

# ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

---

Том 20 №3



---

Problems in medical mycology

Vol.20 №3

**2018**

# ЛОЦЕРИЛ® – СТИЛЬНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ГРИБКА НОГТЕЙ

ТЕПЕРЬ ПО ЦЕНЕ  
ДО

# 40%

НИЖЕ



• GALDERMA | Галдерма

Рег. удостоверение П N012558/01

\* ООО Галдерма снижает отпускную цену на препарат Лоцерил® на 40% с 1 марта 2018 года.

\*\* Снижение цены производителем не гарантирует снижение цены для потребителя

**ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ  
НЕОБХОДИМО ПРОКОНСУЛЬТИРОВАТЬСЯ СО СПЕЦИАЛИСТОМ**



#### EDITORIAL BOARD

##### **Chief Editor —**

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

##### **Deputies Chief Editor —**

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

N.N.Klimko — M.D., prof. (Russia)

##### **Responsible secretary —**

T.S. Bogomolova — Ph.D. (Russia)

##### **Manager of Editorial Office —**

E.S. Gukova, elena.gukova@szgmu.ru

#### 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), 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. 20, № 3, 2018*

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

## ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

*Том 20, № 3, 2018*

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

##### **Заместители главного редактора:**

К.И. Разнатовский — д.м.н., профессор (Россия),

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

##### **Ответственный секретарь —**

Т.С. Богомолова — к.б.н. (Россия)

##### **Заведующая редакцией —**

Е.С. Гукова, elena.gukova@szgmu.ru

#### НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Н.А. Беляков — д.м.н., акад. РАМН, профессор (Россия),  
Дж. Беннетт — доктор медицины (США), С.А. Бурова —  
д.м.н., профессор (Россия), М.А. Вивиани — доктор  
медицины (Италия), В.И. Голубев — д.б.н., вед.н.с.  
(Россия), Б. Дюпон — доктор медицины (Франция),  
З.О. Караев — д.м.н., профессор (Азербайджан),  
К.П. Кашкин — д.м.н., академик РАМН, профессор  
(Россия), В.Г. Корнишева — д.м.н., профессор  
(Россия), В.Г. Кубась — 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), Ф.П. Романюк — д.м.н.,  
профессор (Россия), А.В. Самцов — д.м.н., профессор  
(Россия), А.В. Соболев — д.м.н., профессор (Россия),  
А.А. Степанова — д.б.н. (Россия), Х.И. Титц — доктор  
медицины (Германия), Т.Н. Трофимова — д.м.н.,  
профессор (Россия), О.Г. Хурцилава — д.м.н., проф.  
(Россия), В.А. Цинзерлинг — д.м.н., профессор  
(Россия), Н.В. Шабашова — д.м.н., профессор (Россия),  
М.А. Шевяков — д.м.н., профессор (Россия)

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

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

## СОДЕРЖАНИЕ

### ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ И ОБЗОРЫ

<i>Васильева Н.В., Круглов А.Н., Степанова А.А., Чилина Г.А., Босак И.А., Богомолова Т.С.</i> Цитологические особенности дрожжевых клеток мультирезистентного патогена <i>Candida auris</i> .....	3
<i>Тараскина А.Е., Фролова Е.В., Шадривова О.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Десятник Е.А., Игнатьева С.М., Спиридонова В.А., Богомолова Т.С., Шульгина М.В., Бойко И.Р., Копылов Е.Д., Чудиновских Ю.А., Успенская О.С., Шнейдер Т.В., Климко Н.Н. Васильева Н.В.</i> Влияние аллельных вариантов промоторной области гена CXCL10 на содержание интерферон-гамма индуцибельного протеина 10 (IP-10) в крови онкогематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом .....	8
<i>Корнищева В.Г., Кукушкина К.С.</i> Значение витамина D в иммунной системе и патогенезе аутоиммунных процессов кожи (обзор) . . .	15

### КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

<i>Климко Н.Н., Рубинчик В.Е., Соболев М.М., Ларионова В.Б., Тьренко В.В., Талипова Л.И., Журавель С.В., Петрова Е.В., Трухина Т.Н., Козлова О.П.</i> Результаты проспективного многоцентрового исследования применения анидулафунгина – ЭРА (Эраксис в Российской Федерации) .....	21
<i>Тилавердиев Ш.А., Климко Н.Н.</i> Оппортунистические микозы у иммунокомпрометированных больных с гемобластомами и ВИЧ-инфекцией .....	26

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

<i>Халдеева Е.В., Лисовская С.А., Глушко Н.И., Баязитова А.А.</i> Сравнительная характеристика культурально-морфологических и биохимических свойств природных и клинических изолятов <i>Aspergillus niger</i> .....	30
<i>Степанова А.А., Васильева Н.В., Ямагучи М., Чибана Х., Чилина Г.А., Босак И.А.</i> Цитологическое изучение динамики миграции клеточных компонентов в ходе почкования <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	34
<i>Лисовская С.А., Халдеева Е.В., Измайлова Г.Р., Мухамеджанова Л.Р.</i> Анализ вирулентной активности штаммов <i>Candida albicans</i> , выделенных со слизистой оболочки языка у пациентов с хроническим кандидозным глосситом. ....	40
<i>Степанова А.А., Васильева Н.В., Выборнова И.В., Босак И.А., Чилина Г.А.</i> Ультраструктура клеток штаммов <i>Candida albicans</i> и <i>Candida parapsilosis</i> , чувствительных и устойчивых к азолам. ....	44

## CONTENTS

### PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

<i>Vasilyeva N.V., Kruglov A.N., Stepanova A.A., Chilina G.A., Bosak I.A., Bogomolova T.S.</i> Cytological features of multi-resistance <i>Candida auris</i> yeast cells .....	3
<i>Taraskina A.E., Frolova E.V., Shadrivova O.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Desyatnik E.A., Ignatieva S.M., Spiridonova V.A., Bogomolova T.S., Shulgina M.V., Boykol.R., Kopylov E.D., Chudinovskikh Y.A., Uspenskaya O.S., Schneider T.V., Klimko N.N., Vasilyeva N.V.</i> CXCL10 gene promoter allelic variants modulate serum interferon-gamma inducible protein of 10 kDa (IP-10) levels in oncohematological patients with invasive aspergillosis. ....	8
<i>Kornisheva V.G., Kukushkina K.S.</i> Significance of vitamin D in the immune system and pathogenesis of the autoimmune processes of the skin (review) .....	15

### CLINICAL MYCOLOGY

<i>Klimko N.N., Rubinchik V.Ye., Sobol M.M., Larionova V.B., Tyrenko V.V., Talipova L.I., Zhuravel S.V., Petrova E.V., Trukhina T.N., Kozlova O.P.</i> Multicenter observational study on anidulafungin using – ERA (Eraxis in Russia) .....	21
<i>Tilavberdiev Sh.A., Klimko N.N.</i> Opportunistic mycosis in immunocompromized patients with hemoblastosis and HIV-infection .....	26

### EXPERIMENTAL MYCOLOGY

<i>Khaldeeva E.V., Lisovskaya S.A., Glushko N.I., Bayazitova A.A.</i> Comparison of cultural-morphological and biochemical properties of environmental and clinical isolates of <i>Aspergillus niger</i> .....	30
<i>Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Yamaguchi M.M., Chibana H., Chilina G.A., Bosak I.A.</i> Cytological investigations of cell components migration dynamics during budding in the yeast <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	34
<i>Lisovskaya S.A., Khaldeeva E.V., Izmailova G.R., Mukhamedzhanova L.R.</i> Analysis of virulent activity of <i>Candida albicans</i> strains isolated from the mucous membrane of the tongue in patients with chronic candidal glossitis .....	40
<i>Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Vybornova I.V., Bosak I.A., Chilina G.A.</i> Ultrastructure of cells of <i>Candida albicans</i> and <i>Candida parapsilosis</i> strains resistant and susceptible to azoles. ....	44

## ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНОГО ПАТОГЕНА *CANDIDA AURIS*

<sup>1</sup>Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой), <sup>2</sup>Круглов А.Н. (зав. лаб.), <sup>1</sup>Степанова А.А. (зав. лаб.), <sup>1</sup>Чилина Г.А. (зав. лаб.), <sup>1</sup>Босак И.А. (с.н.с.), <sup>1</sup>Богомолова Т.С. (зав. лаб.)

<sup>1</sup>НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>Национальное агентство клинической фармакологии и фармации, Москва, Россия

©Коллектив авторов, 2018

В работе представлены данные по микроморфологии и ультраструктуре выращенных *in vitro* дрожжевых клеток *Candida auris* (РКПГУ-1821). Отличие мультирезистентного штамма *C. auris* от других видов рода *Candida*, в том числе резистентных, состоит в: 1) мелких размерах клеток в сочетании с толстой клеточной стенкой и небольшим диаметром рубчика(ов); 2) наличии несколько рубчиков в составе клеточной стенки; 3) присутствии в зрелых дрожжевых клетках внеклеточного липидного «гало». Описан новый способ вторичного использования запасных липидов зрелой дрожжевой клеткой, происходящий с участием вакуолей.

**Ключевые слова:** *in vitro*, *Candida auris*, культура, микроморфология, мультирезистентность, ультраструктура

## CYTOLOGICAL FEATURES OF MULTI-RESISTANCE *CANDIDA AURIS* YEAST CELLS

<sup>1</sup>Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the department), <sup>2</sup>Kruglov A.N. (head of the laboratory), <sup>1</sup>Stepanova A.A. (head of the laboratory), <sup>1</sup>Chilina G.A. (head of the laboratory), <sup>1</sup>Bosak I.A. (senior scientific collaborator), <sup>1</sup>Bogomolova T.S. (head of the laboratory)

<sup>1</sup>Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, <sup>2</sup>National Agency of Clinical Pharmacology and Pharmacy, Moscow, Russia

©Collective of authors, 2018

In the present paper the data about the morphology and ultrastructure of *C. auris* (РКПГУ-1821) yeast cells growing *in vitro* were presented. Differences of multi-resistant strain *Candida auris* from another species of genus *Candida*, including resistant, consist in: 1) small cell sizes in combination with thick cell wall and small diameter of scar(s); 2) presence of several scars in the composition of cell wall; 3) presence of the extracellular lipids «halo» in the mature yeast cells. The new way of secondary using of vacuole lipids of mature yeast cells carried out with the participation of vacuoles was described.

**Key words:** *in vitro*, *Candida auris*, culture, morphology, multi-resistance, ultrastructure

## INTRODUCTION

*Candida auris* is an emerging multidrug-resistant fungal pathogen causing nosocomial and invasive infections associated with high mortality rate [1]. The first *C. auris* was isolated from the external ear canal of a patient in Japan in 2009 [2]. It was an emerging multidrug-resistant pathogen that was difficult to identify using traditional biochemical methods. *C. auris* has been recovered in samples from blood, catheter tips, cerebrospinal fluid, bone, ear discharge, pancreatic fluid, pericardial fluid, peritoneal fluid, pleural fluid, respiratory secretions (including sputum and bronchoalveolar lavage), skin and soft tissue samples (both tissue and swab cultures), urine, and vaginal secretions. Clinically, it has been implicated as a causative agent in fungemia, ventriculitis, osteomyelitis, malignant otitis (including otomastoiditis), complicated intra-abdominal infections, pericarditis, complicated pleural effusions, and vulvovaginitis [3]. The data of the morphology of *C. auris* yeast cells are very important and may shed light on the nature of its multidrug resistance. Thus, the aim of the present paper was to investigate the morphology of this species *in vitro* growing cultures of *C. auris* by using light- and transmission electron microscopy (TEM).

## MATERIALS AND METHODS

The *Candida auris* Satoh & Makimura strain РКПГУ-1821 (Russian collection of pathogenic fungi) was isolated for the first time in Russia from the blood of patient in 2017. *C. auris* was identified by MALDI-TOF mass spectrometry and DNA sequencing [4]. The strain was cultivated for 10 days in Sabouraud's medium and wort agar at 37 °C. The morphology of cultures was investigated on stereoscopic microscope Zeiss Stem 2000. The yeast cells structure was observed on Leica DMLB and Axio-images. Z1 (Carl Zeiss) light microscopes with Nomarski optics. For transmission electron microscope (TEM), different part of fungal colonies were fixed in 3% glutaraldehyde for 3 h and post-fixed in 1% osmium tetroxide for 10 h according to the technique described earlier [5].

The ultrathin sections were cut with a glass knife and stained with uranyl acetate and lead citrate. Finally, the sections were observed in JEM-100 SX TEM (JEOL, Tokyo, Japan).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Colony characteristic.** The average diameter of fungal colony after 10 days of growth at 37 °C on the Sabouraud's medium was 3,5 cm (Fig. 1 a), and on the wort agar – 3,5 x 4,0 cm (Fig. 1 b). Colonies were cream-colored, smooth, opaque, soft. On the periphery, the thin rim was present. The colony edge was fair.

**Microscopy.** During the using routine microscopy (Fig. 1 c) and with Nomarski optics (Fig. 1 d-g) the yeast cells were ovoid (3,0 x 4,0 μm), ellipsoidal (2,0-3,3 x 2,4-5,0 μm) to elongated and colorless. Yeast cells were single, in pair or in small groups. Budding cells were abundant (Fig. 1 d-g). Pseudomycelium was absent. Germ tubes were not formed.

**Ultrastructure of the yeast cells.** The sizes of *C. auris* mature yeast cell were in 2-3 times smaller in comparison with *C. albicans* [5, 6]. The fixation of different cells types of *Candida* spp. was very difficult that we explain this fact by the presence of pigments in its cytosol which absorb fixatives [5, 7, 8, et al.]. In this investigation, we also

\* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна, e-mail: amaliya.stepanova@sngmu.ru



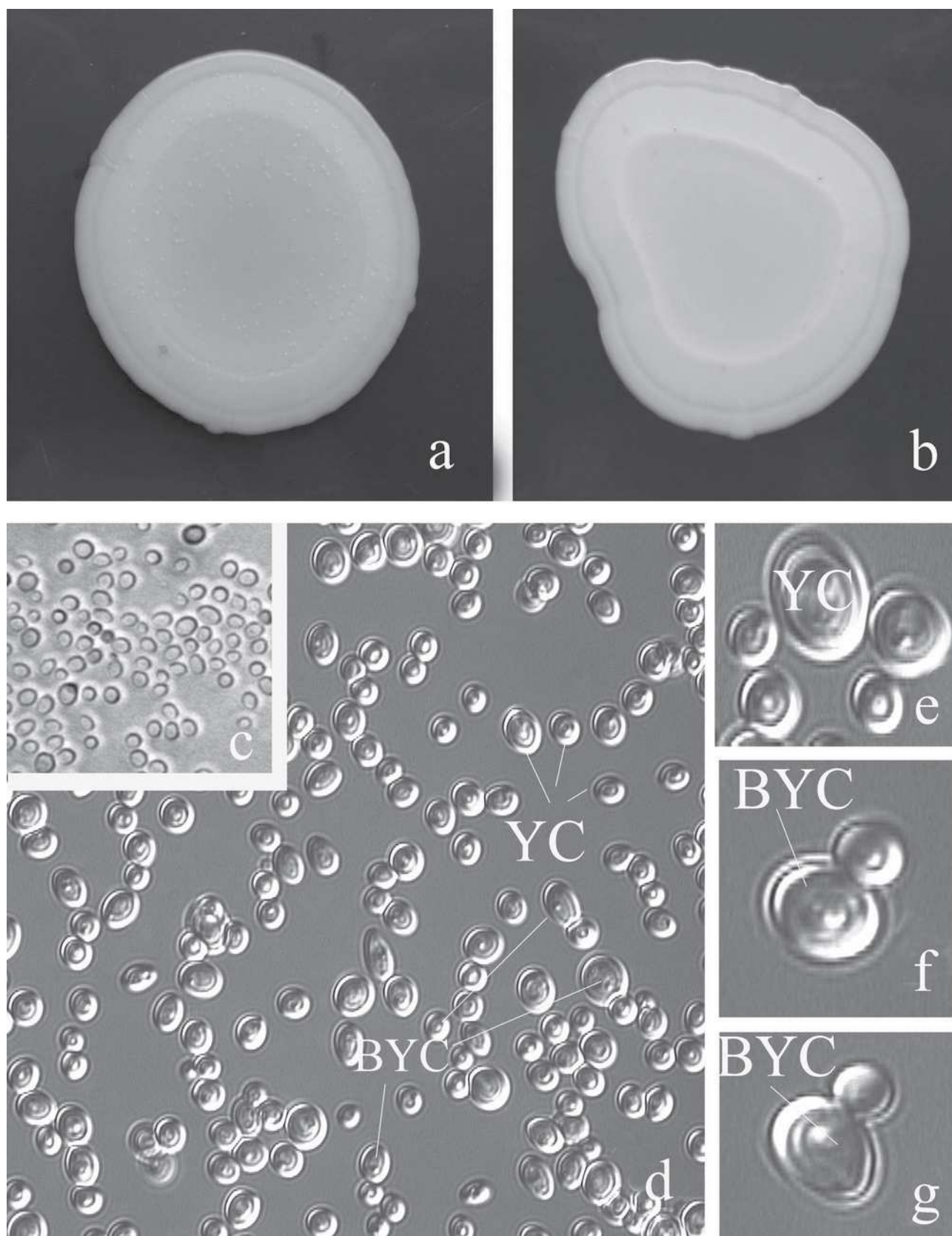


Fig. 1. *C. auris* colonies after 10 days cultivation on Sabouraud's medium (a) and wort agar (b). Light microscopy of *C. auris* yeast cells: on wort agar (c) and Sabouraud's medium (d - g). Explanation for this and another figures: Bd – bud, BYC – budding yeast cells, CW – cell wall, Hp – hyphae, LI – lipid inclusion, MC – mother cell, N – nucleus, P – plasma membrane, T – tonoplast, FL – flexible lipids, FLI – flexible part of lipid inclusion, V – vacuole; YC – yeast cell(s).

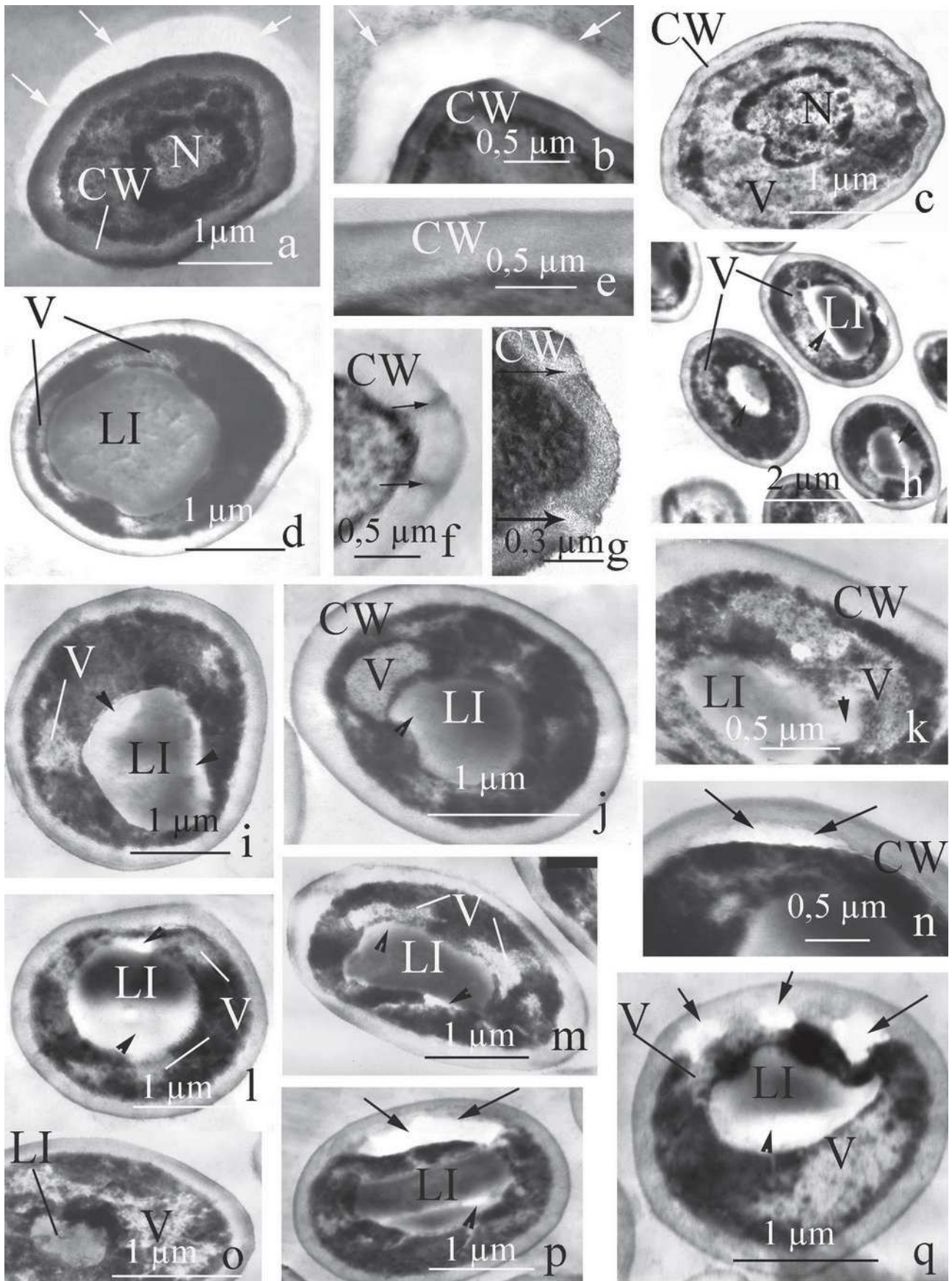


Fig. 2. Ultrastructure of in vitro growing yeast cells of *C. auris*.



obtain the medium quality fixation of *C. auris* yeast cells but we were lucky that independent of this situation may study the mechanism of extracellular lipids origination. The presence of ring from extracellular lipid (Fig. 2 a, b, arrows) the impeded the shooting the ultrathin sections so that they destroyed under TEM electronic beam. Thus, we must produce the sections shooting under TEM practically in dark field of vision and that use special conditions for negatives manifestation.

In the central part of the growing yeast cell, one nucleus (1,0 x 1,2 μm) with highly level of chromatization was present (Fig. 2 a, c). It is known that for fungi typical interphase nucleus were with lower level of chromatization and lower level of condensed chromatin which correlated with lower number of chromosome [9]. According the data Finn T. with co-authors. [10] for *C. auris* was typical the haploid genome. The higher level of interphase nucleus chromatization in yeast cells of *C. auris* can be caused by the large number of chromosomes in comparison with another candida species. However, for decision of this question needs further investigation.

In the mature (after completion of growth) yeast cells, the main volume was occupied by one large storage lipid inclusion (Fig. 2 d). Large vacuole was present in growing cell (Fig. 2 c), but several small vacuoles were present in mature ones (Fig. 2 d, h, i-m, o, q). The vacuolar content was filled with uniformly distributed fibrillar-granular materials, whose presence gives them a specific appearance.

The cell wall of *C. auris* mature yeast cells was in twice more thick (0,5-0,6 μm, fig. 2 e, f) than in *C. albicans* (0,3 μm) [5] and consist of two layers: outer thin dark layer (0,05-0,07 μm) and inner thick layer (0,45-0,53 μm) with moderate electron density. There are variable numbers of scars (from 1 to 3) on ultrathin sections in composition of yeast cell wall. We revealed several topography of scar localization (Fig. 3): apical (a), lateral (near apex) (b), apical-lateral (c) and apical-double lateral (d). For the yeast cells of another medically important *Candida* species were typical presence of one apically localized scar [4, fig. 2 g]. Sometimes we observed the simultaneous development 2-3 buds and daughter cells by one mother yeast cell. These morphological peculiarities give our species «carte blanche» in sense to win the space during the surface colonization and subsequent invasion in tissue.

The mean scar diameter in the *C. auris* mature yeast cells was (Fig. 2 f) two times small (0,12 μm) than in *C. albicans* (0,24 μm, fig. 2 g). It may be explained by small sizes of *C. auris* yeast cells. The scar in yeast cells of both species separated from cell walls with special «ring» which were 0,10 μm wide in *C. auris* (Fig. 2 f, arrows) and 1,15 μm – in *C. albicans* (Fig. 2 g, arrows). In this area of cell wall microfibrills were localized more loosely and this part of cell wall were more plastic so that the development of bud becomes possible. In *C. albicans* this «ring» was more light (Fig. 2 g, arrows), but it was moderate electron density in *C. auris* (Fig. 2 h, arrows). In our opinion, the scar «ring» was very vulnerable part of yeast cells wall for penetration of antifungals. More small area of scar «ring» in the *C. auris* yeast cells and thick wall made them more resistant in comparison with *C. albicans*.

The specific peculiarity of the structure of mature yeast cells of *C. auris* was the presence of extracellular light lipids «halo» (Fig. 2 a, b, arrows) or capsule with flat outer surface and thickness form 0,9 to 1,5 μm, which is 3,0-3,5 times

thicker than cell wall.

