. К 122-летней годовщине со дня основания ГИДУВа 01.06.2007 г. на торжественном заседании ученого совета академии проф. Н.П. Елинов был избран Почетным доктором СПб МАПО.

Николай Петрович был глубоко предан микробио-

логии (в том числе – микологии) и все свободное время в последние годы посвящал выполнению научно-практических задач, стоящих перед коллективом НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина; он всегда стремился помочь молодежи и всем, нуждающимся в его консультативной помощи.

Благодаря выдающимся способностям, необыкновенной жизненной энергии, Николай Петрович работал с полной самоотдачей, при этом отличался добротой и отзывчивостью, чуткостью и вниманием. Николай Петрович был блестящим ученым, умевшим увлечь своей любовью к науке поколения молодых ученых.

***Редколлегия журнала «Проблемы медицинской микологии», коллектив НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, сотрудники кафедры медицинской микробиологии, кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии и кафедры дерматовенерологии скорбят об утрате незаменимого сотрудника, учителя, друга и выражают искренние соболезнования родным и близким.***

***Светлая память о Николае Петровиче Елинове навсегда сохранится в сердцах его коллег и учеников.***



**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»**  
Per. № 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 10.01.2018. Формат 60×90 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.  
Усл. печ. л. 8.5. Тираж 999 экз.