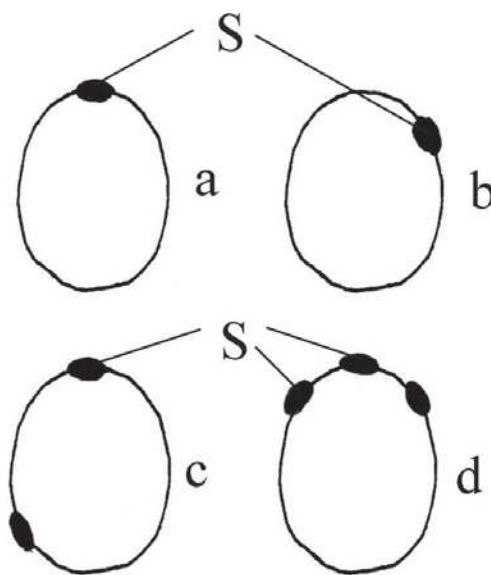


Fig. 3. Diagram showing the scar(s) topography in *C. auris* yeast cells. a – apical, b – lateral, c – apical-lateral, d – apical-double lateral.

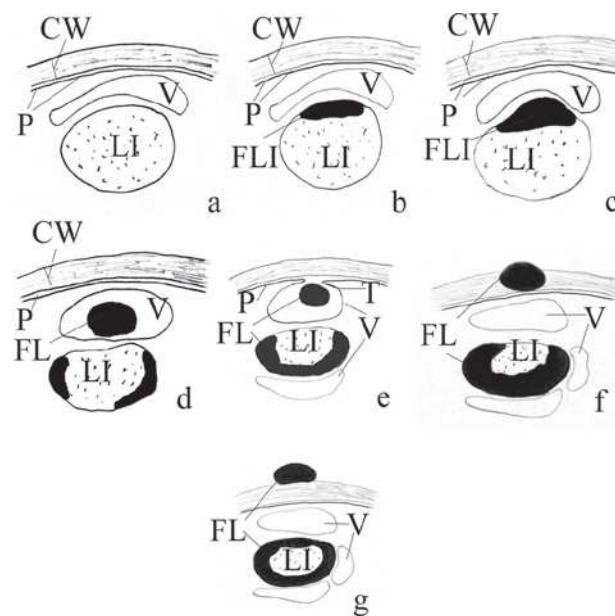


Fig. 4. Diagram showing the mechanism of formation of external «halo» from the secondary using of storage lipids of mature yeast cells *C. auris*.

We revealed the fine mechanism of the extracellular lipids origination in *C. auris* yeast cells. In mature yeast cells, the main volume occupied the large lipid inclusion (Fig. 2 d, 4 a). In this stage the volume of vacuole was significantly reduced. Several flat vacuole(s) localized between the large lipid inclusion and cell wall (Fig. 2 d, 4 a). Vacuole(s) «envelope» the lipid inclusion (Fig. 2 d, 4 a) and were in tight contact with them. Over time, the solid lipid inclusion passes into more flexible form (Fig. 2 h-m, q, arrowheads, 4 b, black coloring). This process of «soffening» may pass in periphery or inside lipid inclusion (Fig. 2 h-m, q, 4 b). Part of vacuole(s) cover the flexible (more light «gold like» on ultrathin sections) part of lipid inclusion (Fig. 2 h-j, 4 b, c) and by way which similar with autophagy absorbed the



part of lipid inclusion (Fig. 2 k, head of arrow, 4 d). Then by way of the exocytosis part of flexible lipid from vacuole appear in periplasmic space (Fig. 2 n, p, q, arrows, 4 e) and migrate through cell wall (Fig. 2 q, 4 f) on its surface (Fig. 2 a, b, arrows, 4 g). Soon the separate lipid globules on the yeast cell wall surfaces flow together and form unique light «halo» which is in early stage of development may be asymmetrical in thickness (Fig. 2 a) so that the process of migration of flexible lipids from internal part of cell to the surfaces of yeast cell wall was asynchronous.

Thus, in *C. auris* yeast cells we revealed the unique mechanism of secondary using the internal cellular storage lipid inclusion for external lipid «halo» production, which presence may be very important for its possible protection. The presence of extracellular light lipid «halo» also: 1) increased the adherent properties of our objects during the biofilm formation and in a whole biofilm resistance; 2) will create a problem for host cells of immune system. Contrary with external polysaccharide capsule in yeast cells of *Cryptococcus neoformans* [11, 12] extracellular light lipid «halo» in *C. auris* developed only in mature cells. According to the difference in the chemical composition this two cytological external cells attributes typical for some species of pathogenic fungi it was evident that lipid capsule was more resistant in comparison with polysaccharide one.

It was important that in filamentous fungi [*S. apiospermum*: 13; *S. aurantiacum*: 14] in the synthesis of external lipids was involved the tubular smooth tubules

of endoplasmic reticulum. Before we expect [13, 14] that the external lipids in this last species may contain pigments which determinate the colony coloring. Perhaps external lipids in this species demonstrated their high level of resistance also. As a rule, during fungal morphogenesis the storage lipids inside cells were used during germ tube or mycelium development, conidia and spores germination. But as a rule, they disintegrated and disappeared during fungal cells senescence. Thus, we revealed very «economical» type the secondary using of storage lipids which pass by way new type of «secretion» with participation of vacuoles. Perhaps, this last one was typical for another yeast cells, especially pathogenic.

## CONCLUSION

The data of present work allow considering that *C. auris* yeast cells multi-drug resistance may be caused by the complex of its features: 1) small sizes in combination with thick cell wall and small diameter of scar(s); 2) several scars in the composition of cell wall; 3) presence of the extracellular light lipids «halo» in mature yeast cells. But in our opinion, the last characteristic was the main in the understanding of its higher level of multi-resistance. Perhaps the presence of external «halo» from lipids represents the essential barrier for penetration of antifungals and set problem of elaboration of destroying the drug. However, it was unknown what following cellular mechanism of resistance may «use» yeast cell.

## REFERENCES

1. Chowdhary A., Sharma C., Meis J.F. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog.* 2017; 13 (5): e1006290.
2. Satoh K., Makimura K., Hasumi Y., et al. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol. Immunol.* 2009; 53 (1): 41-44.
3. Sears D., Schwartz B.S. *Candida auris*: an emerging multidrug-resistant pathogen. *Intern. J. Infect. Dis.* 2017; 63: 95-98.
4. Vasilyeva N., Kruglov A., Pchelin I.M., et al. The first Russian case of candidaemia due to *Candida auris*. *Abstr. 28 ECCMID, Madrid, Spain, 21-24 April, PO311.*
5. Степанова А.А., Шевяков М.А., Авдеенко Ю.Л. и др. Изучение слизистой оболочки пищевода при кандидозе у ВИЧ-инфицированного больного. *Проблемы медицинской микологии.* 2011; 13 (1): 54-61. [Stepanova A.A., Shevyakov M.A., Avdeenko Yu.L. i dr. Izuchenie slizistoj obolochki pishchevoda pri kandidoze u VICH-inficirovannogo bol'nogo. *Problemy medicinskoj mikologii.* 2011; 13 (1): 54-61 (In Russ)].
6. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А. и др. Краткий атлас медицински значимых микромицетов рода *Candida* / Под ред. з.д.н. РФ проф. Н.П. Елинова. СПб, 2013:73 с. [Elinov N.P., Vasilyeva N.V., Stepanova A.A. i dr. *Kratkij atlas medicinski znachimyh mikromicetov roda Candida* / Pod red. z.d.n. RF prof. N.P. Elinova. SPb, 2013:73 s. (In Russ)].
7. Staniszewska M., Bondaryk M., Siennicka K., Kurzatkowski W. Ultrastructure of *Candida albicans* pleomorphic forms: phase-contrast microscopy, scanning and transmission electron microscopy. *Polish J. Microbiol.* 2012; 61 (2): 129-135.
8. Li H., Gong H., Qi Y., et al. In vitro and in vivo antifungal activities and mechanism of heteropolytungstates against *Candida* species. *Scientific Rep.* 2017; 7. Article number: 16942.
9. Степанова А.А. Морфогенез грибов порядка Agaricales s.l. (сравнительный ультраструктурный анализ): Автореф. дисс... д.б.н. / АН СССР. Ботан. ин-т им. В.Л. Комарова. Л., 1990. [Stepanova A.A. *Morfogenez gribov poryadka Agaricales s.l. (sravnitel'nyj ul'trastrukturnyj analiz): Avtoref. diss... d.b.n.* / AN SSSR. Botan. in-t im. V.L. Komarova. L., 1990 (In Russ)].
10. Finn T., Novikov A., Bash E., Ben-Ami R. Epidemiology and clinical features of *Candida haemulonii* and *Candida auris* isolates in tertiary medical centre in Tel Aviv. *EV9033, Abstract.*
11. Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Yamaguchi M., et al. Ultrastructural investigations of the yeast→hyphal cell switching of the *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in murine brain. *Problems in medical mycology.* 2017; 19 (2): 19-24.
12. Васильева Н.В., Степанова А.А. Электронно-микроскопическое изучение клеточной стенки и капсулы зрелых клеток слабо и сильновирulentных штаммов *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* в ходе in vitro→in vivo трансформации. *Проблемы медицинской микологии.* 2018; 20 (1):18-24. [Vasilyeva N.V., Stepanova A.A. *Elektronno-mikroskopicheskoe izuchenie kletchoj stenki i kapsuly zrelyh kletok slabo i sil'novirulentnyh shtammov Cryptococcus neoformans var. neoformans v hode in vitro→in vivo transformacii. Problemy medicinskoj mikologii.* 2018; 20 (1):18-24 (In Russ)].
13. Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Bogomolova T.S., Chilina G.A. Cytological study of the in vitro growing cells of vegetative mycelium of *Scedosporium apiospermum*. *Problems in medical mycology.* 2017; 19 (1): 24-30.
14. Stepanova A.A., Yamaguchi M.M., Chibana H., et al. Comparative ultrastructural analysis of the in vitro growing hyphal cells of *Scedosporium aurantiacum*. *Problems in medical mycology.* 2017; 19(3): 18-25.

Поступила в редакцию журнала: 20.09.2018

Рецензент: М. Yamaguchi

# ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА CXCL10 НА СОДЕРЖАНИЕ ИНТЕРФЕРОН-ГАММА ИНДУЦИБЕЛЬНОГО ПРОТЕИНА 10 (IP-10) В КРОВИ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ С ИНВАЗИВНЫМ АСПЕРГИЛЛЕЗОМ

<sup>1</sup>Тараскина А.Е. (зав. лаб.)\*, <sup>1</sup>Фролова Е.В. (зав. лаб.), <sup>1</sup>Шадринова О.В. (доцент кафедры), <sup>1</sup>Учеваткина А.Е. (с.н.с.), <sup>1</sup>Филиппова Л.В. (с.н.с.), <sup>1</sup>Десятник Е.А. (врач-миколог), <sup>1</sup>Игнатъева С.М. (в.н.с.), <sup>1</sup>Спиридонова В.А. (н.с.), <sup>1</sup>Богомолова Т.С. (зав. лаб.), <sup>1</sup>Шульгина М.В. (зам. директора НИИ), <sup>1</sup>Бойко И.Р. (студент), <sup>1</sup>Копылов Е.Д. (студент), <sup>2</sup>Чудиновских Ю.А. (врач-гематолог), <sup>3</sup>Успенская О.С. (зав. отд.), <sup>3</sup>Шнейдер Т.В. (зав. отд.), <sup>1</sup>Климко Н.Н. (зав. кафедрой), <sup>1</sup>Васильева Н.В. (директор НИИ, зав кафедрой)

<sup>1</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микологии им. И.П. Кашкина и кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии; <sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова; <sup>3</sup>Ленинградская областная больница, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2018

*Прогнозирование течения и исходов инвазивного аспергиллеза (ИА) является актуальным вопросом, в решении которого немалую роль уделяют генетическим факторам риска. Интерферон-гамма индуцибельный протеин 10 (IP-10), кодируемый геном CXCL10, участвует в адаптивном иммунном ответе человека, а полиморфные варианты CXCL10 ассоциированы с риском возникновения и тяжестью течения некоторых инфекционных заболеваний.*

*В исследовании включено 178 онкогематологических пациентов с признаками поражения легких. Группу I составили 86 больных ИА, в группу контроля включили 92 пациента, у которых ИА был исключен в ходе обследования.*

*В ходе нашего исследования мы оценили функциональное значение однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) G-135A (rs56061981) и A-1447G (rs 4508917) промоторной области гена CXCL10 и их вклад в развитие ИА легких у онкогематологических больных, а также определили предполагаемую генетическую детерминанту, влияющую на продукцию IP-10 в сыворотке крови.*

*При сравнении частоты встречаемости генотипов и аллелей мы не обнаружили достоверных различий между больными ИА и группой контроля. Гомозиготный генотип GG дикого типа (rs56061981) значительно превалировал в обеих изучаемых группах, тогда как для rs4508917 отмечали превалирование гетерозиготного генотипа AG. Частота встречаемости минорного аллеля А (rs56061981) в группе онкогематологических пациентов без грибковой инфекции составила 0,04, что совпадает с частотой для Европейской популяции в целом. В ходе исследования мы установили, что аллельные варианты G-135A (rs56061981), по-видимому, не влияют на уровень*

\* Контактное лицо: Тараскина Анастасия Евгеньевна, e-mail: anastasiya.taraskina@szgmu.ru

*IP-10 в сыворотке крови, хотя присутствие аллеля А ассоциируется с незначительным повышением сывороточного хемокина, тогда как наличие минорного аллеля –1447G (rs4508917) связано с достоверно более высокими концентрациями IP-10 в сыворотке крови.*

*Расширение изучаемых групп пациентов и ОНП промоторной области CXCL10 позволит стратифицировать риски ИА с большей достоверностью.*

**Ключевые слова:** инвазивный аспергиллез, онкогематологические пациенты, генетические факторы риска, однонуклеотидный полиморфизм, иммунный ответ, интерферон-гамма индуцибельный протеин 10, CXCL10

## CXCL10 GENE PROMOTER ALLELIC VARIANTS MODULATE SERUM INTERFERON-GAMMA INDUCIBLE PROTEIN OF 10 KDA (IP-10) LEVELS IN ONCOHEMATOLOGICAL PATIENTS WITH INVASIVE ASPERGILLOSIS

<sup>1</sup>Taraskina A.E. (head of the laboratory), <sup>1</sup>Frolova E.V. (head of the laboratory), <sup>1</sup>Shadrivova O.V. (associate professor of the department), <sup>1</sup>Uchevatkina A.E. (senior scientific collaborator), <sup>1</sup>Filippova L.V. (senior scientific collaborator), <sup>1</sup>Desyatnik E.A. (physician-mycologist), <sup>1</sup>Ignatieva S.M. (leading scientific collaborator), <sup>1</sup>Spiridonova V.A. (scientific collaborator), <sup>1</sup>Bogomolova T.S. (head of the laboratory), <sup>1</sup>Shulgina M.V. (deputy director of the institute), <sup>1</sup>Boyko I.R. (student), <sup>1</sup>Kopylov E.D. (student), <sup>2</sup>Chudinovskikh Y.A. (hematologist), <sup>3</sup>Uspenskaya O.S. (head of the clinical department), <sup>3</sup>Schneider T.V. (head of the clinical department), <sup>1</sup>Klimko N.N. (head of the department), <sup>1</sup>Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the department)

<sup>1</sup>North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology; <sup>2</sup>National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Petrov; <sup>3</sup>Leningrad Regional Clinical Hospital, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2018

*Predicting the course and outcomes of invasive aspergillosis (IA) is an important issue in which a significant role is given to genetic risk factors. Interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) encoded by the CXCL10 gene is involved in the adaptive immune response of humans, and polymorphic variants of CXCL10 are associated with the risk and severity of certain infectious diseases.*

*The study included 178 oncohematological patients with signs of lung damage. Group I consisted 86 patients with IA, 92 patients were included in the control group, in whom IA was excluded during the examination.*

*In our study we evaluated the functional significance of single nucleotide polymorphisms (SNPs) G-135A (rs56061981) and A-1447G (rs 4508917) of the CXCL10 gene promoter region and their contribution to the development of lung IA in oncohematological patients, and determined the expected genetic determinant affecting the production of IP-10 in serum.*

*When comparing the frequency of occurrence of genotypes and alleles we did not find significant differences between patients with IA and the control group.*

*The wild-type gg homozygous genotype (rs56061981) significantly prevailed in both study groups while the predominance of the heterozygous AG genotype was noted for rs4508917. The incidence of minor allele A (rs56061981) in the group of oncohematological patients without fungal*



infection was 0,04 which coincides with the frequency for the European population as a whole.

In the study we found that allele variants of G-135A (rs56061981) do not appear to affect serum IP-10 levels although the presence of allele A is associated with a slight increase in the serum chemokine, while the presence of minor allele-1447G (rs4508917) is associated with significantly higher concentrations of IP-10 in serum.

The expansion of the studied groups of patients and SNPs of the CXCL10 promoter region will allow stratifying the risks of IA with greater reliability.

**Key words:** invasive aspergillosis, oncohematological patients, genetic risk factors, single nucleotide polymorphism, immune response, interferon gamma inducible protein 10, CXCL10

## ВВЕДЕНИЕ

Микроскопические грибы рода *Aspergillus* – сапрофиты имеют широкое повсеместное распространение. Размножаясь бесполом путем, они высвобождают тысячи конидий (спор) в окружающую среду. Малый размер конидий *Aspergillus* spp. (диаметр – 2-3 мкм) позволяет им проникать глубоко в респираторный тракт и достигать альвеол. У здоровых людей конидии плесневых грибов эффективно удаляются за счет механизмов мукоцилиарного клиренса и эффективного иммунного ответа. Однако при нарушении иммунного барьера человека аспергиллы могут вести себя как оппортунистические патогены, переходя к факультативному или облигатному паразитизму.

Инвазивный аспергиллез – угрожающее жизни инфекционное грибковое осложнение, возникающее преимущественно у иммунокомпрометированных лиц, большую часть которых составляют онкогематологические больные [1-3]. Известно, что в патогенезе ИА важная роль принадлежит изменениям иммунологической реактивности. По данным различных исследований, наибольшее значение имеют нарушения механизмов адаптивного иммунного ответа, а именно дифференцировки наивных CD4+ Т-лимфоцитов в различные клоны Т-хелперов (Th), так как именно их баланс определяет течение и исход грибковых инфекций. Цитокины – ключевые регуляторы провоспалительного (Th1) и противовоспалительного (Th2) иммунного ответа. Дисрегуляция баланса цитокинов Th1/Th2 и переход к Th2 иммунному ответу оказывают значительный вклад в развитие и неблагоприятный исход ИА [4-9].

Несмотря на известные факторы риска развития аспергиллезной инфекции, такие как постцитостатическая нейтропения, длительный прием кортикостероидов или иммуносупрессоров, частота развития ИА у пациентов со схожими клиническими проявлениями различна. Известно, что предрасположенность к развитию ИА включает в себя многие факторы, и среди них немалую роль отводят генетическому полиморфизму генов, кодирующих белки иммунной системы, в том числе хемокины и цитокины. Основу генетического полиморфизма, приводящего к изменению функциональности гена и фенотипических характеристик белка, составляют точечные нуклеотидные изменения ДНК – однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) (от англ. SNP – *single nucleotide polymorphism*) [10-14].

Интерферон-гамма индуцибельный протеин 10 (IP-10), кодируемый геном CXCL10, является членом семейства CXС $\alpha$ -хемокинов, которые стимулируют миграцию и адгезию активированных Т-хелперов 1-го типа (Th1) посредством связывания со специфичным рецептором CXCR3 [15]. IP-10 секретируется ден-

дритными и макрофагальными клетками, инфицированными различными микроорганизмами, в момент распознавания Т-лимфоцитами специфических антигенов. Секреция IP-10 усиливается IFN- $\gamma$ , вырабатываемым Th1, и провоспалительными цитокинами IL-2, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-27, IL-17, IL-23 [15]. Известна роль IP-10 в развитии инфекционных процессов: увеличение продукции IP-10 при определенных условиях может способствовать более выраженному развитию системной воспалительной реакции и в значительной степени отражать восприимчивость к инфекциям. Показано, что при адекватном иммунном ответе организма на грибковую инфекцию происходит десятикратное повышение уровня IP-10 в сыворотке крови [16]. Известно, что трансляции белка IP-10 зависят от транскрипционной активности CXCL10. Промоторная область гена CXCL10 – регион, содержащий регуляторные механизмы для транскрипции гена и последующей трансляции белка.

Ген CXCL10 локализован на хромосоме 4q21. Аллельные варианты CXCL10 ассоциированы с различной экспрессии гена и/или аффинитетом белка IP-10 к рецептору CXCR3. Показан вклад ОНП CXCL10 в риск развития таких инфекционных заболеваний, как гепатит В [17], туберкулез [18], церебральная малярия [19]. Интерес исследователей представляют не только аллельные варианты кодирующей части гена, ассоциированные с изменением структуры белка, но и ОНП, расположенные в нетранслируемых областях, где 5' регион представляет наибольший интерес, так как он содержит различные сайты связывания транскрипционных факторов, регулирующих транскрипцию гена (трансляцию белка). Было доказано, что индукция экспрессии CXCL10 в дендритных клетках происходит по MAPK (ERK1/2, JNK и p38) и STAT1 путям внутриклеточного сигналинга, а генетический полиморфизм промоторного региона гена CXCL10 влияет на экспрессию хемокина через трансактивацию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [18, 20]. Таким образом, так как 5' регион гена содержит критический домен транскрипционного контроля, ОНП, локализованные в данной области CXCL10, могут влиять на содержание IP-10 в сыворотке крови (или бронхоальвеолярном секрете) и развитие защитного иммунного ответа у инфицированного человека.

Цель исследования – оценка вклада аллельных вариантов A-1447G (rs 4508917) и G-135A (rs56061981) промоторной области гена CXCL10 в риск развития ИА и их влияние на концентрацию IP-10 в сыворотке периферической крови онкогематологических больных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящее исследование включили 178 онкогематологических пациентов с признаками поражения легких, возникших в постцитостатическом периоде. Больные проходили обследование и лечение в микологической клинике НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, отделении онкогематологии ГБУЗ «Ленинградской областной клинической больницы» и НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова с июня 2016 г. по июнь 2018 г. Работа с пациентами была проведена в соответствии с этическими положениями Хельсинской декларации всемирной медицинской ассоциа-

ции (World Medical Association Declaration of Helsinki) (1964, 2013 – поправки) и Национальным стандартом Российской Федерации «Надлежащая клиническая практика» ГОСТ P52379-2005.

Группу I составили 86 больных (48,3%), у которых в соответствии с критериями EORTC/MSG 2008 г. был диагностирован «вероятный» ИА: мужчин – 44,3%, женщин – 55,7%, возраст – от 9 до 75 лет (медиана – 46±17). В контрольную группу вошли 92 пациента (51,7%), сопоставимые по возрасту и полу, у которых в ходе обследования диагноз ИА был исключен.

Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь, забранная в вакуумные пробирки без антикоагулянтов для исследования сыворотки (уровня IP-10) и пробирки с 0,5 М ЭДТА (pH 8.0) в качестве антикоагулянта для генетического анализа. Забор биоматериала осуществляли при подозрении на дебют инфекционного процесса с поражением легких (острая фаза).

**Определение количества белка IP-10 в сыворотке крови** проводили методом иммуноферментного анализа с применением коммерческой тест-системы ELISA kit for CXCL10 (Cloud-Clone Corp, USA), используя оптимальные концентрации стандартов и антител, согласно инструкции производителя на планшетном фотометре (HumaReader HS, Germany) при длине волны 450нм. Результаты представлены в пг/мл.

**Идентификацию ОНП rs4508917 и rs56061981 гена CXCL10** осуществляли методом анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ); детализация методики представлена в таблице 1.

В качестве матрицы реакции использовали 25 нг геномной ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови солевым методом (Miller et al., 1988). Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 16,6 мМ сульфата аммония, 0,1% TritonX-100, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific, США), 2,5 мМ каждого dNTP (Thermo Scientific, США), по 25 пМ прямого (For) и обратного (Rev) праймера (Синтол, Россия), 1 ед акт Taq ДНК полимеразы (Биосан, Россия). Условия амплификации: начальная денатурация 3 мин при 95 °С; 36 циклов по 30 сек при 95 °С – 30 сек, 30 сек при соответствующей температуре отжига, 30 сек при 72 °С; заключительный синтез при 72 °С в течение 5 мин.

Эндонуклеазное расщепление 5 мкл ПЦР продукта выполняли с использованием 5 ед. акт. фермента рестрикции (Thermo Scientific, США) при 37 °С в течение рекомендованного времени инкубации. Анализ ПДРФ проводили путем электрофоретического разделения в 6% полиакриламидном геле в присутствии маркера молекулярной массы (Thermo Scientific, США) с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете.

**Статистическую обработку результатов** осуществляли с применением пакета программы SPSS версия 21.0 (IBM, USA). Определение соответствия на-

блюдаемого распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга в изучаемых группах выполняли с помощью точного теста Фишера, сравнение распределения генотипов между группами – с использованием критерия  $\chi^2$ . Для проверки статистических гипотез о виде распределения данных применяли W-тест Шапиро-Уилка. Так как изучаемые переменные (количество белка IP-10) имели существенное отклонение от нормального распределения, сравнение показателей между группами проводили при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни. Уровень значимости для всех использованных критериев –  $p < 0.05$ . Показатели среднего представлены в виде медианы и нижнего и верхнего квартилей ( $Lq \div Hq$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инвазивные грибковые инфекционные процессы, вызванные оппортунистическими микромицетами, долгое время считали примером патологии, в развитии которой генетические особенности организма человека играют незначительную роль по сравнению с клиническим статусом пациента (длительная нейтропения) и патогенностью и вирулентностью этиологического агента. Однако в настоящее время доказано существование индивидуальных различий в отношении чувствительности к грибковым инфекциям, а также особенностей клинической картины заболевания [10-14, 21], ассоциированных с генетическим статусом пациента. Проведенное исследование на монозиготных близнецах показало, что наиболее генетически детерминированы с высокой конкордантностью следующие иммунологические параметры: содержание регуляторных Т-клеток и уровень хемокина IP-10 [22].

В результате широкомасштабного исследования риска развития ИА, в ходе которого было скринировано большое количество генов, кодирующих цитокины, хемокины и их рецепторы (84 ОНП были проанализированы), была показана значимая ассоциация только для трех полиморфных маркеров гена CXCL10 (rs1554013, rs3921, rs4257674). При последующем гаплотипном анализе была подтверждена роль данных ОНП в развитии грибковой патологии и выявлено, что гаплотип CGAG (rs1554013 (11101 C/T), rs3921 (1642 C/G), rs4859588 (908 A/G), rs4257674 (-1101 A/G)) является гаплотипом высокого риска развития ИА [16]. Отметим, что ОНП, вошедшие в предложенный гаплотип высокого риска ИА, локализованы преимущественно в кодирующей области гена, за исключением rs4257674. Как отмечено выше, не меньшую роль в дисфункциях белка, ассоциированных с генетическим полиморфизмом, отводят полиморфным вариантам нетранслируемых областей гена, влияющих на его трансляцию и последующую трансдукцию белка. Кроме того, секреция IP-10, индуцируемая IFN- $\gamma$ , генетически детерминирована: гены CXCL10 и IFNG функционально взаимосвязаны: в промоторной области CXCL10 между нуклеотидными позициями -2002 и -930 обнаружен сайт

Таблица 1

Детализация методики анализа ОНП

ОНП	Последовательность праймеров (5'-3')	Т отжига праймеров °С	Время инкубации с эндонуклеазой	Эндо-нуклеаза	Размер продукта реакции (п.о.)
rs4508917 -1447A>G	For: ttggtcaggaatggaaaag Rev: cggtttccccacagctaattc	55	30 мин	FastDigestSacl (Thermo Scientific, #FD1134)	A=290 G=145+145
rs56061981 -135G>A	For: tgaataaagttttgccacga Rev: tgaataaactttgccacga	48	12-16 часов	Bsp119I (BstBI) (Thermo Scientific, #ER0121)	G=61+62 A=123



потенциально негативной регуляции *IFNG*.

В ходе нашей работы мы изучили полиморфные варианты промоторной области гена *CXCL10*, ассоциированные ранее с риском развития некоторых инфекционных заболеваний, но их роль в формировании ИА не была изучена. Мы предположили, что они могут влиять на уровень IP-10 в сыворотке крови и быть маркерами ИА.

Распределение генотипов по rs4508917 и rs56061981 гена *CXCL10* в исследуемых группах (онкогематологические больные с «вероятным» ИА и пациенты с исключенным ИА (контрольная группа)) соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. Достоверных различий в частоте встречаемости генотипов и аллелей между группой пациентов с ИА и группой контроля обнаружено не было, данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Распределение генотипов (частота) ОНП G-135A и A-1447G между группами онкогематологических пациентов с вероятным ИА и без (контроль)**

ОНП <i>CXCL10</i>	онкогематологические пациенты		$\chi^2$ , p value
	«вероятный» ИА (n=86)	диагноз ИА исключен (n=92)	
G-135A (rs56061981)			
GG	82 (0,96)	84 (0,91)	$\chi^2 = 1,73$ p>0,05
GA	4 (0,04)	8 (0,09)	
AA	-	-	
G allele	168 (0,98)	176 (0,96)	$\chi^2 = 1,12$ p=0,289
A allele	4 (0,02)	8 (0,04)	
A-1447G (rs 4508917)			
AA	34 (0,395)	36 (0,39)	$\chi^2 = 4,502$ p=0,342
AG	49 (0,57)	53 (0,58)	
GG	3 (0,035)	3 (0,03)	
A allele	117 (0,68)	125 (0,68)	$\chi^2 = 0,003$ p=0,986
G allele	55 (0,32)	59 (0,32)	

Гомозиготный генотип GG дикого типа (rs56061981) значительно превалировал в обеих изучаемых группах, когда как для rs4508917 наблюдали превалирование гетерозиготного генотипа AG. Ранее было показано, что AG генотип (rs4508917) ассоциирован с риском развития малярии. Пациенты, несущие G-аллель в гетерозиготном положении, с большей вероятностью были подвержены развитию инфекционных процессов [19]. Однако в работе, посвященной генетическим аспектам патогенеза туберкулеза, аллельные варианты rs4508917 не ассоциировались с риском развития заболевания [18].

Определенно доказано, что существуют популяционные различия в распределении минорных аллелей изучаемых ОНП. Частота встречаемости аллеля A (rs56061981) в группе онкогематологических больных без грибковой патологии составила 0,04, что совпадает с частотой для Европейской популяции в целом, тогда как для Африканской и Китайской популяции она значительно выше и составляет 0,1, а для Индийской популяции – 0,2 [19, 23]. В работе, проведенной на когорте индийских пациентов, показана его роль как протективного аллеля развития малярии у лиц женского пола. По результатам нашего анализа, аллель A у лиц с «вероятным» ИА встречался в два раза ниже, чем у онкогематологических больных, вошедших в группу контроля, но низкая частота его распределения в Европейской популяции, по всей видимости, не позволяет достичь статистически значимых результатов. Частота встречаемости минорного аллеля G (rs4508917) была одинаковой между анализируемыми группами и со-

впадала с частотными показателями для Европейской популяции [23, 24].

В настоящее время активно обсуждают гендерные различия в распределении аллельных вариантов ОНП промоторного региона гена *CXCL10* и уровня IP-10 в сыворотке крови: мужской пол рассматривают как фактор риска развития инфекционных процессов, ассоциированный с повышенной секрецией данного хемокина. Опираясь на эти данные, мы проанализировали распределение генотипов rs4508917 в группах, разделенных по гендерному признаку (табл. 3 и 4), распределение для rs56061981 из-за низкой частоты встречаемости минорного аллеля не представлено.

Таблица 3

**Распределение генотипов (частота) ОНП A-1447G между группами онкогематологических пациентов мужского пола с вероятным ИА и без (контроль)**

ОНП <i>CXCL10</i>	онкогематологические пациенты		$\chi^2$ , p value
	«вероятный» ИА (n=38)	диагноз ИА исключен (n=57)	
A-1447G (rs 4508917)			
AA	18 (0,47)	20 (0,35)	$\chi^2 = 1,954$ p=0,376
AG	20 (0,53)	36 (0,63)	
GG	-	1 (0,02)	

Таблица 4

**Распределение генотипов (частота) ОНП A-1447G между группами онкогематологических пациентов женского пола с вероятным ИА и без (контроль)**

ОНП <i>CXCL10</i>	онкогематологические пациенты		$\chi^2$ , p value
	«вероятный» ИА (n=48)	диагноз ИА исключен (n=35)	
A-1447G (rs 4508917)			
AA	16 (0,333)	14 (0,40)	$\chi^2 = 0,730$ p=0,694
AG	29 (0,604)	19 (0,54)	
GG	3 (0,063)	2 (0,06)	

По результатам нашей работы распределение генотипов rs4508917 между онкогематологическими пациентами с ИА и без грибковой патологии (контрольная группа) у лиц женского и мужского пола достоверно не различалось, но было показано превалирование минорного аллеля G в гомозиготном состоянии у лиц женского пола ( $\chi^2 = 3,361$ , p=0,067), что служит показателем возможных гендерных различий в распределении генотипов rs4508917 внутри популяций.

Несмотря на полученные положительные ассоциации между генетическими вариантами широкого спектра генов цитокинов (*CXCL10*, *IFNG*, *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4*, *IL4Rα*, *IL10*, *IL12B*, *IL15*, *IL23R*, *TNFR1*, *THFR2*) и предрасположенностью к ИА [4-14], отсутствие подтверждения функционального значения аллельных вариантов, ассоциированных с риском ИА, не позволяет сделать определенные выводы о вкладе изученных ОНП. Функциональный анализ гаплотипа CGAG гена *CXCL10* показал, что незрелые дендритные клетки, культивируемые совместно с конидиями *A. fumigatus*, носители гаплотипа высокого риска развития ИА CGAG, вырабатывали значительно более низкие уровни IP-10 по сравнению с дендритными клетками, имеющими гаплотип гена *CXCL10* дикого типа [16].

В ходе нашего исследования мы оценили функциональное значение ОНП G-135A (rs56061981) и A-1447G (rs 4508917) промоторной области гена *CXCL10*: установили ассоциативную связь между носительством определенных генотипов и уровнем IP-10 в сыворотке крови пациентов (Рис. 1).

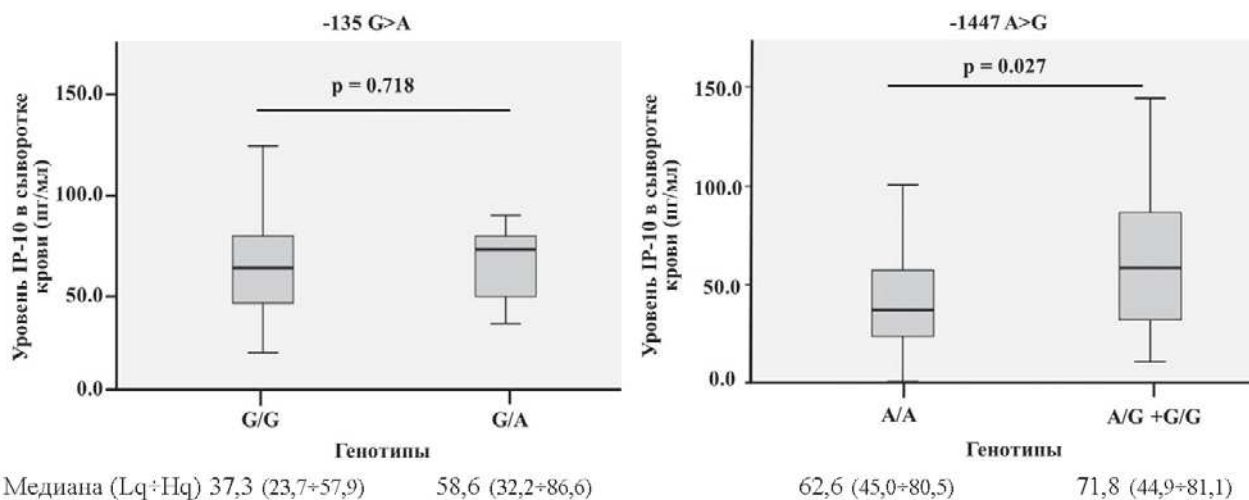


Рис.1. Влияние аллельных вариантов промоторного региона G-135A и A-1447G на количество белка IP-10 в сыворотке крови онкогематологических пациентов с признаками поражения легких (без деления на группы).

Аллельные варианты G-135A (rs56061981), по видимому, не влияют на уровень IP-10 в сыворотке крови, хотя присутствие аллеля А ассоциируется с незначительным повышением сывороточного хемокина, тогда как наличие минорного аллеля -1447G (rs4508917) связано с достоверно более высокими концентрациями IP-10 в сыворотке крови.

При разделении изучаемых онкогематологических пациентов на группу контроля и пациентов с грибковой манифестацией достоверность различий между аллельными вариантами rs4508917 в группе контроля возрастает, тогда как у лиц с ИА, несмотря на незначительное повышение IP-10 в сыворотке крови, статистическая значимость утрачивается (Рис. 2). Причем, если больных не разделять по генотипам, в группе с ИА регистрируются несколько большие значения сывороточного IP-10 (Рис. 3).

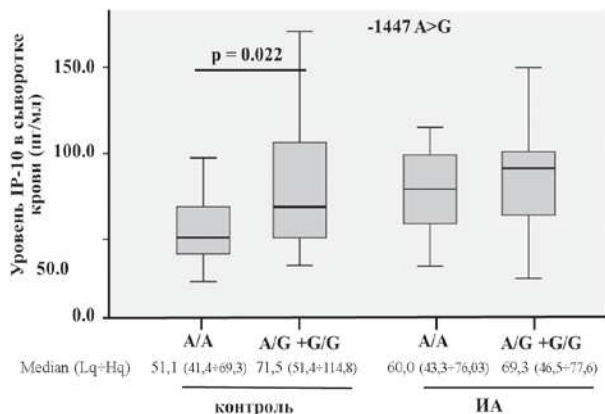


Рис. 2. Уровень IP-10 в сыворотке крови в зависимости от генотипа A-1447G между группами онкогематологических пациентов с вероятным ИА и без (контроль).

Ранее Mezger M. с соавторами показали, что уровень IP-10 в сыворотке крови больных после аллогенной трансплантации стволовых клеток с доказанным/вероятным ИА был в 1,5 раза выше по сравнению с иммунокомпрометированными пациентами без признаков грибковой инвазии и в 7 раз выше – по сравнению со здоровыми донорами [16]. В нашем исследовании, хотя закономерность ассоциации более высоких уровней IP-10 с развитием ИА сохраняется, достоверных

различий в содержании IP-10 у лиц с ИА и без грибковой патологии получено не было.

В настоящее время доказано, что не только механизмы врожденного иммунитета способствуют грибковой элиминации, но и антигенпредставляющие клетки и Т-лимфоциты играют не меньшую роль. Хемокин IP-10 опосредует адаптивный иммунный ответ, способствуя поляризации Т-лимфоцитов в Th1 клоны: активирует Th1 и снижает производство Th2-ассоциированных цитокинов. IP-10 индуцирует устойчивую воспалительную реакцию, характеризующуюся повышенной продукцией IFN- $\gamma$ , тем самым поддерживая защитную активность Th1 против инфекций, вызываемых внутриклеточными бактериями, паразитами и вирусами [25]. У иммунокомпрометированных пациентов установлено снижение числа как нейтрофилов, так лимфоцитов. Следовательно, можно предположить, что из-за дефицита иммунных клеток IP-10 не справляется со своей первоочередной функцией – привлечением Th1 в очаг инфекции. Это приводит к неэффективному (с точки зрения элиминации инфекции) повышению содержания циркулирующего хемокина.

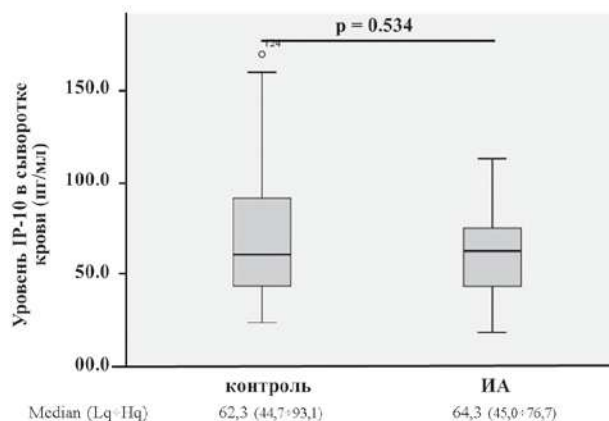


Рис. 3. Уровень IP-10 в сыворотке крови онкогематологических пациентов с вероятным ИА и без (контроль).

При изучении гендерного влияния на уровень IP-10 в сыворотке крови онкогематологических больных достоверных различий не получено, хотя у лиц женского пола были более высокие значения изучаемого



хемокина – 53,9 пг/мл vs 38,8 пг/мл (Рис. 4). Отметим, что полученные данные противоречат результатам, выявленным при исследовании на когорте индийских пациентов с подозрением на малярийный менингоэнцефалит, где были обнаружены более высокие уровни IP-10 в периферическом русле крови у лиц мужского пола [19]. Определенно известно, что мужчины более восприимчивы к простейшим, грибковым, бактериальным и вирусным инфекциям, чем женщины, и чаще умирают от этих инфекций [26, 27], что может быть связано с гендерно-ассоциированной пониженной иммунореактивностью.

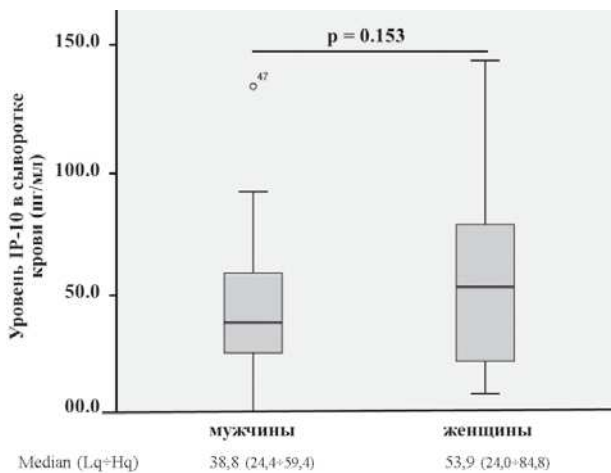


Рис.4. Уровень IP-10 в сыворотке крови онкогематологических пациентов, разделенных по гендерному признаку.

Необходимо отметить, что наша работа имеет ряд существенных ограничений, которые мы планируем решить в ходе дальнейшей работы над представленной проблемой. Во-первых, объем выборок был не достаточным для достоверного стратифицирования рисков развития ИА из-за сложности набора пациентов, соответствующих критериям отбора и дизайну исследования «случай-контроль». Во-вторых, результаты (влияние изучаемых ОНП на уровень IP-10 в сыворотке крови), полученные на ограниченной группе онкогематологических больных, не могут быть репрезентативными для всего населения. Наконец, изучение только двух полиморфных вариантов промоторной области гена может не дать полного представления о генетической изменчивости *CXCL10*.

Таким образом, для подтверждения клинической значимости полученных результатов потребуются дальнейшие исследования как с расширением групп пациентов, так и включением других ОНП 5'-нетраслируемой области гена *CXCL10*.

## ВЫВОДЫ

В ходе работы выявили, что, несмотря на то, что наличие аллеля-1447G (rs 4508917) как в гомозиготном, так и гетерозиготном варианте было ассоциировано с повышенной секрецией белка IP-10 в сыворотке крови онкогематологических пациентов, исследованные ОНП промоторной области гена *CXCL10* не оказывали вклад в риск развития ИА. Расширение изучаемых групп пациентов и ОНП гена *CXCL10* позволит стратифицировать риски ИА с большей достоверностью.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Brown G.D., Denning D.W., Gow N.A., et al. Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4 (165): 165rv13.
2. Drgona L., Khachatryan A., Stephens J. Clinical and economic burden of invasive fungal diseases in Europe: focus on pre-emptive and empirical treatment of *Aspergillus* and *Candida* species. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2014; 33 (1): 7-21.
3. Klimko N., Kozlova Y., Khostelidi S., et al. The burden of serious fungal diseases in Russia. *Mycoses.* 2015; 58 (5): 58-62.
4. Park S.J., Mehrad B. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009; 22 (4): 535-551.
5. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nature reviews. Immunology.* 2011; 11: 275-288.
6. Espinosa V., Rivera A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. *Cytokine.* 2012; 58 (1): 100-106.
7. Lass-Flörl C., Roilides E., Löffler J., et al. Minireview: host defence in invasive aspergillosis. *Mycoses.* 2013; 56 (4): 403-13.
8. Thakur R., Anand R., Tiwari S., et al. Cytokines induce effector T-helper cells during invasive aspergillosis; what we have learned about T-helper cells? *Front. Microbiol.* 2015; 6 (429): 1-6.
9. Lionakis V.S., Levitz S.M. Host Control of Fungal Infections: Lessons from Basic Studies and Human Cohorts. *Annu. Rev. Immunol.* 2018; 36: 139-173.
10. Ok M., Einsle H., Loeffler J. Genetic susceptibility to *Aspergillus* infections. *Int. J. Med. Microbiol.* 2011; 301: 445-452.
11. Cunha C., Aversa F., Bistoni G., et al. Immunogenetic profiling to predict risk of invasive fungal diseases: where are we now? *Immunological investigations.* 2011; 40: 723-734.
12. Cunha C., Aversa F., Romani L., Carvalho A. Human genetic susceptibility to invasive aspergillosis. *PLOS pathogens.* 2013; 9 (8): e1003434.
13. Pana Z.-D., Farmaki E., Roilides E. Host genetic and opportunistic fungal infections. *Clin. Microbiol. Infec.* 2014; 20: 1254-1264.
14. Oliveira-Coelho A., Rodrigues F., Campos Jr. A., et al. Paving the way for predictive diagnostics and personalized treatment of invasive aspergillosis. *Frontiers in Microbiology.* 2015; 6 (411): 1-7.
15. Dewi I.M.W., van de Veerdonk F.L., Gresnigt M.S. The Multifaceted Role of T-Helper Responses in Host Defense against *Aspergillus fumigatus*. *J. Fungi (Basel).* 2017; 3(4): e55.
16. Mezger M., Steffens M., Beyer M., et al. Polymorphisms in the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell transplantation and influence CXCL10 expression in monocyte-derived dendritic cells. *Chemokines, Cytokines, and Interleukins.* 2008; 111 (2): 534-536.
17. Deng G., Zhou G., Zhang R., et al. Regulatory polymorphisms in the promoter of CXCL10 gene and disease progression in male hepatitis B virus carriers. *Gastroenterology.* 2008; 134: 716-726.
18. Tang N.L., Fan H.P., Chang K.C., et al. Genetic association between a chemokine gene CXCL-10 (IP-10, interferon gamma inducible protein 10) and susceptibility to tuberculosis. *Clin. Chim. Acta.* 2009; 406: 98-102.
19. Wilson N., Driss A., Solomon W., et al. CXCL10 gene promoter polymorphism -1447A. G correlates with plasma CXCL10 levels

- and is associated with male susceptibility to cerebral malaria. PLoS ONE. 2013; 8 (12): e81329.
20. Yang Y., Dou H., Li X., et al. FC-98 regulates TLR9-mediated of CXCL-10 expression in dendritic cells via MAPK and STAT 1 signaling pathway. BioMed Research International. 2014; 2014: 1-10.
  21. *Руководство по инфекционным болезням в 2 книгах* / Под ред. акад. РАМН проф. Лобзина Ю.В. и проф. К.В. Жданова. СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2011. [Rukovodstvo po infekcionnym boleznyam v 2 knigah / Pod red. akad. RAMN prof. Lobzina Yu.V. i prof. K.V. Zhdanova. SPb: ООО «Izdatel'stvo Foliant», 2011 (In Russ)].
  22. Brodin P., Jovic V., Gao T., et al. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. Cell. 2015; 160 (1-2): 37-47.
  23. Guo X., Zhou G., Tan W., Zhai Y., Deng G. Local selection of human populations shapes complex evolution patterns of CXCL10 gene. Immunogenetics. 2013; 65: 635-644.
  24. IGSR: The international Genome Sample Resourse (<http://www.internationalgenome.org/>).
  25. Romagnani P., Crescioli C. CXCL10: a candidate biomarker in transplantation. Clin. Chim. Acta. 2012; 413 (17-18): 1364-1373.
  26. Naimi W.A., Green R.S., Cockburn C.L., Carlyon I.A. Differential susceptibility of male versus female laboratory mice to Anaplasma phagocytophilum infection. Trop. Med. Infect. Dis. 2018; 3(3): e78.
  27. Chambers C., Skowronski D.M., Rose C., et al. Should sex be considered an effect modifier in the evaluation of influenza vaccine effectiveness? Open Forum Infect. Dis. 2018; 5(9): ofy211.

Поступила в редакцию журнала 15.09.2018

Рецензент: Сироткина О.В.



УДК577.16:612.017:616-092:616.517:616.5-003.829.85: 616.594.1-002.156

## ЗНАЧЕНИЕ ВИТАМИНА D В ИММУННОЙ СИСТЕМЕ И ПАТОГЕНЕЗЕ АУТОИММУННЫХ ПРОЦЕССОВ КОЖИ (ОБЗОР)

**Корнишева В.Г. (профессор кафедры), Кукушкина К.С. (врач-дерматовенеролог)\***

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

© Корнишева В.Г., Кукушкина К.С., 2018

*В статье подробно представлено значение витамина D в клеточном и гуморальном иммунитете, а также в патогенезе некоторых кожных заболеваний (псориаз, витилиго, гнездная алопеция). В обзоре детально описана иммунорегуляторная функция витамина D, направленная на ингибирование компонентов врожденного и приобретенного иммунитета, отвечающих за индукцию аутоиммунных реакций.*

**Ключевые слова:** витамин D, VDR, [1,25(OH)<sub>2</sub>D], аутоиммунные заболевания, псориаз, витилиго, гнездная алопеция, иммунная система

## SIGNIFICANCE OF VITAMIN D IN THE IMMUNE SYSTEM AND PATHOGENESIS OF THE AUTOIMMUNE PROCESSES OF THE SKIN (REVIEW)

**Kornisheva V.G. (professor of the department), Kukushkina K.S. (dermatologist)**

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

© Kornisheva V.G., Kukushkina K.S., 2018

*Significance of vitamin D in cellular and humoral immunity and in pathogenesis of certain skin diseases (psoriasis, vitiligo, alopecia) have been presented in the article. The immunoregulatory function of vitamin D, aimed at inhibiting of the components of innate and acquired immunity, responsible for the induction of autoimmune reactions have been described in the review.*

**Key words:** vitamin D, VDR, [1,25(OH)<sub>2</sub>D], autoimmune diseases, psoriasis, vitiligo, alopecia areata, immune system

По данным мировой научной литературы, в последнее время проблема недостаточности витамина D приобретает масштаб эпидемии и совпадает с ростом распространенности аутоиммунных заболеваний [1]. Указывает ли этот факт на причинную связь между событиями, является предметом широкой дискуссии. Для некоторых аутоиммунных заболеваний (рассеянного склероза, сахарного диабета 1-го типа, воспалительных заболеваний кишечника, ревматоидного артрита) характерны сезонность и географическая зависимость. С каждым годом растет число публикаций, посвященных вопросам обеспеченности витамином D пациентов с аутоиммунными заболеваниями, влияния его профилактического приема на риск возникновения патологии и лечебных доз – на ее течение.

Экспрессия большого количества генов, кодирующих белки, которые участвуют в пролиферации, дифференцировке и апоптозе клеток, регулируется витамином D [1, 2].

Витамин D относится к группе жирорастворимых витаминов. Он естественным образом присутствует лишь в очень ограниченном количестве продуктов питания, а синтез в организме человека возможен только в определенных условиях, когда ультрафиолетовые (УФ) лучи солнечного света попадают на кожу. Витамин D, получаемый из продуктов питания и в виде пищевых добавок, а также образующийся при пребывании на солнце, биологически инертен. Для активации и превращения в активную форму D-гормона [1,25(OH)<sub>2</sub>D] в организме должно пройти два процесса гидроксилирования: первый этап происходит в печени и превращает витамин D в 25-гидроксивитамин D [25(OH)D], также известный как кальцитриол; второй этап осуществляется преимущественно в почках (с участием фермента CYP27B1 – 1α-гидроксилазы), и его результатом является синтез физиологически активного D-гормона, 1,25-дигидроксивитамина D [1,25(OH)<sub>2</sub>D], кальцитриола [2]. Уровни кальцитриола в крови определяются в основном активностью CYP27B1 в почках, находящейся под контролем паратиреоидного гормона (ПТГ), и жестко регулируются отрицательной обратной связью, которая замыкается ингибированием CYP27B1 высокими концентрациями самого кальцитриола и фактора роста фибробластов 23 (FGF23). Ограничению образования активной формы витамина способствует стимуляция фермента CYP24A1 (24-гидроксилазы), который превращает кальцитриол в неактивную, водорастворимую форму кальцитроевой кислоты, в дальнейшем выводимой из организма с желчью. FGF23, секретлируемый преимущественно остеоцитами, т.е. костной тканью, способствует активации 24-гидроксилазы в ответ на высокие концентрации D-гормона и повышение концентрации фосфора в крови [3].

Витамин D способствует абсорбции кальция в кишечнике и поддерживает необходимые уровни кальция и фосфатов в крови для обеспечения минерализации костной ткани и предотвращения гипокальциемической тетании. Он также необходим для роста костей и процесса костного ремоделирования, т.е. работы остеобластов и остеокластов. Достаточный уровень витамина D предотвращает развитие рахита у детей и остеопороза у взрослых. Вместе с кальцием витамин D применяют для профилактики и в составе комплекс-

\* Контактное лицо: Кукушкина Ксения Сергеевна, e-mail: kseniyasergeevna88prof@yandex.ru



ного лечения остеопороза [2-4].

Сывороточная концентрация 25(OH)D является лучшим показателем статуса витамина D, поскольку отражает его суммарное количество, производимого в коже и получаемого из пищевых продуктов и пищевых добавок, и имеет довольно продолжительный период полураспада в крови – порядка 15 дней [5].

Дефицит витамина D, включая мнение экспертов Международного эндокринологического общества [1], определяется как уровни 25(OH)D в сыворотке крови менее 20 нг/мл. Многие ученые [1, 4, 5] считают, что уровни между 20-30 нг/мл необходимо расценивать как «недостаточность» витамина D, а оптимальный уровень – более 30 нг/мл. Это основано на исследованиях, показывающих, что значения витамина D 25(OH)D в зоне более 30 нг/мл ассоциированы со снижением переломов и падений у пожилых пациентов. На концентрацию в сыворотке 25(OH) D могут влиять такие переменные, как возраст, пол, пубертатный статус, широта, сезон, раса и этническая принадлежность [5, 6].

Витамин D функционирует как гормон и регулирует паратгормон (PTH), метаболизм кальция и фосфора, что имеет важное значение для организма. Открытие рецепторов витамина D (VDRs) в большинстве клеток тела и наличие ферментов, синтезирующих активную форму витамина D, а именно 1,25-дигидроксивитамин D [1,25(OH)2D] в коже, привело к возобновившемуся интересу к его функциям, особенно, к его роли в уменьшении риска некоторых хронических заболеваний, таких как рак, аутоиммунные, инфекционные и сердечно-сосудистые заболевания [1, 2, 4]. Рецепторы к витамину D (VDR) были обнаружены практически на всех иммунокомпетентных клетках: CD4+ и CD8+ лимфоцитах, В-лимфоцитах, нейтрофилах, макрофагах и дендритных клетках. По мере созревания клеток иммунной системы в них изменяется уровень VDR, однако эти изменения разнонаправлены в различных клетках. Так, наивные Т-лимфоциты содержат небольшое количество рецепторов, в то время как зрелые формы отличаются высоким уровнем экспрессии VDR [7, 8]. И, напротив, в процессе дифференцировки моноцитов в макрофаги и дендритные клетки происходит уменьшение их количества [7, 9]. Такая закономерность отражает чувствительность иммунокомпетентных клеток к витамину D, что может играть роль в тонкой регуляции иммунного ответа.

Макрофаги служат важнейшим звеном, связывающим врожденный и приобретенный иммунитет. Их способность к миграции, фагоцитозу и представлению антигена во многом обеспечивает дальнейшее развитие иммунного ответа. В зависимости от характера воздействий, макрофаги могут дифференцироваться в фенотипы M1 и M2. Происходит так называемая поляризация макрофагов. Так, липополисахарид, фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) являются индукторами фенотипа M1. Интерлейкины (IL-4, IL-3) способствуют альтернативной активации макрофагов в сторону толерогенного M2 класса.

При воздействии витамина D на моноциты происходит уменьшение экспрессии трех типов молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (MHC II: HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ); ингибция экспрессии TLR2 и TLR4 на их поверхности, что блокирует дальнейшие реакции врожденного иммунитета;

снижение уровня молекул CD40, CD80, CD86, способствующих активации иммунного ответа; увеличение синтеза IL-10, снижение продукции IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  [9-11].

Такая закономерность, вероятно, связана с репрессией фенотипа M1 макрофагов, что сопровождается снижением их иммуногенного действия, даже в присутствии провоспалительных стимулов (липолисахарида). Имеющиеся данные относительно обеднения поверхностными рецепторами косвенно говорят о направлении дифференцировки макрофагов в сторону толерогенного фенотипа M2. Отмечено аналогичное влияние витамина D на дендритные клетки. После экспозиции с витамином D дендритные клетки уменьшали синтез IL-12, IL-23, тем самым снижая последующую активацию Th1 и Th17, играющих важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний. При этом синтез IL-10 и CCL22 (хемокин, лиганд C-C-мотива), ответственных за стимуляцию противоположных по эффектам субпопуляций лимфоцитов Th2, возрастает [10-14]. Витамин D снижает антиген-презентирующую способность дендритных клеток за счет уменьшения экспрессии молекул MHC-II на их поверхности [13, 14], подавляет активацию циклооксигеназы-2 [14] и тормозит дифференцировку моноцитов в дендритные клетки и их созревание.

Реакции приобретенного иммунного ответа также связывают с витамином D, хотя исследователи отмечают трудности при определении его прямого воздействия на Т- и В-лимфоциты, так как большинство эффектов проявляется опосредованно через антиген-презентирующие клетки. Несмотря на это, было доказано, что количество VDR на CD4+лимфоцитах коррелирует со степенью их дифференцировки, что говорит о потенциальной восприимчивости Th к витамину D [13, 14]. Показано, что экспрессия VDR при активации CD4+лимфоцитов может увеличиваться в 5 раз [13]. Влияние витамина D на Th оценивают неоднозначно. Вероятно, это связано с различиями в выборе лигандов для стимуляции клеток. Так, некоторые авторы отмечают снижение дифференциации Th0 в Th17 с уменьшением экспрессии IL-17 и IL-21 в них и снижение дифференциации Th0 в Th1 с уменьшением продукции типичных для Th1 провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12) [13, 14].

Таким образом, иммунорегуляторная функция витамина D направлена на ингибирование компонентов врожденного и приобретенного иммунитета, отвечающих за индукцию аутоиммунных реакций.

Есть различные отчеты о полиморфизмах рецептора витамина D, связанных с повышенным риском различных аутоиммунных заболеваний, таких как тиреоидит Хашимото, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Грейвса, ревматоидный артрит, псориаз, витилиго, гнездная алопеция, системная красная волчанка (СКВ), первичный билиарный цирроз, аутоиммунный гепатит, болезнь Аддисона, целиакия, сахарный диабет типа 1 и рассеянный склероз [7]. В кератиноцитах, дермальных фибробластах, эндотелиальных, иммунных клетках, макрофагах витамин D взаимодействует с VDR и RXR (ретиноидный X-рецептор). Этот комплекс связывается с ДНК через последовательности VDREs (элементы ответа витамина D) и способствует транскрипции и репрессии многочисленных

генов, участвующих в кожной физиопатологии [7, 11, 13, 14].

#### **Витамин D и псориаз.**

Псориаз представляет собой распространенное хроническое воспалительное наследственное заболевание неизвестной этиологии, вызванное функциональными аномалиями Т-лимфоцитов. В настоящее время подчеркивают важную роль мультифакториальной природы этого заболевания [15].

Несмотря на известную эффективность топических аналогов витамина D при псориазе, до конца еще непонятны точные механизмы, лежащие в основе их терапевтического действия. Модуляция различных маркеров эпидермальной пролиферации (антитела к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA) и Ki-67-антиген) и дифференцировки (инволюкрин, транскриптаза К, филлагрин, цитокератины 10, 16) была показана *in situ* в поврежденной псориазической коже после применения топических аналогов витамина D [16]. Однако витамин D не влияет на степень выраженности кожного воспаления, наблюдаемого при псориазе из-за невысокой биодоступности [16]. Существует 2 механизма действия топического витамина D: геномный – путем воздействия его на рецепторы кератиноцитов и подавления скорости их пролиферации [17], негеномный – приводящий к нормализации дифференцировки кератиноцитов за счет увеличения внутриклеточного уровня кальция [18]. Помимо этого, витамин D ингибирует дифференцировку Т-лимфоцитов и их пролиферацию в ответ на интерлейкин 1 (IL-1), что приводит к снижению продукции иммуноглобулинов.

Противовоспалительные эффекты могут также быть результатом торможения выработки IL-2, IL-6 и интерферона (IFN-γ). Кроме того, топический кальцитриол ингибирует человеческий бета дефензин (HBD) 2, HBD3, IL-17A, IL-17F и IL-8, которые повышены в псориазических высыпаниях [19]. Таким образом, происходит блокирование кателицидинового пути, сокращение воспаления и обращение вспять некоторых изменений, происходящих при псориазе.

Kragbelle K. и коллеги заметили, что местное применение мази кальцитриола с одновременной (в любое время за 2 часа до или сразу после) УФ-В фототерапией вызывало улучшение при псориазе, возможно, из-за повышения кожного синтеза витамина D [20]. Комбинированная терапия с метотрексатом (MTX), низкие дозы перорального циклоспорина (2 мг/кг/день), пероральный ацитретин, топический дитранол и топические стероиды могут увеличить терапевтическую эффективность местного витамина D [21-24].

В 1985 г. MacLaughlin J.A. и др. предположили, что пероральный прием кальцитриола может быть эффективен при лечении псориаза [25]. В том же самом году Morigimoto S. и Kumahara Y. сообщили о ремиссии псориазических поражений кожи у пациента с остеопорозом, которого лечили 1α-(OH) D<sub>3</sub> *per os* [26]. К сожалению, пероральное применение витамина D ограничено из-за высокого риска развития нежелательных явлений, таких как гиперкальцемия, гиперкальциурия, нефрокальциноз, нефролитиаз и снижение минеральной плотности костной ткани [15]. Но в недавнем обзоре [27] показано, что гиперкальцемия может быть

легко контролируема и преодолима надлежащим дозированием и контролем. Авторы отмечали корреляцию между низкими уровнями сывороточного витамина D и тяжестью течения псориаза. Таким образом, существует насущная необходимость в переоценке роли перорального витамина D в лечении этой болезни.

В настоящее время накоплен опыт применения витамина D в терапии псориаза. Так, Perez A. и коллеги наблюдали улучшение при лечении пероральным витамином D у 88% из 85 пациентов с псориазом, у 26,5% – отмечали полное очищение, у 36,2% – умеренное улучшение, у 25,3% – небольшое улучшение [28].

Gaal J. и др. выявили значительный иммуномодулирующий эффект системного альфакальцидола [1α-(OH) D<sub>3</sub>] у больных псориазической артропатией и предложили его как ценную терапевтическую альтернативу [29]. В другом исследовании продемонстрировано, что комбинация ацитретина и перорального кальцитриола привела к более быстрому сокращению индекса PASI у пациентов с хроническим бляшечным псориазом [30].

В опубликованных отчетах ученые предполагают, что пероральный витамин D посредством его противовоспалительного действия также улучшает течение метаболического синдрома и сердечно-сосудистых заболеваний, которые могут быть связаны с псориазом [27]. Чтобы сделать окончательные выводы об эффективности перорального витамина D, необходимо проведение большего количества исследований.

#### **Витамин D и витилиго.**

Аутоиммунитет играет важную роль в патогенезе витилиго [31]. Витамин D через его антиапоптотический эффект управляет активацией, пролиферацией и миграцией меланоцитов, увеличивая меланогенез и содержание тирозиназы культивируемых человеческих меланоцитов [32]. Витамин D также уменьшает аутоиммунное повреждение меланоцитов, модулируя Т-клеточную активацию [33].

В некоторых исследованиях изучали ассоциацию между витилиго и уровнем 25(OH) D.

В работе Silverberg J.I. и др. [34] пониженные уровни 25(OH) D были найдены у больных с витилиго и сопутствующими аутоиммунными заболеваниями.

Li K. и др. [35] отмечали статистически значимо сниженные уровни 25(OH) D у пациентов с витилиго, по сравнению с контрольными группами, и предположили, что дефицит 25(OH) D может быть способствующим фактором в развитии этой болезни.

Роль перорального витамина D в терапии витилиго мало изучена. Проведено предварительное изучение эффективности и безопасности длительного лечения высокими дозами витамина D<sub>3</sub> у лиц с псориазом и витилиго. Это исследование базировалось на том, что аутоиммунитет и дефицит витамина D связаны, и, в свою очередь, метаболизм витамина D у больных витилиго сопряжен с частым наличием полиморфизма генов. Таким образом, прием больших доз витамина D<sub>3</sub> у пациентов с аутоиммунными нарушениями может компенсироваться наследственной устойчивостью к его биологическим эффектам. Finamor и др. лечили 16 больных с витилиго 35,000 МЕ витамина D<sub>3</sub> один раз в день ежедневно в течение 6 месяцев в сочетании с диетой. У 14 из 16 человек была 25-75% репигментация

без существенного изменения в метаболических параметрах, тем самым указывая на то, что терапия большими дозами витамина D3 может быть эффективной и безопасной для этой категории пациентов [36].

Об использовании аналогов витамина D в сочетании с PUVA для лечения витилиго сначала сообщил Parsad D. и др. [33]. Впоследствии топические аналоги витамина D эффективно использовали в лечении витилиго как монотерапию, так и в сочетании с другими методиками, такими как кортикостероиды и ультрафиолетовая терапия.

#### **Витамин D и гнездная алопеция.**

Гнездная алопеция (ГА) – органоспецифическое аутоиммунное заболевание с поражением волосяных фолликулов (ВФ); оно имеет многофакторный характер, что предполагает комплексное взаимодействие генетических особенностей организма и экзогенных триггеров, провоцирующих развитие ГА. Решающую роль в развитии заболевания играет Т-клеточный иммунитет. Отличительной чертой при ГА является перифолликулярный лимфоцитарный инфильтрат, который формируется в нижней части ВФ и состоит преимущественно из активированных Т-лимфоцитов, макрофагов и других лимфогистиоцитарных элементов, включая клетки Лангерганса. Этиология гнездной алопеции не до конца изучена, однако ученые указывают на генетическую предрасположенность, аутоиммунитет и факторы окружающей среды [37, 38]. Аутоиммунная этиология была предложена на основе ее ассоциации с различными аутоиммунными заболеваниями, наличием аутоантител, воспалительных лимфоцитов вокруг и внутри пораженных волосяных фолликулов и способностью стимулировать восстановление волос с использованием иммунодепрессантов [1]. Здоровая луковица волосяного фолликула человека обладает иммунологической привилегией во время фазы роста анагена, потому что основные молекулы комплекса гистосовместимости (МНС) I и II класса не экспрессируются, а TGF- $\beta$ , IGF-1 и MSH-a – сверхэкспрессируются. При ГА молекулы МНС I и МНС II сильно экспрессируются кератиноцитами волосяного фолликула, что приводит к взаимодействию между CD8 + Т-клетками и МНС I, представленными аутоантигенами дендритных клеток. Иммуносупрессивные молекулы уменьшаются, а молекулы адгезии сверхэкспрессируются, что приводит к перифолликулярному воспалению. Связанные с меланоцитом аутоантигены могут быть мишенью аутоагрессивных Т-клеток [37-39].

В ряде зарубежных работ было продемонстриро-

вано, что рецепторы витамина D (VDR) сильно выражены в ключевых структурах волосяных фолликулов. Экспрессия VDR на кератиноцитах необходима для поддержания нормального цикла волос [39, 40]. Также доказано, что отсутствие VDR уменьшает эпидермальную дифференцировку и рост волосяного фолликула [40]. Было проведено несколько исследований для оценки роли витамина D в различных нарушениях волос с контрастирующими результатами [40, 41].

Nassiri S. и коллеги сообщают о значительной разнице в уровне витамина D3 в сыворотке крови у пациентов с ГА в сравнении с контрольной группой [42]. Наименьшее значение 25 (ОН) D было выявлено у лиц с тотальной и универсальной формой ГА, преимущественно у женщин [42]. Это противоречит Ovidio R. и Mahamid M. [43, 44], которые сообщили об отсутствии связи между уровнем витамина D и характером ГА. Причина изменения может быть связана с неравным числом рассмотренных случаев в каждом исследовании, географическими различиями в воздействии солнца.

Ola Ahmed Bakry и коллеги [45] в своих отчетах продемонстрировали наличие более низких значений в сыворотке крови витамина D в 93% случаев, по сравнению с контролем, и отсутствие корреляции между уровнем сывороточного 25 (ОН) D и рецидивом заболевания или семейным анамнезом ГА. Дальнейшие исследования необходимы для уточнения связи между уровнем в крови 25 (ОН) D и вовлечением ногтей, рецидивом заболевания и положительным семейным анамнезом. Также требуются клинические испытания для оценки использования витамина D при лечении данной патологии.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, исследования последних лет показали, что роль витамина D не ограничивается лишь регуляцией уровня кальция. Биологические функции витамина D в организме многообразны, а геномные и негеномные эффекты многочисленны. Увеличение обеспеченности витамина D снижает частоту диабета, остеопороза, респираторных заболеваний, артериальной гипертензии, аутоиммунных и онкологических заболеваний (молочной железы, кишечника, простаты). С низким уровнем витамина D связывают развитие аллергических заболеваний, болезней сердца, метаболического синдрома и ожирения [46]. Необходимы дополнительные исследования, чтобы изучить сложные связи витамина D с дерматологическими заболеваниями и создать четкие рекомендации для его приема.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Van Belle T.L., Gysemans C., Mathieu C. Vitamin D in autoimmune, infectious and allergic diseases: A vital player? Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 2011; (25): 617-632.
2. Hossein-Nezhad A., Holick M.F. Vitamin D for Health: A Global Perspective. Mayo Clinic Proc. 2013; 88:150-157.
3. Каронова Т.Л. Метаболические и молекулярно-генетические аспекты обмена витамина D и риск сердечно-сосудистых заболеваний у женщин: Дисс. докт. мед. наук. СПб., 2014: 338 с. [Karonova T.L. Metabolic and molecular genetic aspects of vitamin D metabolism and the risk of cardiovascular disease in women. The dissertation of the doctor of medical sciences. SPb., 2014; 338 s.].
4. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: National Academy Press, 2010. 5: 145-148.
5. Gómez de Tejada Romero M.J., Sosa Henríquez M., Del Pino Montes J., et al. Position document on the requirements and optimum levels of vitamin D. Rev. Osteoporos. Metab Miner 2011; 3: 53-64.
6. Pfeifer M., Begerow B., Minne H.W., et al. Effects of a short-term vitamin D and calcium supplementation on body sway and secondary hyperparathyroidism in elderly women. J. Bone Miner Res. 2000; 15 (6):113-118.



7. Пигарова Е.А., Плещева А.В., Дзеранова Л.К. Влияние витамина D на иммунную систему. Иммунология. 2015; 36 (1): 62-66. [Piganova E.A. Plesheva A.V., Dzeranova L.K. The effect of vitamin D on the immune system. Immunology. 2015; 36 (1): 62-66 (In Russ)].
8. Pludowski P, Holick M.F, Pilz S, et al. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-a review of recent evidence. Autoimmun Rev. 2013; 12(10): 976-989.
9. Baekie F, Takiishi T, Korf H, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. Curr. Opin. Pharmacol. 2010; 10: (4): 482-496.
10. Lemire J.M. Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D3. J Cell Biochem 1992; 49: (1): 26-31.
11. Correale J, Ysrraelit M.C., Gaitan M.I. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. J Brain 2009; (132): 1146-1150.
12. Von Essen M.R., Kongsbak M., Schjerling P, et al. Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. Nat Immunol 2010; (11): 344-349.
13. Mahon B.D., Wittke A., Weaver V, Cantorna M.T. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. J. Cell Biochem. 2003; 89 (5): 25-30.
14. Van Etten E., Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2005; (97): 93-101.
15. Segaert S., Bouillon R. Epidermal keratinocytes as source and target cells for vitamin D. In: Norman A.W., Bouillon R., Thomasset M., editors. Vitamin D Endocrine System: Structural, Biological, genetic and Clinical Aspects. Proceedings of the Eleventh Workshop on Vitamin D, Nashville, TN, USA: University of California, Riverside: Printing and Reprographics; 2000; 34: 583-590.
16. Tremezaygues L., Reichrath J. Vitamin D analogues in treatment of psoriasis. Where are we standing and where will we be going. Dermatoendocrinology. 2011; 3: 180-186.
17. Ricketts J.R., Rothe J.M., Grant-Kels M.J. Nutrition and psoriasis. Clin. Dermatol. 2010; 28: 615-626.
18. Van Der Kerkhof P.C. Biological activity of vitamin D analogues in the skin, with special reference to antipsoriatic mechanisms. Br. J. Dermatol. 1995; 132: 675-682.
19. Peric M., Koglin S., Dombrowski Y, et al. Vitamin D analog differentially control antimicrobial peptide/"alarmin" expression in psoriasis. PLoS One. 2009; 4: 123-125.
20. MacLaughlin J.A., Gange W., Taylor D, et al. Cultured psoriatic fibroblasts from involved and uninvolved sites have partial but not absolute resistance to the proliferation-inhibition activity of 1,25-dihydroxyvitamin D3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985; 82: 541-543.
21. Morimoto S., Kumahara Y. A patient with psoriasis cured by 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin D3. Med. J. Osaka Univ. 1985; 35: 3-4.
22. Kamangar F, Koo J, Heller M, et al. Oral vitamin D, still a viable treatment option for psoriasis. J. Dermatolog. Treat. 2013; 24: 261-271.
23. Perez A., Raab R., Chen T.C., et al. Safety and efficacy of oral calcitriol (1,25 dihydroxyvitamin D) for the treatment of psoriasis. Br. J. Dermatol. 1996; 134: 10-12.
24. Gaal J, Lakos G., Szodoray P, et al. Immunological and clinical effects of alphacalcidol in patients with psoriatic arthropathy: Results of an open, follow up pilot study. Acta Derm. Venereol. 2009; 89:147-149.
25. Ezquerra G.M, Regana M.S, Millet P.U. Combination of acitretin and oral calcitriol for treatment of plaque-type psoriasis. Acta Derma Venereol. 2007; 87: 449-450.
26. Kragballe K. Combination of topical calcipotriol (MC 903) and UVB radiation for psoriasis vulgaris. Dermatologica. 1990;1 81: 211-214.
27. Grossman R.M., Thivolet J, Claudy A., et al. A novel therapeutic approach to psoriasis with combination calcipotriol ointment and very low-dose cyclosporine: A result of a multicenter placebo-controlled study. J. Am. Acad. Dermatol. 1994; 31: 68-74.
28. Cambazard, van de Kerkhof P.C., Hutchinson P.E. The calcipotriol study group proceedings of the 3 rd International Calcipotriol Symposium. Munich Germany; 1996; 35: 62-72.
29. Jong E.M., Mork N.J., Seijger M.M., et al. The combination of calcipotriol and methotrexate compared with methotrexate and vehicle in psoriasis: Results of a multicentre placebo-controlled randomized trial. Br. J. Dermatol. 2003; 148: 318-325.
30. Campione E., Mazzotta A., Paternò E.J., et al. Effect of calcipotriol on etanercept partial responder psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis patients. Acta Derm. Venereol. 2009; 89: 288-291.
31. Le Poole I.C., Wankowicz-Kalinska A., van den Wijngaard R.M., et al. Autoimmune aspects of depigmentation in vitiligo. J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. 2004; 9: 68-72.
32. AlGhamdi K., Noura A., Moussa N. The role of vitamin D in melanogenesis with an emphasis on vitiligo. Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol. 2013; 79:750-752.
33. Parsad D., Kanwar A.J. Topical vitamin D analogues in the treatment of vitiligo. Pigment Cell Melanoma Res. 2009; 22: 487-488.
34. Silverberg J.I., Silverberg A.I, Malka E., Silverberg N.B. A pilot study assessing the role of 25 hydroxy vitamin D levels in patients with vitiligo vulgaris. J. Am. Acad. Dermatol. 2010; 62: 937-940.
35. Li K, Shi Q, Yang L, et al. The association of vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D levels with generalized vitiligo. Br. J. Dermatol. 2012; 167: 815-818.
36. Finamor D.C., Sinigaglia-Coimbra R., Neves L.C., et al. A pilot study assessing the effect of prolonged administration of high daily doses of vitamin D on the clinical course of vitiligo and psoriasis. Dermatoendocrinol. 2013; 5: 222-234.
37. Gilhar A., Etzioni A., Paus R. Alopecia areata. N. Engl. J. Med. 2012; 366: 1515-1525.
38. Islam N., Leung P.S., Huntley A.C., Gershwin M.E. The autoimmune basis of alopecia areata: A comprehensive review. Autoimmun. Rev. 2015; 14: 8190.
39. Aksu Cerman A., Sarikaya Solak S., Kivanc Altunay I. Vitamin D deficiency in alopecia areata. Br. J. Dermatol. 2014; 170: 52-54.
40. Malloy P.J., Feldman D. The role of Vitamin D receptor mutations in the development of alopecia. Mol. Cell Endocrinol. 2011; 347: 9096.

41. *Arnson Y., Amital H., Shoenfeld Y.* Vitamin D and autoimmunity: New aetiological and therapeutic considerations. *Ann. Rheum. Dis.* 2007; 66: 137142.
42. *Nassiri S., Saffarian Z., Younespour S.* Association of Vitamin D level with alopecia areata. *Iran J. Dermatol.* 2013; 16: P 1-5.
43. *d'Ovidio R., Vessio M, d'Ovidio F.D.* Reduced level of 25hydroxyvitamin D in chronic/relapsing alopecia areata. *Dermatoendocrinol.* 2013; 5: 271280.
44. *Mahamid M., AbuElhija O., Samamra M., et al.* Association between Vitamin D levels and alopecia areata. *Isr. Med. Assoc. J.* 2014; 16: 367-370.
45. *Ola Ahmed Bakry, Shawky M. El. Farargy, Maathir K. El. Shafiee, Amira Soliman.* Serum Vitamin D in patients with alopecia areata. *Indian Dermatology Online Journal - September-October 2016; 7 (5).*
46. *Chowdhury R. et al.* Vitamin D and risk of cause specific death: Systematic review and meta-analysis of observational cohort and randomised intervention studies. *BMJ.* 2014; 348: g1903.

*Поступила в редакцию журнала 15.05.2018*

*Рецензенты: Е.В. Фролова, Л.П. Котрехова*



# РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОСПЕКТИВНОГО МНОГОЦЕНТРОВОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ АНИДУЛАФУНГИНА – ЭРА (ЭРАКСИС В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ)

<sup>1</sup>Климко Н.Н. (зав. кафедрой)\*, <sup>2</sup>Рубинчик В.Е. (зав. отделением), <sup>3</sup>Соболь М.М. (зав. отд.), <sup>4</sup>Ларионова В.Б. (с.н.с.), <sup>5</sup>Тыренко В.В. (зав. кафедрой), <sup>6</sup>Талипова Л.И. (зав. отд.), <sup>7</sup>Журавель С.В. (зав. отд.), <sup>8</sup>Петрова Е.В. (зав. отд.), <sup>9</sup>Трухина Т.Н. (зав. отд.), <sup>1</sup>Козлова О.П. (ассистент кафедры)

<sup>1</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург; <sup>3</sup>Областной онкологический диспансер, Иркутск; <sup>4</sup>Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва; <sup>5</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург; <sup>6</sup>Межрегиональный клиничко-диагностический центр, Казань; <sup>7</sup>НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва; <sup>8</sup>Инфекционная клиническая больница №2, Москва; <sup>9</sup>Тулский областной онкологический диспансер, Тула, Россия

©Коллектив авторов, 2018

В 2015-2017 гг. в проспективное многоцентровое (n=23) исследование включили 300 больных, которым проводили лечение анидулафунолом; мужчин – 57%, женщин – 43%, медиана возраста – 49 лет (от 18 до 98). У всех обследованных пациентов были факторы риска развития инвазивного кандидоза. Медиана показателя APACHE II на момент назначения анидулафунола составила 18,8. Установлено, что наиболее часто (89%) анидулафунол назначали для эмпирической терапии инвазивного кандидоза. Общая эффективность применения анидулафунола была высокой (79%), при этом общая выживаемость обследованных пациентов в течение 30 суток с момента начала использования препарата составила 78%. Нежелательные явления при применении анидулафунола возникали редко (гипокалиемия – 1%, ангиоотек – 0,5%) и не были причиной отмены препарата. У 25% обследованных больных было лабораторно подтверждено наличие инвазивного кандидоза. Среди возбудителей инвазивного кандидоза преобладали *Candida non-albicans* виды (57%). Установлено, что раннее применение анидулафунола эффективно, общая выживаемость пациентов с инвазивным кандидозом в течение 30 суток с момента начала терапии составила 66%, что существенно выше аналогичного показателя в ранее проведенном в РФ исследовании КРИТ (43%).

Ключевые слова: анидулафунол, инвазивный кандидоз, кандидемия, *Candida*

## MULTICENTER OBSERVATIONAL STUDY OF ANIDULAFUNGIN USING – ERA (ERAXIS IN RUSSIA)

<sup>1</sup>Klimko N.N. (head of the department), <sup>2</sup>Rubinchik V.Ye. (head of the clinical department), <sup>3</sup>Sobol M.M. (head of the clinical department), <sup>4</sup>Larionova

\* Контактное лицо: Климко Николай Николаевич,  
e-mail: n\_klimko@mail.ru

V.B. (senior research fellow), <sup>5</sup>Tyrenko V.V. (head of the department), <sup>6</sup>Talipova L.I. (head of the clinical department), <sup>7</sup>Zhuravel S.V. (head of the clinical department), <sup>8</sup>Petrova E.V. (head of the clinical department), <sup>9</sup>Trukhina T.N. (head of the clinical department), <sup>1</sup>Kozlova O.P. (assistant of the department)

<sup>1</sup>North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg; <sup>2</sup>V.A. Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg; <sup>3</sup>Regional Oncology Center, Irkutsk; <sup>4</sup>N.N. Blokhin Russian Oncological Scientific Center, Moscow; <sup>5</sup>S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg; <sup>6</sup>Interregional Clinical and Diagnostic Center, Kazan; <sup>7</sup>N.V. Sklifosovsky Research Institute of Ambulance, Moscow; <sup>8</sup>Infectious Clinical Hospital №2, Moscow; <sup>9</sup>Tula Regional Oncology Center, Tula, Russia

©Collective of authors, 2018

In 2015-2017 years in a prospective multicenter (n=23) the study were included 300 patients treated with anidulafungin; men – 57%, women – 43%, median age – 49 years (18 to 98). All examined patients had risk factors of invasive candidiasis. Median APACHE II at the start of anidulafungin therapy was 18,8. It was found that most often (89%) anidulafungin was prescribed for the empirical therapy of invasive candidiasis. The overall effectiveness of anidulafungin was high (79%), while the 30 days overall survival of the patients after the start of anidulafungin therapy was 78%. Adverse events with the use of anidulafungin occurred seldom (hypokalemia – 1%, angioedema – 0,5%) and were not the cause of drug withdrawal. In 25% of the examined patients the presence of invasive candidiasis was laboratory confirmed. Among pathogens of invasive candidiasis, *Candida non-albicans* prevailed (57%). It was established that the early use of anidulafungin was effective, the 30 days overall survival of patients with invasive candidiasis after the initiation of therapy was 66%, which is significantly higher than in the earlier CRIT study in Russia (43%).

Key words: anidulafungin, invasive candidiasis, candidemia, *Candida*

Инвазивный кандидоз (ИК) – самый распространенный инвазивный микоз в Российской Федерации. Ежегодно в нашей стране возникает более 11 000 случаев ИК [1], его частота составляет 8,29 на 100 000 населения, что соответствует результатам исследования LIFE в странах Европы, где данный показатель варьирует от 2,2 до 11 на 100 000 населения [2].

*Candida* spp. – важные нозокомиальные патогены, которые составляют 8,4% возбудителей внутрибольничных инфекций в крупных стационарах Российской Федерации [3]. При этом подавляющее количество случаев ИК возникает у больных в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), а также у онкологических и гематологических пациентов [4]. Инвазивный кандидоз характеризуется тяжестью клинических проявлений и высокой летальностью, которая, по данным ранее проведенного в РФ крупного исследования ИК у больных в ОРИТ (КРИТ), составила 57% [5].

Анидулафунол (Эраксис) – новый противогрибковый препарат из группы эхинокандинов, отличающийся широким спектром фунгицидной активности против *Candida* spp. [6]. Эффективность анидулафунола доказана в крупных контролируемых клинических исследованиях [7-11]. Анидулафунол был зарегистрирован в Российской Федерации в 2012 г. как препарат для лечения ИК у взрослых больных. В современных отечественных и международных клинических исследованиях анидулафунол признан препаратом выбора для эмпирической терапии и этиотропного лечения ИК [12-14]. Публикаций, посвященных результатам применения анидулафунола для лечения ИК в РФ, недостаточно.



Цель исследования – оценка эффективности и безопасности применения анидулафуна для лечения инвазивного кандидоза в условиях реальной клинической практики учреждений здравоохранения Российской Федерации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В 2015-2017 гг. мы провели наблюдательное многоцентровое исследование в ОРИТ, а также онкологических и гематологических отделениях учреждений здравоохранения Российской Федерации.

### Критерии включения в исследование:

- Наличие показаний для эмпирической противогрибковой терапии согласно Российским рекомендациям «Диагностика и лечение микозов в ОРИТ» (2015): лихорадка неясной этиологии продолжительностью более 4 суток, резистентная к адекватной терапии антибактериальными препаратами широкого спектра действия, в сочетании с наличием двух и более факторов риска развития инвазивного кандидоза (в/в катетер, хирургическое вмешательство на органах брюшной полости, полное парентеральное питание, применение глюкокортикостероидов /ГКС/ или иммуносупрессантов) [12].

- Или выделение *Candida spp.* из стерильных в норме биосубстратов (кровь, спинномозговая жидкость /СМЖ/, перитонеальная жидкость, и прочее).

- Возраст старше 18 лет.

- Получение пациентом не менее одной суточной дозы анидулафуна.

### Критерии исключения:

- Возраст младше 18 лет.

- Предполагаемая продолжительность жизни менее 48 часов.

- Аллергическая реакция на эхинокандины.

В исследование последовательно включали всех поступивших в учреждение здравоохранения больных, получивших лечение анидулафуном. Пациентов включали в изучение с момента начала терапии анидулафуном, после чего проводили ретроспективный (исходные характеристики, факторы риска ИК, диагностические мероприятия, диагноз основного заболевания и пр.) и проспективный (диагноз ИК, эффективность и безопасность лечебных мероприятий, и пр.) сбор данных. Исследователи вели пациентов до выписки из больницы либо до наступления смерти.

Информацию о больных собирали с помощью индивидуальной регистрационной карты, которая включала демографические данные, клинический диагноз основного заболевания, факторы риска развития ИК, клинические симптомы ИК, показатели APACHE II и SOFA при поступлении в ОРИТ и при назначении анидулафуна, результаты микробиологических анализов, описание применения препарата (эмпирическое, корректирующее эмпирическое при неэффективности предыдущего противогрибкового лекарственного средства (ЛС), или этиотропное на основании данных микробиологического анализа), клиническую и микробиологическую оценку эффективности терапии анидулафуном, зарегистрированные при приеме препарата нежелательные явления, а также результаты лечения (выздоровление, выживаемость в течение 30-ти дней после начала применения анидулафуна,

смерть, осложнения).

Посев крови и других стерильных в норме биосубстратов (спинномозговая жидкость, перитонеальная жидкость и пр.), а также определение вида *Candida* осуществляли в микробиологических лабораториях, участвовавших в исследовании лечебных учреждений. Время, частоту проведения и тип микологического исследования определяли лечащие врачи, основываясь на клинической оценке пациента.

Диагностировали ИК на основании критериев, предложенных Европейской организацией по изучению и лечению рака (EORTC) и группы изучения микозов (MSG) Национального института алергологии и инфекционных заболеваний (NIAID) США [15].

Полученные в процессе изучения медико-биологические данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA for Windows (версия 10.0).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование включили 300 больных из 23 учреждений здравоохранения Российской Федерации; мужчин – 57%, женщин – 43%, возраст – от 18 до 98 лет, медиана – 49±17 лет. Демографические характеристики пациентов соответствовали данным Kullberg B. и соавт., которые провели анализ применения анидулафуна у 539 человек из 6-ти клинических исследований. В этой когорте мужчин было 55%, средний возраст – 57,5±16 лет [11].

В результате изучения было подтверждено, что ИК обычно возникает у тяжелых пациентов, длительно находящихся в лечебных учреждениях. Например, продолжительность пребывания наших больных в ОРИТ была от 1 до 144 дней (медиана – 18±19), в исследовании Kullberg B. и соавт. в ОРИТ более 4-х суток находились 50% пациентов [11].

У всех получавших анидулафуна больных было более 2-х факторов риска развития инвазивного кандидоза (табл. 1). По сравнению с когортой больных Kullberg B. и соавт., у пациентов в исследовании ЭРА чаще применяли антибиотики широкого спектра действия, центральный венозный катетер (ЦВК), системные ГКС и трансплантацию органов или тканей, реже проводили хирургические вмешательства и использовали искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) [11].

Таблица 1

Факторы риска развития инвазивного кандидоза у обследованных больных (n=300)

Факторы риска	%
Антибиотики широкого спектра действия	96%
ЦВК	85%
Полное парентеральное питание	49%
Применение системных ГКС	48%
Хирургическое вмешательство ≤2 недель	24%
Гемодиализ	17%
Печеночная недостаточность	21%
Почечная недостаточность	15%
ИВЛ	16%
Трансплантация органов или тканей	14%
Перфорация ЖКТ	11%
Инфицированный панкреонекроз	4%
ВИЧ+	6%

Включенные в исследование пациенты были в тяжелом состоянии, на момент назначения анидулафуна медиана показателя APACHE II = 19,5 и SOFA = 6±3. В работе Kullberg B. и соавт. медиана показателя APACHE II = 15 [11].

У 85% больных отмечали резистентную к приме-

нению антибактериальных ЛС широкого спектра действия лихорадку продолжительностью более 4 дней, что является одним из общепринятых показаний для начала эмпирической антифунгальной терапии [12-14].

В большинстве случаев (89%) анидулафунгин назначали в качестве эмпирической терапии. При этом стартовую эмпирическую терапию анидулафунгином использовали у 59% больных, а при неэффективности применения других противогрибковых ЛС (флуконазола и пр.) – у 30%.

Исследование ЭРА подтвердило эффективность применения анидулафунгина, показанную другими авторами [7-11]. Улучшение состояния наблюдали у 79% обследованных больных, отсутствие эффекта – у 5,7%, а рецидив инфекции – у 1,3%. У 17% пациентов оценить эффект не смогли. Общая выживаемость обследованных лиц в течение 30 суток с момента начала применения анидулафунгина составила 78%.

Исследованием ЭРА была подтверждена безопасность применения анидулафунгина, показанная другими авторами [7-11]. В данном изучении в одной из конечных точек оценивали общую выживаемость пациентов с инвазивным кандидозом в течение 30 суток с момента начала терапии, в связи с чем не предусматривали сообщения о смертельном исходе, как о серьезном нежелательном явлении. Серьезные нежелательные явления при использовании анидулафунгина отмечали редко: гипокалиемию – 1%, ангиоотек – 0,5%. Не было случаев отмены анидулафунгина в связи с нежелательными явлениями. По данным Kullberg B. и соавт., анидулафунгин отменили в связи с нежелательными явлениями у 1,5% пациентов [11].

Наличие инвазивного кандидоза было лабораторно установлено у 75 (25%) обследованных больных. Исследование ЭРА подтвердило, что во взрослой популяции ИК возникает преимущественно у пациентов среднего и старшего возраста, чаще у мужчин. Медиана возраста больных ИК составила 47 лет, мужчин – 57%. По данным ранее проведенного в РФ исследования КРИТ, медиана возраста больных ИК составила 58±15 лет, мужчин – 60% [5].

Пациенты с подтвержденным ИК дольше находились в ОРИТ (медиана = 24 дня), чем больные общей группы (медиана = 18 дней). Кроме того, у лиц с подтвержденным ИК чаще применяли антибиотики широкого спектра действия, ЦВК, гемодиализ и хирургические вмешательства, а также чаще выявляли почечную и печеночную недостаточность и ВИЧ-инфекцию (табл. 1, 2).

Таблица 2

**Факторы риска развития инвазивного кандидоза у пациентов с подтвержденным ИК (n=75)**

Факторы риска	%
Антибиотики широкого спектра действия	99%
ЦВК	96%
Полное парентеральное питание	64%
Применение системных ГКС	37%
Хирургическое вмешательство ≤2 недель	27%
Гемодиализ	33%
Печеночная недостаточность	19%
Почечная недостаточность	24%
ИВЛ	17%
Трансплантация органов или тканей	9%
Перфорация ЖКТ	13%
Инфицированный панкреонекроз	4%
ВИЧ+	21%

По сравнению с исследованием КРИТ, пациенты с ИК в нашем изучении чаще получали полное парентеральное питание (64% vs 36%) и системные ГКС (37% vs 6%), у них чаще выявляли ВИЧ-инфекцию (21% vs 3%). С другой стороны, больные, включенные в наше исследование, реже переносили хирургическое вмешательство (27% vs 40%) или перфорацию ЖКТ (13% vs 24%) [5].

На момент назначения анидулафунгина у пациентов с ИК были выше медианы показатели АРАСНЕ II = 18 и SOFA = 7, чем у больных в исследовании КРИТ (АРАСНЕ II – 13, SOFA – 6) [5].

У 57% пациентов возбудителями инвазивного кандидоза были *Candida non-albicans* виды (табл. 3), что совпадает с результатами крупного изучения этиологии ИК в РФ Васильевой Н.В. и соавт. [16], а также исследования КРИТ и данных Kullberg B. и соавт. [5, 11]. Однако, в отличие от указанных авторов, мы чаще выявляли *C. glabrata* и *C. krusei*, реже – *C. parapsilosis*.

Таблица 3

**Этиология инвазивного кандидоза у больных (n=75)**

<i>C. albicans</i>	43%
<i>C. glabrata</i>	25%
<i>C. krusei</i>	17%
<i>C. tropicalis</i>	13%
<i>C. parapsilosis</i>	2%
<i>C. kefir</i>	1%
<i>C. famata</i>	1%
<i>C. lusitania</i>	1%
2 возбудителя <i>Candida</i>	1%

Клинические признаки ИК были неспецифичными: устойчивое к антибактериальным ЛС повышение температуры тела отметили у 73% больных, признаки полиорганной недостаточности – у 41%, что совпадает с результатами исследования КРИТ [5].

Однако, в отличие от исследования КРИТ, мы значительно чаще выявляли поражение различных органов или перитонит (61% vs 26%), значительно реже – изолированную кандидемию (39% vs 74%) (табл. 4) [5].

Таблица 4

**Перитонит и поражение органов при инвазивном кандидозе (n=75)**

Перитонит	21
Поражение кожи и подкожной клетчатки	11
Поражение ЦНС	9
Эндокардит	9
Артрит	5
Остеомиелит	4
Нефрит	4
Эндофталмит	3

В большинстве случаев (57%) анидулафунгин назначали в качестве эмпирической терапии. При этом стартовую эмпирическую терапию анидулафунгином использовали у 30% больных, а при неэффективности применения других противогрибковых ЛС (флуконазола и пр.) – у 27%. После лабораторного подтверждения ИК анидулафунгин применили у 43% пациентов. В исследовании КРИТ противогрибковые ЛС (флуконазол – 67%, каспофунгин – 13%, амфотерицин В – 11%, ЛК амфотерицина В – 4%, вориконазол – 4%, микафунгин – 1%) назначали после лабораторного подтверждения ИК, при этом 19% пациентов не получили антимикотической терапии [5].

Исследование ЭРА подтвердило эффективность применения анидулафунгина у больных ИК [7-11]. Выздоровление или улучшение состояния отмечали у 79% пациентов с подтвержденным ИК, отсутствие эффекта

– у 7%, рецидив инфекции – у 2%, у 16% оценить эффект не смогли. Общая выживаемость обследованных лиц в течение 30 суток с момента начала применения анидулафунгина составила 66%. Этот показатель существенно выше общей выживаемости больных (43%) в течение 30 суток с момента выявления ИК в исследовании КРИТ, в котором анидулафунгин не применяли [5]. При этом у больных ИК в исследовании ЭРА были выше показатели тяжести состояния АРАСНЕ II и SOFA, а также чаще выявляли поражение органов и систем, что является прогностически неблагоприятными факторами [12].

Необходимо отметить два важных фактора, которые могли повлиять на эффективность лечения ИК в исследованиях КРИТ и ЭРА. Согласно современным отечественным и зарубежным рекомендациям, эхинокандины – препараты выбора для лечения ИК [12-14]. В исследовании КРИТ только 14% больных получали эхинокандины (каспофунгин и микафунгин) [5], в исследовании ЭРА все пациенты применяли анидулафунгин. Кроме того, существуют многочисленные доказательства эффективности ранней терапии ИК [17-19]. В исследовании КРИТ у 81 больных противогрибковые ЛС назначили после лабораторного подтверждения ИК, а 19% пациентов не получили антимикотической терапии. В исследовании ЭРА большинству больных (57%) анидулафунгин был назначен до лабораторного подтверждения ИК.

## ВЫВОДЫ

В Российской Федерации анидулафунгин в большинстве случаев назначают в качестве эмпирической терапии (89%). Такое применение анидулафунгина было эффективным у 79% больных.

Среди возбудителей инвазивного кандидоза преобладают *Candida non-albicans* виды (57%).

Нежелательные явления при использовании анидулафунгина возникают редко: гипокалиемия – 1%, ангиоотек – 0,5%. Не было случаев отмены анидулафунгина в связи с нежелательными явлениями.

У больных инвазивным кандидозом раннее применение анидулафунгина эффективно. Общая выжива-

емость этой категории пациентов в течение 30 суток с момента начала применения анидулафунгина составила 66%, что существенно выше аналогичного показателя в ранее проведенном в РФ исследовании КРИТ (43%).

**Авторы выражают признательность и благодарность за оказанную помощь при проведении данного исследования:**

Рудиной Ольге Владимировне (ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА, Нижний Новгород), Иванову Владимиру Вячеславовичу (ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург), Анисимову Андрею Юрьевичу (ГАУЗ «ГКБ №7», Казань), Савиновой Марине Талгатовне (ГАУЗ «ГКБ № 16», Казань), Кулагиной Людмиле Юрьевне (ГАУЗ «РКБ МЗ РТ, Казань»), Поповой Марине Олеговне (ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург), Семелеву Вячеславу Николаевичу (ФГБ ВОУО «ВМА им. С.М. Кирова», Санкт-Петербург), Ни Оксане Геннадьевне (ГБУЗ «ККБ №2», Краснодар), Шабановой Наталье Евгеньевне (ГБУЗ «ККБ №2», Краснодар), Светогор Анне Александровне (ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России», Москва), Богарниковой Татьяне Викторовне (ОГБУЗ «Белгородская ОКБ Святителя Иоасафа», Белгород), Шмыковой Елене Александровне (ОГБУЗ «Белгородская ОКБ Святителя Иоасафа», Белгород), Малковой Ольге Геннадьевне (ГБУЗ СО «Свердловская ОКБ №1», Екатеринбург), Половникову С.Г. (ФГКУ «Главный Военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко», Москва), Вдович В.А. (ГАУЗ «ГКБ №7», Казань), Хачатуровой Эльмире Александровне (ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» МЗ РФ, Москва), Парменову Александру Евгеньевичу (ГУЗ «Ульяновский областной клинический центр специализированных видов медицинской помощи им. засл. врача России Е.М. Чучалова», Ульяновск), Очировой Оксане Ешиевне (ГАУЗ «РКБ им. Н.А. Семашко», Улан-Уде), Силаеву Андрею Анатольевичу (ЦАРИТ МЦ ДВФУ, Владивосток), Зориной Наталье Александровне (ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России, Киров).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Климко Н.Н., Козлова Я.И., Хостелиди С.Н. и соавт. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели LIFE Program. Проблемы медицинской микологии. 2014; 16 (1): 3-7. [Klimko N.N., Kozlova YA.I., Hostelidi S.N. i soavt. Rasprostranennost' tyazhelyh i hronicheskikh mikoticheskikh zabojevanij v Rossijskoj Federacii po modeli LIFE Program. Problemy medicinskoj mikologii. 2014; 16 (1): 3-7 (In Russ)].
2. Bongomin F, Gago S, Oladele R.O., Denning D.W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases – Estimate Precision. J. Fungi. 2017; 3: 1-29.
3. Яковлев С.В., Суворова М.П., Белобородов В.В. и соавт. Распространенность и клиническое значение нозокомиальных инфекций в лечебных учреждениях России: исследование ЭРГИНИ. Антибиотики и химиотерапия. 2016; 61: 5-6. [Yakovlev S.V., Suvorova M.P., Beloborodov V.V. i soavt. Rasprostranennost' i klinicheskoe znachenie nozokomial'nyh infekcij v lechebnyh uchrezhdeniyah Rossii: issledovanie EHRGINI. Antibiotiki i himioterapiya. 2016; 61: 5-6 (In Russ)].
4. Шагдилеева Е.В., Рауш Е.Р., Богомолова Т.С. и соавт. Результаты исследования инвазивного кандидоза в Санкт-Петербурге. Проблемы медицинской микологии. 2015; 17 (2): 148-149. [Shagdileeva E.V., Raush E.R., Bogomolova T.S. i soavt. Rezul'taty issledovaniya invazivnogo kandidoza v Sankt-Peterburge. Problemy medicinskoj mikologii. 2015; 17 (2): 148-149 (In Russ)].
5. Klimko N., Vasilyeva N., Chernenkaya T., et al. Invasive candidiasis in intensive care units: results of prospective multicenter study in Russia. ECCMID 2015.
6. Pfaller M.A., Boyken I., Hollis R.J., et al. In vitro activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida* spp., including 315 isolates resistant to fluconazole. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 5425-7.
7. Reboli A.C., Rotstein C., Pappas P.G., et al. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. N. Engl. J. Med. 2007; 356: 2472-82.
8. Ruhnke M., Paiva J.A., Meersseman W., et al. Anidulafungin for the treatment of candidaemia/invasive candidiasis in selected



- critically ill patients. Clin. Microbiol. Infect. 2012; 18: 680-7.
9. *Reboli A.C., Shorr A.F., Rotstein C., et al.* Anidulafungin compared with fluconazole for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis caused by *Candida albicans*: a multivariate analysis of factors associated with improved outcome. BMC Infect. Dis 2011; 11: 261.
  10. *Nucci M., Colombo A.L., Petti M., et al.* An open-label study of anidulafungin for the treatment of candidaemia/invasive candidiasis in Latin America. Mycoses 2014; 57: 12-8.
  11. *Kullberg B., Vasquez J., Mootsikapun P., et al.* Efficacy of anidulafungin in 539 patients with invasive candidiasis: a patient-level pooled analysis of six clinical trials. J. Antimicrob Chemother 2017; 72: 2368-2377.
  12. *Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Российские рекомендации / ред. Н.Н. Клишко. ООО «Фармтек». 2015:95. [Diagnostika i lechenie mikofov v otdeleniyah reanimacii i intensivnoj terapii. Rossijskie rekomendacii / red. N.N. Klimko. ООО «Farmtek». 2015: 95 (In Russ)].*
  13. *Cornely O., Bassetti M., Calandra T., et al.* ESCMID Guideline for the Diagnosis and Management of Candida Diseases 2012: Non-Neutropenic Adult Patients Clin Microbiol Infect 2012; 18 (7): 19-37.
  14. *Pappas P.G., Kauffman C.A., David R. Andes D.R., et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 2016; 62: e1-50.
  15. *De Pauw B., Walsh T., Donnelly J., et al.* Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. World Journal of Clinical Infectious Diseases. 2008; 46 (12): 1813-1821.
  16. *Vasilyeva N.V., Raush E.R., Rudneva M.V.* Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey. Front. Med. 2018, 1-8.
  17. *Eggimann P., Ostrosky-Zeichner L.* Early antifungal intervention strategies in ICU patients. Curr. Opin. Crit. Care 2010; 16: 465-9.
  18. *Ostrosky-Zeichner L., Kullberg B.J., Bow E.J., et al.* Early treatment of candidemia in adults: a review. Med. Mycol 2011; 49: 113-20.
  19. *Kollef M., Micek S., Hampton N., et al.* Septic shock attributed to Candida infection: importance of empiric therapy and source control. Clin. Infect. Dis 2012; 54:1739-46.

Поступила в редакцию журнала 20.09.2018

Рецензент: А.В. Соболев



## ОПОРТУНИСТИЧЕСКИЕ МИКОЗЫ У ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ С ГЕМОБЛАСТОЗАМИ И ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

<sup>1</sup>Тилавбердиев Ш.А. (зав. научной частью)\*, <sup>2</sup>Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

<sup>1</sup>Республиканский центр по борьбе со СПИДом, Ташкент, Республика Узбекистан; <sup>2</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии), Санкт-Петербург, Россия

©Тилавбердиев Ш.А., Климко Н.Н., 2018

При целенаправленном обследовании 113 иммунокомпрометированных больных с ВИЧ-инфекцией (75 чел.) и с гемобластозами (38), входящих в группы риска, частота обнаружения глубоких микозов составила 29,3% и 57,9% соответственно. В этиологической структуре глубоких микозов *Aspergillus spp.* были выявлены в 40,7% при ВИЧ-инфекции и в 81,8% – при гемобластозах, *Cryptococcus spp.* – в 44,5% и в 18,2% соответственно. *Candida spp.* как возбудители инвазивного кандидоза у пациентов с ВИЧ-инфекцией были обнаружены в 14,8%, при гемобластозах данный микоз не диагностировали. Установлены клинические и лабораторные различия у иммунокомпрометированных лиц с ВИЧ-инфекцией и гемобластозами в зависимости от наличия глубоких микозов, которые необходимо учитывать при обследовании пациентов и формировании групп риска. Использование современных серологических тест-систем позволяет ускорить и повысить точность диагностики глубоких микозов, обуславливая своевременное начало этиотропной терапии. Полученные результаты указывают на необходимость осторожного отношения к микотическим осложнениям у данного контингента больных, усиления мер профилактики и проведения своевременной и адекватной этиотропной терапии.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, гемобластозы, микозы, аспергиллез, криптококкоз, инвазивный кандидоз, серологические тест-системы

## OPPORTUNISTIC MYCOSIS IN IMMUNOCOMPROMIZED PATIENTS WITH HEMOBLASTOSIS AND HIV-INFECTION

<sup>1</sup>Tilavberdiev Sh.A. (head of the scientific department), <sup>2</sup>Klimko N.N. (head of the department)

<sup>1</sup>Republican Center on AIDS Control, Tashkent, Uzbekistan; <sup>2</sup>North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology), St. Petersburg, Russia

©Tilavberdiev Sh.A., Klimko N.N., 2018

During specialized directed examination of 113 immunocompromized patients with HIV-infection (75 patients) and with hemoblastosis (38) included in the risk group, the incidence rate of deep mycoses were 29,3% and 57,9% respectively. In the etiological structure of deep mycoses *Aspergillus* were detected in 40,7% of HIV-infection and in 81,8% – in hemoblastosis, *Cryptococcus* – in 44,5% and in 18,2% respectively. *Candida* as causative agents of invasive candidiasis in patients with HIV-infections were revealed in 14,8%, in hemoblastosis this mycosis was not diagnosed. Clinical and laboratory differences in immunocompromized patients with HIV-infection

\* Контактное лицо: Тилавбердиев Шухрат Артыкович, e-mail: shuxrat.tilavberdiev@mail.ru

and hemoblastosis in relation of deep mycosis presence, which were required for examination of patients and formation of risk groups, were established. The use of the modern serological test-systems can accelerate and increase the accuracy of deep mycosis diagnosis, providing the appropriate beginning of etiotropic therapy. The results indicate the need of wary attitude to mycotic complications in this contingent of patients, strengthening of prevention measures and carrying out of the well-timed and adequate etiotropic therapy.

**Key words:** HIV-infection, hemoblastosis, mycosis, aspergillosis, cryptococcosis, invasive candidiasis, serological test-systems

Широкое распространение новых медицинских технологий (инвазивных диагностических и лечебных процедур, цитостатической и иммуносупрессивной терапии, трансплантации и пр.), пандемия ВИЧ-инфекции, рост частоты гемобластозов ведут к увеличению популяции иммунокомпрометированных больных с высоким риском развития микотических поражений, часто приводящих к гибели пациента, что обуславливает актуальность углубленного изучения данной патологии [1-4].

Важнейшим аспектом диагностики оппортунистических микозов является своевременность, так как позднее их обнаружение резко уменьшает число благоприятных исходов. Надежность традиционных, в частности культуральных, методов диагностики низкая, поэтому в реальных условиях назначение терапии обычно основано лишь на клинических данных [5-8]. Это указывает на необходимость более активного внедрения современных подходов к лабораторному определению микотических осложнений у иммунокомпрометированных пациентов и адекватному их лечению.

Цель настоящего исследования – определение частоты и этиологической структуры глубоких микозов у иммунокомпрометированных больных с гемобластомами и с ВИЧ-инфекцией за счет комплексного подхода с использованием современных серологических тест-систем.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 113 больных из групп риска: с ВИЧ-инфекцией – 75 (66,4%), с гемобластомами – 38 (33,6%). Изучение осуществляли раздельно – в Республиканском центре по борьбе со СПИДом и НИИ переливания крови МЗ РУз. соответственно.

Пациенты с ВИЧ-инфекцией находились на 3-4 стадии заболевания, с уровнем CD4<200 кл/мкл, с наличием респираторных и менингеальных симптомов; возраст – от 20 до 65 (40,1±2,2) лет, мужчин – 45 человек (60%), женщин – 30 (40%). Больных с гемобластомами (лейкозы) обследовали на фоне нейтропении после курса полихимиотерапии и при септическом состоянии непонятной этиологии; возраст – от 10 до 67 (36,1±1,7) лет, мужчин – 28 (73,7%), женщин – 10 (26,3%). Материал для исследования: кровь, мокрота, спинномозговая жидкость (СМЖ). Наряду с традиционными микологическим и рентгенологическим методами, использовали современные тест-системы (БИО-RAD, США), обеспечивающие определение антигенов *Aspergillus*, *Cryptococcus* и *Candida* в сыворотке крови и других биологических жидкостях.

При постановке этиологического диагноза руководствовались соответствующими международными критериями [1, 5, 7].

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью традиционных методов вариационной статистики.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты представлены в таблице 1.  
Таблица 1

Результаты обследования иммунокомпрометированных больных на наличие глубоких микозов

Наименование патологии	Обследовано больных		Из них с микозами		Без микозов	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
ВИЧ-инфекция	75	100	22	29,3	53	70,7
Гемобластозы	38	100	22	57,9	16	42,1
Всего	113	100	44	38,9	69	61,1

Как видно из таблицы, у больных с ВИЧ-инфекцией частота обнаружения глубоких микозов составила 29,3%, у больных с гемобластозами – 57,9%.

В таблице 2 представлена этиологическая структура глубоких микозов у обследованных больных. *Aspergillus* spp. составили 40,7% при ВИЧ-инфекции и в 81,8% – при гемобластозах, *Cryptococcus* spp. – 44,5% и в 18,2%, соответственно. *Candida* spp. как возбудители инвазивного кандидоза у больных с ВИЧ-инфекцией были обнаружены в 14,8%, при гемобластозах данный микоз не диагностировали.

Таблица 2

Этиологическая структура глубоких микозов у обследованных больных

Возбудители глубоких микозов	ВИЧ-инфекция		Гемобластозы	
	Абс.	%	Абс.	%
<i>Aspergillus</i> spp.	11	40,7	18	81,8
<i>Cryptococcus</i> spp.	12	44,5	4	18,2
<i>Candida</i> spp.	4	14,8	0	0
Всего	27	100	22	100

В таблице 3 показана пораженность глубокими микозами и их ассоциациями иммунокомпрометированных больных.

Таблица 3

Виды и частота глубоких микозов у иммунокомпрометированных больных

Глубокий микоз	ВИЧ-инфекция		Гемобластозы	
	Абс.	%	Абс.	%
Только аспергиллез	6	27,3	18	81,8
Только криптококкоз	8	36,4	4	18,2
Только инвазивный кандидоз	3	13,6	0	0
Ассоциация аспергиллеза и криптококкоза	4	18,2	0	0
Ассоциация аспергиллеза и инвазивного кандидоза	1	4,5	0	0
Всего	22	100	22	100

Как видно из таблицы, у больных с гемобластозами оппортунистические глубокие микозы были представлены только аспергиллезом (81,8%) и криптококкозом (18,2%). Сочетанных микозов не отмечали. При ВИЧ-инфекции чаще всего выявляли криптококкоз (36,4%), аспергиллез (27,3%), сочетание криптококкоза с аспергиллезом имело место в 18,2% случаях, инвазивный кандидоз – в 13,6%, сочетание аспергиллеза с инвазивным кандидозом – в 4,5%.

В таблице 4 показан основной диагноз обследованных больных с ВИЧ-инфекцией в зависимости от наличия глубоких микозов.

Таблица 4

Основной диагноз обследованных больных с ВИЧ-инфекцией в зависимости от наличия глубоких микозов

Стадия ВИЧ-инфекции	Количество больных					
	Всего		Без микозов		С микозами	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Стадия 2	1	1,3	1	1,9	0	0
Стадия 3	26	34,7	22	41,5	4	18,2
Стадия 4	48	64,0	30	56,6	18	81,8
Всего	75	100	53	100	22	100

Из таблицы видно, что у больных с микозами превалировала 4-я стадия ВИЧ-инфекции – 81,8%, у остальных 18,2% была 3-я стадия. У лиц без микозов наблюдали сдвиг в сторону более легких стадий: с 4-й было 56,6%, с 3-й стадией – 41,5%, со 2- стадией – 1,9%, то есть пациенты с ВИЧ-инфекцией с тяжелым исходным состоянием в большей степени подвержены микотическим осложнениям по сравнению с больными с относительно легким состоянием.

В таблице 5 рассмотрена частота применения антиретровирусной терапии (АРВТ) у лиц с ВИЧ-инфекцией. Можно заметить, что больные с микозами только в 45,5% получали АРВТ, без микозов – в 63,3%. Это служит показателем того, что специфическая терапия основного заболевания в определенной степени предупреждает микозную инвазию.

Таблица 5

Частота применения АРВТ у больных с ВИЧ-инфекцией

Прием АРВТ	Количество больных					
	Всего		Без микозов		С микозами	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
С АРВТ	42	56,0	33	62,3	10	45,5
Без АРВТ	33	44,0	20	37,7	12	54,5
Всего	75	100	53	100	22	100

В таблице 6 приведены данные о содержании лимфоцитов CD4+ у иммунокомпрометированных больных. У лиц с ВИЧ-инфекцией без микозов количество CD4+ составило 119,5±6,1 кл/мкл, у пациентов с микозами таких клеток было более, чем в два раза меньше – 56,9±2,3 кл/мкл (P<0,05). У больных с гемобластозами уровень CD4+оказался ожидаемо выше. У пациентов без микозов их было 402,5±15,7 кл/мкл, с микозами – почти в два раза меньше – 220,5±8,6 кл/мкл (P<0,05). Таким образом, подтверждается защитная роль CD4+ в отношении микозной инвазии у иммунокомпрометированных больных.

Таблица 6

Содержание CD4+ у иммунокомпрометированных больных

Наличие глубоких микозов	ВИЧ-инфекция	Гемобластозы
	M±m	M±m
С микозами	56,9±2,3	220,5±8,6
Без микозов	119,5±6,1	402,5±15,7
P	<0,05	<0,05

В таблице 7 рассмотрен уровень вирусной нагрузки у больных с ВИЧ-инфекцией в зависимости от наличия глубоких микозов. Из таблицы видно, что у пациентов с микозными осложнениями вирусная нагрузка составила 8,0·10<sup>6</sup>±3,1·10<sup>5</sup> вирусных частиц, без микозов – 5,60·10<sup>6</sup>±1,7·10<sup>5</sup>, что на 30% меньше. Таким образом, и здесь мы наблюдаем корреляцию между тяжестью основного заболевания и опасностью микотического осложнения.

Таблица 7

Вирусная нагрузка у больных с ВИЧ-инфекцией в зависимости от наличия глубоких микозов

Наличие глубоких микозов	Вирусная нагрузка (M±m)
С микозами	8,0·10 <sup>6</sup> ±3,1·10 <sup>5</sup>
Без микозов	5,60·10 <sup>6</sup> ±1,7·10 <sup>5</sup>

В таблице 8 проанализированы жалобы пациентов с ВИЧ-инфекцией.



Таблица 8

## Вовлеченность различных систем организма при ВИЧ-инфекции на основании жалоб больных

Система организма	Количество больных с соответствующими жалобами, %		
	Всего	Без микозов	С микозами
Легкие	68,0	58,5	86,4
Кожа и слизистые оболочки	76,0	79,2	63,6
ЦНС	81,3	73,6	95,5
Другие	92,0	90,6	95,5

Как видно из таблицы, у больных преобладали жалобы со стороны ЦНС: головные боли, нарушения зрения, снижение памяти и др. (81,3%). При микозах рост количества жалоб отмечали в отношении большинства систем организма (за исключением жалоб на кожу и слизистые оболочки) по сравнению с пациентами без микозов. Особенно рост был выражен в отношении жалоб на легкие (кашель, мокрота, одышка) (+27,9%) и ЦНС (+21,9%). Жалоб со стороны кожи и слизистых оболочек у лиц с микозами было меньше, чем без микозов (-15,6%).

В таблице 9 приведены жалобы больных с гемобластозами. Чаще всего жаловались на проблемы с легкими (84,2%). При микотических осложнениях наблюдали рост количества жалоб в отношении всех систем организма, по сравнению с больными без микозов, в частности, в отношении ЦНС (+17,0%), легких (+15,9%), кожи и слизистых оболочек (+13,6%).

Таблица 9

## Вовлеченность различных систем организма при гемобластозах на основании жалоб больных

Система организма	Количество больных с соответствующими жалобами		
	Всего	Без микозов	С микозами
Легкие	84,2	75,0	90,9
Кожа и слизистые оболочки	57,9	50,0	63,6
ЦНС	47,4	37,5	54,5
Другие	100	100	100

В таблице 10 рассмотрен спектр сопутствующих заболеваний у больных с ВИЧ-инфекцией в зависимости от наличия глубоких микозов.

Таблица 10

## Основные сопутствующие заболевания у больных с ВИЧ-инфекцией в зависимости от наличия глубоких микозов

Сопутствующее заболевание	Количество больных, %		
	Всего	С микозами	Без микозов
Кандидоз слизистой оболочки полости рта	36,0	4,5	49,1
Туберкулез	25,3	31,8	22,6
Вирусный гепатит С	18,7	18,2	18,9
Септическое состояние	16,0	0	22,6
Вирусный гепатит В	14,7	13,6	15,1
Онихомикоз	13,3	0	18,9
Анемия	9,3	27,3	1,9
Энцефалопатия	9,3	13,6	7,5
Хронический бронхит	5,3	13,6	1,9

У больных с ВИЧ-инфекцией выявлен широкий ряд сопутствующих заболеваний, однако он изменялся при присоединении микозного осложнения. Так, у пациентов с микозами туберкулез обнаруживали существенно чаще, чем без микозов (31,8% и 22,6%, соответственно). Значительно чаще выявляли анемию (27,3% и 1,9%). Кандидоз слизистой оболочки полости рта гораздо чаще определяли у лиц без микозов, чем с микозами (49,1 и 4,5%, соответственно). Это же можно сказать и о септическом состоянии: у больных с микозами его не наблюдали, тогда как у пациентов без

микозов отмечали в 22,6% случаев. По другим нозологиям различия были не столь существенными.

В таблице 11 рассмотрены сопутствующие заболевания у больных с гемобластозами.

Таблица 11

## Сопутствующие заболевания у больных с гемобластозами в зависимости от наличия глубоких микозов

Сопутствующее заболевание	Количество больных, %		
	Всего	С микозами	Без микозов
Септическое состояние	84,2	81,8	87,5
Пневмония	47,4	63,6	25,0
Кандидоз слизистой оболочки полости рта	42,1	36,4	50,0
Ринит	15,8	27,3	0
Поверхностный аспергиллез	10,5	18,2	0

Обращает на себя внимание высокий уровень пневмонии у пациентов с микозами, более чем в два раза превышающий таковой у лиц без микозов (63,6% и 25,0%, соответственно). В отношении кандидоза слизистой оболочки полости рта наблюдали тенденцию, аналогичную с ВИЧ-инфекцией: у больных с микозами данную патологию регистрировали реже, чем без глубоких микозов (50,0% и 36,4%, соответственно). У пациентов с глубокими микозами выявляли ринит (27,3%) и поверхностный аспергиллез (18,2%), тогда как у лиц без микозов указанные заболевания не обнаруживали.

Выявленные различия, по-видимому, обусловлены проявлениями глубоких микозов у обследованных пациентов и могут учитываться при диагностике грибковой инвазии и формировании групп риска. Однако они требуют еще дополнительного изучения и осмысления.

Таким образом, впервые в Узбекистане у иммунокомпрометированных больных, входящих в группы риска, при комплексном обследовании с применением современных серологических методов определена частота оппортунистических глубоких микозов. При гемобластозах она составила 57,9%, при ВИЧ-инфекции – 29,3%. Это указывает на необходимость крайне осторожного отношения к микотическим осложнениям у данного контингента больных, усиления мер профилактики и проведения неотложной адекватной терапии.

## ВЫВОДЫ

1. При целенаправленном обследовании иммунокомпрометированных больных, входящих в группы риска, частота обнаружения глубоких микозов при ВИЧ-инфекции составила 29,3%, а при гемобластозах – 57,9%.

2. В этиологической структуре глубоких микозов *Aspergillus spp.* составили 40,7% при ВИЧ-инфекции и в 81,8% – при гемобластозах, *Cryptococcus spp.* – 44,5% и 18,2%, соответственно. *Candida spp.* как возбудители инвазивного кандидоза у больных с ВИЧ-инфекцией были обнаружены в 14,8%, при гемобластозах данный микоз не диагностировали.

3. Выявлены клинические и лабораторные различия у иммунокомпрометированных больных с ВИЧ-инфекцией и гемобластозами в зависимости от наличия глубоких микозов, которые необходимо учитывать при обследовании пациентов и формировании групп риска.

4. Использование современных тест-систем (определение антигена) позволяет ускорить и повысить

точность диагностики оппортунистических глубоких микозов, обуславливая своевременное начало этиотропной терапии.

5. Полученные результаты указывают на необхо-

димость настороженного отношения к микотическим осложнениям у данного контингента больных, усиления мер профилактики и проведения своевременной и адекватной этиотропной терапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Климко Н.Н.* Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 3-е изд. перераб. и доп. – М.: Фармтек, 2017: 277 с. [Klimko N.N. Mikozy: diagnostika i lechenie. Rukovodstvo dlya vrachej. 3-e izd. pererab. i dop. – М.: Farmtek, 2017: 277 s. (In Russ)].
2. *Филоненко Е.С., Крячок И.А.* Инвазивные микозы в гематологии. Современные стандарты диагностики и лечения. Клиническая онкология. 2015; 4 (20): 49-61. [Filonenko E.S., Kryachok I.A. Invazivnye mikozy v gematologii. Sovremennye standarty diagnostiki i lecheniya. Klinicheskaya onkologiya. 2015; 4 (20): 49-61 (In Russ)].
3. *Тилавбердиев Ш.А., Мавлянова Ш.З.* Микозы и ВИЧ-инфекция. Мед. журнал Узбекистана. 2015; 5: 67-71. [Tilavberdiev Sh.A., Mavlyanova Sh.Z. Mikozy i VICH-infekciya. Med. zhurnal Uzbekistana. 2015; 5: 67-71 (In Russ)].
4. *Brown G.D., Denning D.W., Gow N.A., et al.* Hidden killers: human fungal infections. Sci. Transl. Med. 2012; 19 (4): 165.
5. *Васильева Н.В., Климко Н.Н., Цинзерлинг В.А.* Диагностика и лечение инвазивных микозов: современные рекомендации. Вестник СПбМАПО. 2010; 4: 5-18. [Vasil'eva N.V., Klimko N.N., Cinzerling V.A. Diagnostika i lechenie invazivnyh mikozy: sovremennye rekomendacii. Vestnik SPbMAPO. 2010; 4: 5-18 (In Russ)].
6. *Koulenti D., Garnacho-Montero J., Blot S.* Approach to invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. Curr. Opin. Infect. Dis. 2014; 27: 174-183.
7. *Schmiedel Y., Zimmerli S.* Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and Pneumocystis pneumonia. SwissMedWkly. 2016; 146: w14281.
8. *Srichatrapimuk S., Sungkanirapath S.* Integrated therapy for HIV and cryptococcosis. AIDS Res. Ther. 2016; 13: 42.

Поступила в редакцию журнала 10.09.2018

Рецензент: М.А. Шевяков



# СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРАЛЬНО- МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРИРОДНЫХ И КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *ASPERGILLUS NIGER*

Халдеева Е.В. (зав. лаб.)\*, Лисовская С.А. (в.н.с.),  
Глушко Н.И. (с.н.с.), Баязитова А.А. (м.н.с.)

Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии  
Роспотребнадзора, Казань, Россия

©Коллектив авторов, 2018

*Изучены культурально-морфологические и биохимические свойства 36 клинических и 27 природных изолятов *Aspergillus niger*. Проведено сопоставление их скорости роста, интенсивности спорообразования при различных температурах культивирования. Отмечена способность всех изученных изолятов к росту при 37 °С. Показано, что повышение температуры культивирования приводит к снижению скорости роста, у части изолятов – к существенному (в 2 и более раз) увеличению количества спор. Обнаружен более высокий уровень амилалитической и липолитической активности природных изолятов по сравнению с клиническими.*

Выявлены различия в изменении амилалитической и липолитической активности клинических и природных изолятов *A. niger* при повышении температуры культивирования. Установлен высокий уровень целлюлазной активности клинических штаммов. Полученные данные могут быть использованы для разработки механизмов оценки потенциального риска контаминации плесневыми грибами и подтверждения этиологической роли *A. niger* в патогенезе заболевания.

**Ключевые слова:** *Aspergillus niger*, скорость роста, спорообразование, липолитическая активность, амилалитическая активность, целлюлазная активность

## COMPARISON OF CULTURAL- MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF ENVIRONMENTAL AND CLINICAL ISOLATES OF *ASPERGILLUS NIGER*

Khaldeeva E.V. (head of the laboratory), Lisovskaya  
S.A. (leading scientific collaborator), Glushko N.I.  
(senior scientific collaborator), Bayazitova A.A.  
(junior scientific collaborator)

Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology,  
Kazan, Russia

©Коллектив авторов, 2018

*The cultural-morphological and biochemical properties of 36 clinical and 27 environmental isolates of *Aspergillus niger* have been studied. A comparison of their growth rate, the intensity of spore formation at different temperatures of cultivation was carried out. The ability of all studied isolates to grow at 37 °C was noted. It is shown that the increase in the temperature of cultivation leads to a decrease in the growth rate, in some isolates – to a significant (2 or more times) increase in the number of spores. Higher level of amylolytic and lipolytic activity of environmental isolates, compared with clinical, was shown. Differences in the changes in amylolytic and lipolytic*

\* Контактное лицо: Халдеева Елена Владимировна,  
e-mail: mycology-kazan@yandex.ru

*activity of clinical and environmental *A. niger* isolates were noted with the increasing of cultivation temperature. High level of cellulase activity of clinical strains was revealed. The obtained data can be used to develop mechanisms for assessing the potential risk of contamination with molds and to confirm the etiological role of *A. niger* in the pathogenesis of the disease.*

**Key words:** *Aspergillus niger*, growth rate, spore formation, lipolytic activity, amylolytic activity, cellulase activity

## ВВЕДЕНИЕ

Грибы рода *Aspergillus*, в том числе *Aspergillus niger*, широко распространены в окружающей среде. Основным местообитанием и резервуаром *Aspergillus* spp. считают почву, где они выполняют функцию редуцентов органических субстратов [1]. Обильное образование спор, распространяемых воздушными потоками, приводит к появлению конидий этих грибов в воздухе, в том числе общественных зданий, жилых помещений, лечебных учреждений и т.д. Споры аспергиллов, постоянно присутствующие в воздухе, обладают термо- и засухоустойчивостью, имеют небольшие размеры и, попадая в организм человека, могут приводить к колонизации грибами слуховых проходов, носоглотки и легких. Вдыхание спор и последующая колонизация дыхательных путей могут обуславливать развитие аспергиллеза легких у людей, предрасположенных к оппортунистическим микозам, а также к микогенной сенсibilизации организма [2-7].

Природные штаммы *Aspergillus* отличаются генетическим разнообразием, при этом их вирулентность для человека зависит от многих факторов [7]. Среди известных факторов вирулентности *Aspergillus* spp. отмечают термотолерантность, т.е. способность роста при различных температурах (в т.ч. +37 °С), скорость роста, интенсивность спорообразования, протеазную активность и др.

Особенность диагностики заболеваний, вызываемых *Aspergillus* spp., обусловлена тем, что эти грибы достаточно часто присутствуют в посевах, однако доказать их этиологическую значимость не всегда возможно, и нередко присутствие плесневых грибов рассматривают как контаминацию либо первичного материала, либо самих посевов. До настоящего времени не существует тестов, позволяющих однозначно доказать клиническое или природное происхождение штамма, хотя их разработка, безусловно, могла бы заметно повысить эффективность диагностики и лечения таких инфекций.

Несмотря на широкую распространенность *A. niger* и частоту вызываемых им заболеваний, в частности отомикозов, остается неясным, имеют ли клинические изоляты *A. niger* те же характеристики, что и природные штаммы, или же попадание в организм человека приводит к проявлению особых свойств, а также могут ли природные штаммы представлять угрозу здоровью человека в качестве возбудителя грибковых инфекций.

Цель работы – изучение морфологических, биохимических и вирулентных особенностей клинических и природных изолятов *A. niger*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили:

1. Клинические изоляты *A. niger*, в том числе: 9 штаммов, выделенных из слуховых проходов при отомикозах (1 группа), и 27 штаммов, изолированных с кожных покровов при микозах (вторая группа).
2. Природные изоляты *A. niger*: 27 штаммов, выяв-



ленных из объектов окружающей среды, в том числе: из почвы городской среды (6 штаммов) и из жилых помещений (21 штамм).

3. Музейный штамм *A. niger* У-1 из коллекции.

Идентификацию *A. niger* проводили по Klich M.A. [8]. Отбор материала для выделения грибов из клинического материала осуществляли методом мазков и соскобов с последующим посевом на среду Сабуро и культивированием при  $30 \pm 2$  °С в течение 3-5 суток.

Отбор проб почвы для оценки обсемененности микромицетами выполняли согласно ГОСТ 17.4.4.02-84. Полученную пробу суспендировали, из разведенной в сто раз суспензии выполняли посев газоном на среды Чапека и Сабуро. Пробы из жилых помещений отбирали методом мазков и соскобов с последующим посевом на среды Сабуро и Чапека. Культивирование проводили при температуре  $30 \pm 2$  °С. Колонии микромицетов подсчитывали и идентифицировали на 3-5 день.

Оценивали морфологические особенности выделенных штаммов: линейную скорость роста при различных температурах культивирования, интенсивность спорообразования. Выделенные изоляты тестировали на гемолитическую, липолитическую, амилитическую и целлюлазную активность.

Для определения линейного роста *A. niger* измеряли диаметр колоний (от места посева до конца зоны роста мицелия), растущих на плотной питательной среде. Для этого исследуемый штамм уколоч высеивали на поверхность чашки Петри со средой Сабуро. Чашки помещали в термостат на 28 °С и 37 °С на пять дней. Диаметр колонии измеряли в двух взаимоперпендикулярных направлениях в двух-трех повторностях на третий, четвертый и пятый день роста культуры.

Интенсивность спорообразования оценивали микроскопически путем подсчета количества конидий с помощью счетной камеры. Для этого лабораторным сверлом отбирали агаровые блоки с культурой, помещали их в пробирку с 5 мл физиологического раствора и встряхивали в течение 10 минут. Полученную суспензию микроскопировали, используя счетную камеру (камеру Горяева), подсчет проводили не менее чем в 5 каплях суспензии.

Липолитическую активность *A. niger* оценивали в тесте на гидролиз эфиров жирных кислот. Штаммы *A. niger* пересевали на индикаторную среду (содержащую твин-80) для определения липолитической активности [9]. Засеянные чашки Петри культивировали при 30 °С и 37 °С в течение 3-5 суток. На наличие липазы указывало образование вокруг штриха или колонии непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот, освобожденных из твина.

Для выявления амилитической активности использовали агаризованную среду с добавлением  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  и растворимого крахмала в качестве единственного источника углерода. На среду для определения амилитической активности уколоч высеивали исследуемые штаммы *A. niger*. Чашки помещали в термостат на 30 °С и 37 °С на пять суток.

Гидролиз крахмала обнаруживали после обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Среда, содержащая крахмал, окрашивалась в синий цвет, если крахмал гидролизировался до декстринов. Зону гидролиза крахмала измеряли в миллиметрах от края колонии до границы светлой зоны, по величине зоны оценива-

ли амилитическую активность [9].

Наличие гемолитической активности клинических штаммов устанавливали с помощью синтетической среды с добавлением крови. На среду уколоч высеивали исследуемые штаммы *A. niger*. Чашки помещали в термостат при 28 °С на пять дней. Наличие гемолитической активности выявляли по наличию и размерам зон просветления вокруг растущей колонии грибов [9].

Наличие протеолитической активности оценивали с помощью синтетической среды ( $\text{1K}_2\text{HPO}_4$ ;  $0,5 \text{MgSO}_4$ ;  $0,01\text{FeSO}_4$ ) с добавлением яичного белка [9]. На среду уколоч высеивали исследуемые штаммы *A. niger*. Чашки помещали в термостат при 28 °С на пять дней. Наличие протеолитической активности определяли по образованию зон просветления вокруг колонии.

Определение целлюлазной активности проводили на среде Гетчинсона с фильтровальной бумагой в качестве единственного источника углерода. О целлюлазной активности судили по степени деградации фильтровальной бумаги [9]. Рост грибов оценивали по 5-бальной системе: 1 балл – обнаружено прорастание отдельных спор; 2 балла – слабый рост мицелия, отсутствие разрушенных участков целлюлозы; 3 балла – обильный рост мицелия, в виде ветвящихся гиф; 4 балла – отчетливо виден рост грибов, хорошо развитый мицелий обволакивает целлюлозный субстрат; 5 баллов – визуально отмечается деградация субстрата.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Способность роста при 37 °С является одним из признаков потенциальной вирулентности штаммов плесневых грибов, в частности *A. niger*.

При культивировании клинических и природных изолятов *A. niger* на среде Сабуро при +37 °С выявили, что способностью роста обладали все изученные штаммы. В то же время линейная скорость роста большинства штаммов была ниже, чем при +30 °С. Незначительное увеличение скорости роста (не более 15%) демонстрировали два клинических штамма первой группы (У-12 и У-13) и три – второй (К-14, К-210, К-212), а также один природный (W-8) штамм. При этом скорость роста и величина колоний клинических и природных штаммов практически не отличались, за исключением природного штамма W-9, показавшего высокую скорость роста при 30 °С, и клинических штаммов первой группы У-15 и У-16, скорость роста которых была в 1,5 раза ниже, чем остальных клинических изолятов.

При культивировании на среде Чапека при +30 °С скорость роста колоний была существенно ниже, чем на среде Сабуро. При повышении температуры культивирования до +37 °С скорость роста на среде Чапека практически не менялась или незначительно повышалась.

Интенсивность спорообразования является одним из факторов, способствующих распространению грибов в окружающей среде и последующей колонизации. При исследовании интенсивности спорообразования обнаружили существенное (в 2 и более раз) увеличение количества спор при 37 °С для 36,1% клинических и 11,1% природных штаммов.

Снижение количества спор было отмечено у 55,5% и 40,7% клинических штаммов 1 и 2 групп соответственно и у 33,3% природных штаммов. Незначительное влияние температуры на спорообразование на-

блюдали у 18,5% и 22,2% клинических штаммов 1 и 2 групп соответственно и у 55,5% природных штаммов. Наиболее заметное увеличение интенсивности спорообразования под влиянием температуры установлено для клинических штаммов 2 группы (выделенных с кожи). Контрольный штамм У-1 при 37 °С демонстрировал очень слабый рост при полном отсутствии спорообразования.

Для *A. niger*, как и других видов *Aspergillus*, характерна секреция большого количества различных ферментов, многие из которых эволюционировали, чтобы обеспечить грибу питание за счет разложения растительных и животных остатков. Помимо этого, ферменты являются факторами вирулентности, разрушая структурные барьеры хозяина и, тем самым, облегчая инвазию в ткани.

Гемолитическая активность *A. fumigatus*, обусловленная присутствием гемолитического протеина Асп-гемолизина, изучена достаточно хорошо [10-11]. В литературе имеются упоминания о гемолитической активности экстрактов некоторых штаммов *A. niger* [11]. Однако в результате проведенных нами исследований среди изученных штаммов обладающих гемолитической активностью изолятов *A. niger* выявлено не было.

Липолитическая активность *Aspergillus* spp., обусловленная секрецией фосфолипаз, способствует нарушению мембраны клеток хозяина и их лизису [12]. Для *A. fumigatus* выявлена активность четырех фосфолипаз (А-Д), причем отмечено, что секреция фосфолипаз у клинических изолятов *A. fumigatus* ниже, чем у природных штаммов [7, 13]. При изучении липолитической активности клинических и природных штаммов *A. niger* подтвердили полученные ранее для *A. fumigatus* результаты. Так, было установлено, что липолитическая активность природных изолятов *A. niger* была в 1,3-1,6 раз выше, чем клинических штаммов (Рис.1). При этом липолитическая активность клинических изолятов обеих групп при 30±2 °С практически не отличалась.

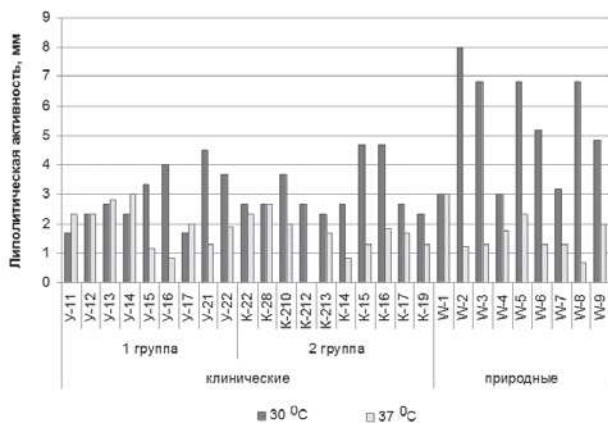


Рис. 1. Липолитическая активность некоторых клинических и природных изолятов *A. niger* при различных температурах культивирования.

Увеличение температуры культивирования до 37 °С приводило к снижению липолитической активности 92,6% природных и 69,4% клинических штаммов. В то же время повышение температуры обуславливало усиление липолитической активности 44,4 % клинических штаммов первой группы, а в случае 7,4% природных и 11,1% клинических штаммов уровень активности не

изменялся. В итоге при 37 °С липолитическая активность клинических и природных штаммов была практически одинаковой.

Похожие результаты были получены при изучении амилолитической активности. Природные штаммы *A. niger* в большинстве случаев (70,4%) при 30 °С демонстрировали значительно более высокий уровень амилолитической активности по сравнению с клиническими изолятами обеих групп. Однако при повышении температуры до 37±2 °С амилолитическая активность природных штаммов уменьшалась на 90-98%, тогда как клинических – в среднем на 30-40 % (Рис. 2), что, вероятно, связано с секрецией клиническими штаммами термостабильных амилаз.

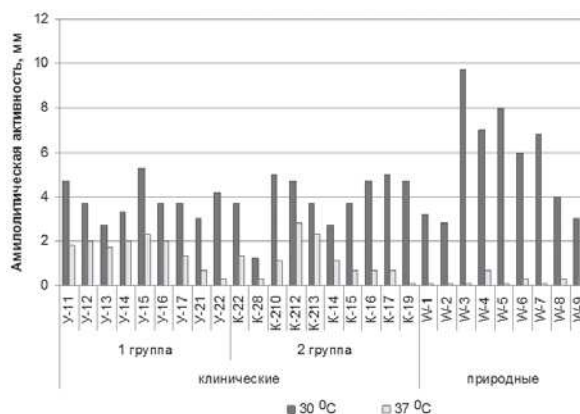


Рис. 2. Амилолитическая активность некоторых клинических и природных изолятов *A. niger* при различных температурах культивирования.

Таким образом, сравнение амилолитической активности изолята при двух температурах культивирования может быть использовано в качестве простого теста, позволяющего определить происхождение штамма, исключить либо подтвердить его этиологическую значимость.

Протеолитическая активность как клинических, так и природных изолятов *A. niger* выражена слабо. При этом между клиническими и природными изолятами имелось некоторое отличие: протеолитическая активность при 30 °С отсутствовала у 74,1% природных изолятов и лишь у 22,2% и 25,9% клинических штаммов 1 и 2 групп соответственно (Рис. 3).

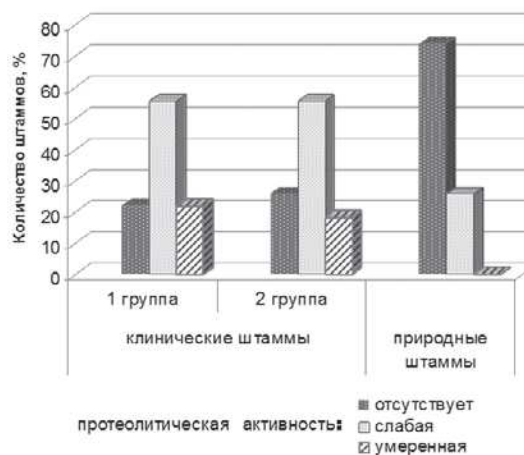


Рис. 3. Протеолитическая активность клинических и природных изолятов *A. niger* при температуре культивирования 30±2 °С на среде Сабуро.

Целлюлазная активность характеризует способность грибов к биодеструкции целлюлозосодержащих материалов. Как и другие аспергиллы, *A. niger* способен секретировать ферменты, разрушающие органические субстраты. Изучение целлюлазной активности клинических и природных штаммов показало, что большинство клинических штаммов проявляли высокую целлюлазную активность (на 4-5 баллов) и только 1 клинический штамм первой группы обладал более низкой активностью (3 балла). В то же время целлюлазная активность природных изолятов варьировалась от 1 до 5 баллов. Так, максимальную активность (5 баллов) проявляли 55,6% природных штаммов, наиболее низкую – 3 (11,1%) природных изолята (Рис. 4).

Наиболее высокую целлюлазную активность среди природных штаммов демонстрировали изоляты, выделенные из почвы и жилых помещений с очагами биодеструкции, наименьшую – из жилых помещений без признаков биодеструкции.

### ВЫВОДЫ

Способностью к росту при 37±2 °С обладают как клинические, так и природные изоляты *A. niger*.

Повышение температуры культивирования снижает скорость роста большинства как клинических, так и природных изолятов *A. niger*, при этом отмечено увеличение интенсивности спорообразования 36,1% клинических и 11,1% природных штаммов.

Природные изоляты *A. niger* при 30±2 °С проявляют более высокую липолитическую и амилолитическую активность по сравнению с клиническими штаммами.

Снижение амилолитической активности природ-

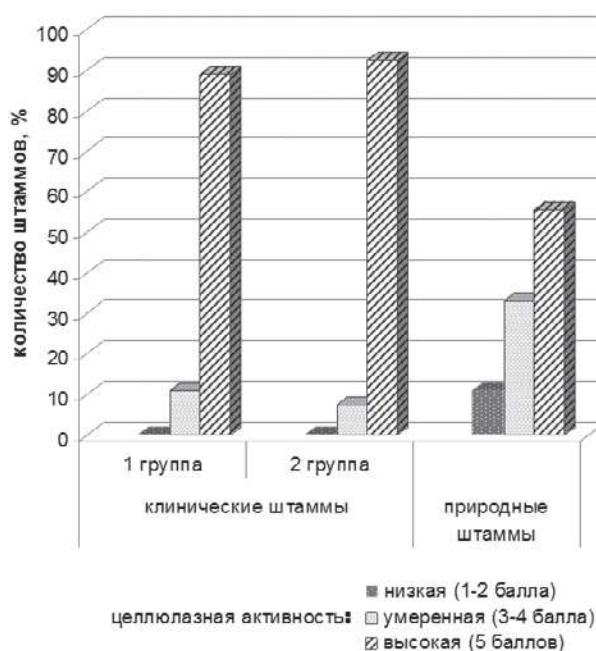


Рис. 4. Целлюлазная активность клинических и природных изолятов *A. niger*.

ных штаммов *A. niger* при повышении температуры культивирования до 37±2 °С может быть использовано в качестве критерия оценки этиологической роли гриба.

Клинические изоляты *A. niger* обладают выраженной целлюлазной активностью.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Марфенина О.Е., Фомичева Г.М. Потенциальные патогенные мицелиальные грибы в среде обитания человека. Современные тенденции // Микология сегодня / Под ред. Ю.Т.Дьякова, Ю.В.Сергеева. Том 1. М.: Национальная академия микологии, 2007: 235-266 [Marfenina O.E., Fomicheva G.M. Potencial'nye patogennnye micelial'nye griby v srede obitaniya cheloveka. Sovremennye tendencii // Mikologiya segodnya / Pod red. Yu.T.D'yakova, YU.V. Sergeeva. Tom 1. M.: Nacional'naya akademiya mikologii, 2007: 235-266 (In Russ)].
2. Клишко Н.Н., Шадривова О.В., Хостелиди С.Н. и др. Инвазивный аспергиллез: результаты многоцентрового исследования. Онкогематология. 2014; 9 (2): 13-19 [Klimko N.N., SHadrivova O.V., Hostelidi S.N. i dr. Invazivnyj aspergillez: rezultaty mnogocentrovogo issledovaniya. Onkogematologiya. 2014; 9 (2): 13-19 (In Russ)].
3. Иванова Ю.А. Плесневые поражения кожи и мягких тканей в клинической практике. Проблемы медицинской микологии. 2012; 14 (3): 43-48 [Ivanova YU.A. Plesnevye porazheniya kozhi i myagkih tkaney v klinicheskoy praktike. Problemy medicinskoj mikologii. 2012; 14 (3): 43-48 (In Russ)].
4. Kousha M., Tadi R., Soubani A.O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. Eur. Respir. Rev. 2011; 20 (21): 156-72.
5. Chaturvedi R., Chaturved S. A brief survey of fungi as allergen in respiratory allergic patients by intradermal skin sensitivity test in Terai area. J. of Applied Biology & Biotechnology. 2013; 1 (03): 021-023.
6. Козлова Я.И., Васильева Н.В., Чилина Г.А. и др. Микогенная аллергия у жителей помещений, пораженных микромицетами. Проблемы медицинской микологии. 2008; 10 (2): 17-21 [Kozlova YA.I., Vasil'eva N.V., Chilina G.A. i dr. Mikogennaya allergiya u zhitelej pomeshchenij, porazhennyh mikromicetami. Problemy medicinskoj mikologii. 2008; 10 (2): 17-21 (In Russ)].
7. Abad A., Fernandez-Molina J.V., Bikandi J., et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. Rev. Iberoam. Micol. 2010; 27: 155-182.
8. Klich M.A. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 2002: 116 pp.
9. Методы экспериментальной микологии / Под ред. В.И. Билай. «Наукова думка», 1982 [Metody ehksperimental'noj mikologii. «Naukova dumka». Pod red. V.I. Bilai. 1982 (In Russ)].
10. Berne S., Lah L., Sepčić K. Aegerolysins: Structure, function, and putative biological role. Protein Sci. 2009; 18: 694-706.
11. Nayak A.P., Green B.J., Beezhold D.H. Fungal hemolysins. Med. Mycol. 2013; 51:1-16.
12. Rementeria A., Lopez-Molina N., Ludwig A., et al. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. Rev. Iberoam. Micol. 2005; 22: 1-23.
13. Shen D.K., Noodeh A.D., Kazemi A., et al. Characterisation and expression of phospholipases B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. FEMS Microbiol. Lett. 2004; 239: 87-93.

Поступила в редакцию журнала 29.06.2018

Рецензенты: Т.С. Богомолова, И.А. Рябинин



# ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ МИГРАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ХОДЕ ПОЧКОВАНИЯ CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

<sup>1</sup>Степанова А.А. (зав. лаб.), <sup>1</sup>Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой), <sup>2</sup>Ямагучи М. (главный специалист), <sup>2</sup>Чибана Х. (профессор), <sup>1</sup>Чилина Г.А. (зав. лаб.), <sup>1</sup>Босак И.А. (с.н.с.)

<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, 2018

Представлены данные по ультраструктурным аспектам динамики миграции компонентов клетки в ходе *in vitro* почкования дрожжевых клеток штамма (РКПГУ-1067) *Cryptococcus neoformans*. Материнские клетки *C. neoformans* содержат одно интерфазное ядро, небольшое число мелких митохондрий, плотный цитозоль, многочисленные свободные рибосомы, одну крупную вакуоль, 1-2 мелких липидных включений. В ходе почкования размеры ядра и ядрышка увеличиваются наряду с возрастанием уровня хроматизации. Процесс почкования материнской клетки сопровождается увеличением числа митохондрий без формирования митохондриального ретикула.

**Ключевые слова:** *in vitro*, миграция органелл, почкование, *Cryptococcus neoformans*, ультраструктура

# CYTOLOGICAL INVESTIGATIONS OF CELL COMPONENTS MIGRATION DYNAMICS DURING BUDDING IN THE YEAST CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

<sup>1</sup>Stepanova A.A. (head of the laboratory), <sup>1</sup>Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the department), <sup>2</sup>Yamaguchi M.M. (grand-fellow), <sup>2</sup>Chibana H. (associated professor), Chilina G.A. (head of the laboratory), Bosak I.A. (senior scientific collaborator)

<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, 2018

The ultrastructural aspects of cell component migration dynamics during *in vitro* budding of *Cryptococcus neoformans* yeast cells strain (PKPGU-1067) were presented. The mother cells of *C. neoformans* before budding had one interphase nucleus, dense cytosol, numerous free ribosomes, one large vacuole and 1-2 storage lipids. During budding, the sizes of nucleus and nucleolus were increased along with the increase of level of chromatization. The process of *C. neoformans* budding accompany with increasing in number of mitochondria without the formation of one giant

\* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна, e-mail: amaliya.stepanova@szgmu.ru

organelle.

**Key words:** budding, *in vitro*, migration of organelles, *Cryptococcus neoformans*, ultrastructure

## INTRODUCTION

*Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuill. is basidiomycetous yeast, opportunistic pathogen. Previously on ultrastructural level we investigated the yeast cells morphogenesis of this species *in vitro* and *in vivo* on the example of clinical [1-7] and natural [8] strains of this species. Special researches have been devoted the senescent and desiccated *in vitro* growing yeast cells of *C. neoformans* [9] and patterns of interactions with murine lung macrophages [10]. Before on the example of two species from one *Cryptococcus* [*C. albidus*: 11, *C. laurentii*: 12] and different genus [*Malassezia pachydermatis*: 13, *Rhodotorula minuta*: 14] we revealed differences in the organellography during yeast cells budding and made the assumption that this data may be important for the taxonomical and phylogenetic investigations. Thus, we decided continue this investigations on the example of another yeast species from genus *Cryptococcus* – *C. neoformans*.

## MATERIALS AND METHODS

We studied strain (PKPGU-1067, Russian collection of pathogenic fungi) of *C. neoformans* isolated from HIV-infected patient. The virulence of strain PKPGU-1067 was determined as medium with LD<sub>50</sub> = 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cells/mouse after intravenous injection [15].

For fixation we used the part of fungal colony after 72 hours of cultivation on solid Sabouraud's agar medium at 37 °C. For TEM samples were fixed in 3% glutaraldehyde buffer and post-foxed in 1% osmium tetroxide, then dehydrated and embedded in epoxy resin. The ultrathin sections were cut by Ultratome LKB V and stained with uranyl acetate and lead citrate. The sections were observed on the transmission electron microscope (TEM) JEM 100 SX (Jeol, Tokyo, Japan).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Transmission electron microscopy. Mother cells before budding.** The central part of cell occupied with the interphase nucleus, one large and several small vacuoles. Large vacuole was similar in size with nucleus (Fig. 1 a). Nucleus and large vacuole occupied the main volume of mother cells. The nucleus localized near cell wall and opposite to vacuole, was spherical (2,2 μm) in form, contain moderate level of randomly distributed diffuse chromatin and near nucleolar envelope condensed one (Fig. 1 a). Nucleolus spherical, large (0,5 μm), composed with similar amount of granular and fibrillar components, localized in contacts with the block of the condensed chromatin (Fig. 1 a, b, arrow), which connected with nuclear envelope. Numerous ribosomes were localized on the outer nuclear membrane.

Vacuole localized opposite budding scar (Fig. 3) and contain the randomly distributed thin-fibrillar material. The mother cells on this and another stages of development were not different among themselves in vacuolar content structure, which significantly distinguished this species from previously investigated strain of the *C. albidus* [11] and draw together with *C. laurentii* [12], *M. pachydermatis* [13] and *Rhodotorula minuta* [14].

Mitochondria localized uniformly in the yeast cells (Fig. 1 a, 3 a). The number of these organelles varied from

2 to 4 on median cell section. They were spherical (0,5 µm) and ellipsoidal (0,5x0,6 µm) in form, contain matrix with moderate electron density and numerous light chaotically oriented cristae. Mitochondrial matrix was identical electron density with cytosol. The storage substances in form of 1 or 2 small lipid droplets (Fig. 1 a), which localized in peripheral part of cytosol. For comparison, in the mother cells of *C. albidus* [11], *C. laurentii* [12] and *R. minuta* [14], which growth in exponential phase (after 24 hour growth in YPD medium 30 °C), storage substances were absent. Contrary, for mother yeast cells of *M. pachidermatis* [13], which grows in similar condition, were typical presence the single large lipid inclusion situated opposite the budding scar. For the mature yeast cells *C. neoformans* with different virulence after 7 days of sowing on the Sabouraud's agar [3] were typical presence of different types of numerous storage substances.

Cytosol was moderate electron density, contain numerous free ribosomes. Single rare small (from 30 to 60 nm) light vesicles were revealed near cell wall. This situation was typical for mother cells *C. laurentii* [12]. But in mother cells of *C. albidus* [11], *M. pachidermatis* [13] and *R. minuta* [14] before budding, which growth in another condition as last species, the secretory vesicles with the same or another morphology in this and another stages were numerous.

Single cisterns of Golgi and microbodies absent on this in another developmental stage of budding. In the yeast cells *C. neoformans* after 7 days of beginning of infection in mouse lung and brain independent of its virulence [3], microbodies appear.

The cisterns of rough endoplasmic reticulum (ER) on all stages of budding were rare, short, straight or slightly curved, occupied peripheral position in cells (Fig. 1 c, 3). The small amount of rough ER were typical for mother cells of another basidiomycetous yeast species [*C. albidus*: 11; *C. laurentii*: 12, *M. pachidermatis*: 13; *C. neoformans*: 1-3, 8 and etc.].

Plasma membrane was in close contact with the electron-transparent thin (0,17 µm) light cell wall (Fig. 1 a) which supply with single budding scar (with mean diameter 0,6 µm). Cell walls whit median electron density, composed with 2 layers (inner thick dark with irregular outer surface and outer thin light).

**Budding** was started by development in the scar region evagination of plasma membrane and cell wall, which contain cytosol and free ribosomes (Fig. 1 d). In this period, the nucleus migrated from basal part of mother cell in its median part and localized near vacuole (Fig. 3). Soon during the isodiametrical growth the spherical bud was formed (Fig. 1 e, 3). The sizes of nucleus and nucleolus become larger. In nucleus the level of condensed chromatin increased significantly (Fig. 1 f, g), what was correlated with initiation of chromosome duplication (DNA synthesis) during budding. The analogous situation also took place with in vitro growing cells in species *C. albidus* [11]; *C. laurentii* [12], *M. pachidermatis* [13] and *R. minuta* [14]. In nucleolus the number of granular component was distinctly increased.

The numbers of mitochondria were increased slightly (before 5-6 on median section) (Fig. 1 f, g) without formation of mitochondrial reticulum which concentrated near nucleus, what was typical for budding cells of another yeast species [*C. albidus*: 11; *C. laurentii*: 12, *R. minuta*: 14].

The development of mitochondrial reticulum was typical for cells of strong virulent *C. neoformans* strains which infected mouse brain after seven days of experiments [3, 4]. Contrary, in the yeast cells of *M. pachidermatis* [14], the number of mitochondria, peculiarity of its topography and ultrastructure during budding were constant. In a whole, the activation of nucleolus and chondriome correlated with synthesis of cell wall and polysaccharide capsule, cytosol, free ribosomes and another cell component, which migrate in the developing bud.

During the *C. neoformans* bud growth, the cytosol, numerous free ribosomes, several single small mitochondria, small vacuoles (Fig. 1 d, e), rare short ER cisterns and rare single secretory vesicles were passes in its content from mother cell cytosol through isthmus. When the bud is about half size of the mother cells, the nucleus situated near isthmus (Fig. 1 e, f) and then migrated from it's in the developing bud content. In this period the isthmus was wide (1,2 µm), and large nucleolus (0,70 µm) was visible in the part of nucleus which localized in mother cell cytosol. According the data in literature, during of *C. laurentii* [10] yeast cells budding, the nucleus was revealed in the bud content and undergo mitosis in isthmus after which one nucleus stay in bud and another return in mother cell. According the data in literature similar pattern of nucleus behavior was typical for the budding cells *C. neoformans* [16].

After division completion, we observed one strongly chromatized irregular in form and small sized (1,1x0,9 µm) nucleus in mother cell and another in bud cytosol (1,4x0,8, Fig. 2 a). Later the size of nucleolus in bud and mother cell gradually increased and their forms became spherical.

**The mother and daughter cells during and after separation.** After mitosis, cytokinesis in middle part of isthmus was start. In this region the wedge-shaped electron transparent septum was simultaneously formed during the centripetal grow before central part (Fig. 1 h, arrows) At last, in the middle part of isthmus thick (0,2), continuous and light septum was formed (Fig. 1 I arrow, 2 a). The subsequent daughter cell separation from mother one passed through the middle layer of septa (Fig. 1 j arrow, 2 b, c). In the mother cells topography and number of organelles after this process returned in condition before budding (Fig. 3). One spherical (1,6 µm) nucleus with higher level of chromatization localized in central part of daughter cell (Fig. 2 c, e). It contains one nucleolus (Fig. 2 e) in which granular component predominate. Several small spherical vacuoles (Fig. 2 d-e) contain the thin-fibrillar material and membranous fragments. The number of spherical (0,5-0,6 µm) mitochondria (Fig. 2 e, g) varied from 2 to 3. The number of free ribosomes and cisterns of ER was similar with the mother cells after budding. The moderate number (from 15 to 18) of light secretory vesicles present on the median cell section (Fig. 2 d). They localized in the cytosol of middle part of daughter cell. Single small lipid inclusions (Fig. 2 f, g) present in cytosol in this period. Soon separated daughter cell undergo by isodiametrical growth (Fig. 2 g), during which nucleus localized near cell wall (Fig. 2 g), large vacuole by the way of fusion of several small one was formed. In this time synthesis of the cell wall, cytosol, free ribosomes and proliferation of mitochondria take place. Simultaneously, the nucleus size was increase and level of chromatization decrease. Later, the nucleus and



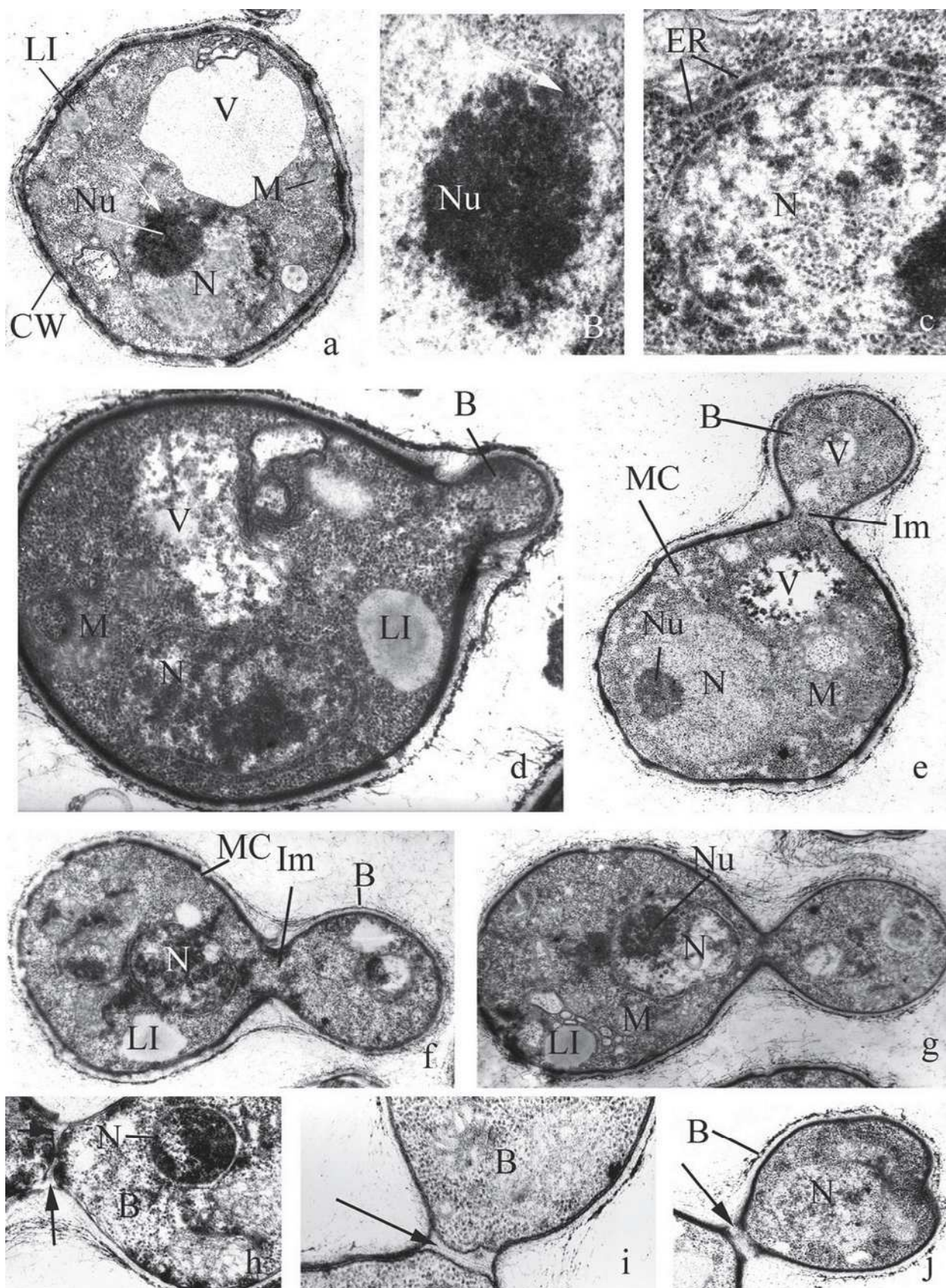


Fig. 1. Ultrastructure of *in vitro* growing *C. neoformans* budding yeast cells. Explanation for this and another figures: B – bud, BC – budding cells; CW – cell wall, DC – daughter cell, ER – endoplasmic reticulum, Im – isthmus, M – mitochondrion(ia), MC – mother cell, MR – mitochondrial reticulum, N – nucleus, Nu – nucleolus, S – scar, St – septa, V – vacuole, Vs – vesicles.



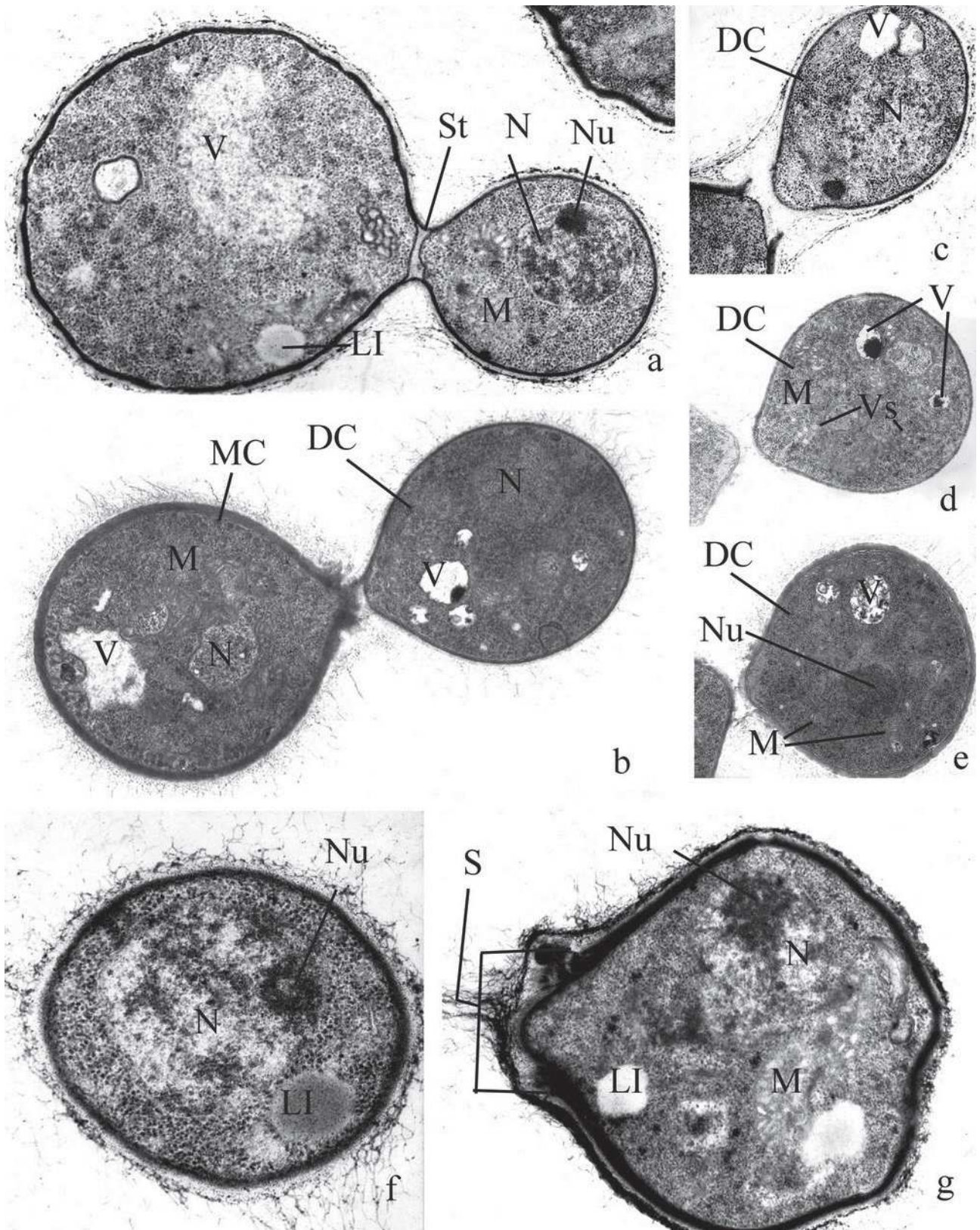


Fig. 2. Budding in in vitro growing *C. neoformans* yeast cells

vacuole localized near cell wall in basal part of cell. Thus, the transformation of daughter cell in mother was finished (Fig. 3).

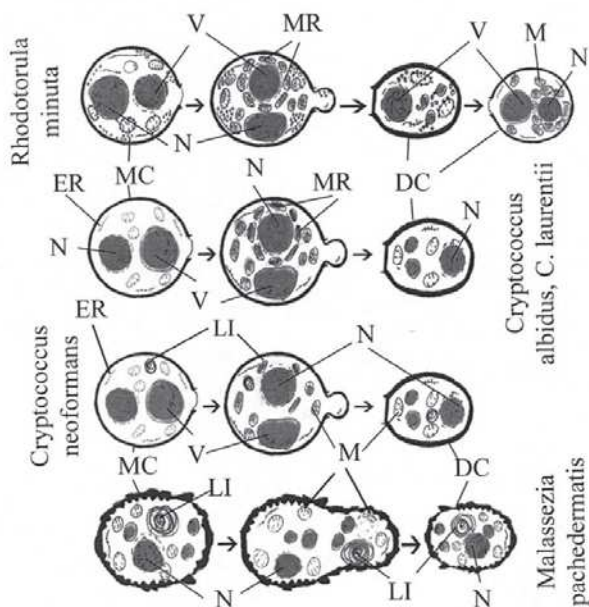


Fig. 3. Schematic drawing of patterns of in vitro growing budding yeast cells of investigated yeast species.

## CONCLUSION

Comparison of mother cell ultrastructure in cultures of three species from genus *Cryptococcus* – *C. neoformans* [data of the present work], *C. albidus* [11], *C. laurentii* [12] and *R. minuta* [14] demonstrated the common peculiarity in internal topography before (nucleus in basal part and vacuole opposite the scar) and during (migration of the nucleus from distal to lateral and opposite the scar and, contrary, transition of nuclei from apical part in distal one) budding (Fig. 3). Another topographical peculiarity (central-lateral) was typical for interphase nucleus in mother cell of *M. pachydermatis* [9]. For mother cells of all compared yeast species were typical the high level of vacuolization, moderate number of mitochondria and cistern of rough ER, abundance of free ribosomes, absence of single cisterns of Golgi and microbodies. Storage substances in budding cells of *C. albidus* [11], *C. laurentii* [12] and *R. minuta* [14] were absent. During yeast cells budding of *M. pachydermatis* [9] we revealed presence of one large storage lipid inclusion (Fig. 3), which localized

opposite scar (like vacuole in another investigated species). Several small lipid inclusions were present in budding yeast cells of *C. neoformans* [data of the present work], what may be caused by more long (72 hour) cultivation on another medium (solid Sabouraud's agar). Specific feature of yeast cells budding of *C. albidus* [11], *C. laurentii* [12] and *R. minuta* [14] were the development in mother cells and after separation in daughter cell (only in *R. minuta*) the mitochondrial reticulum (one giant mitochondrion) which presence deducible this process on energetically more high level. It was interesting that in *C. neoformans* [1, 4, 6] mitochondrial reticulum formed in tissular mature strong virulent yeast cells. In the mature yeast cells of *C. neoformans* [8] strains which isolated from natural condition giant mitochondrion absent. In this regard, it was actually to carry out to study the process of budding on the example strong virulent strain of this last species for the aim «put the point» in the question about correlation between level of the virulence on presence of mitochondrial reticulum.

In all investigated species cistern of rough endoplasmic reticulum in all stages of budding present in minor quantity, single cisterns of Golgi were absent. Moderate number of secretory vesicles we observed in budding yeast cells of all investigated species for the exclusion *R. minuta* [14]. In last species aggregations of numerous secretory vesicles present in all stages of yeast cells budding.

According our opinion, isolation in mother cell the nucleus from scar with the «using» of vacuole in *C. neoformans* [data of the present work], *C. albidus* [11], *C. laurentii* [12], *R. minuta* [14] and large lipid inclusion in *M. pachydermatis* [9] block the budding process and subsequent changes in topography between nucleus, vacuole and storage lipid (*M. pachydermatis*) was the first signal for starting of this process. For interphase nucleus of all investigated yeast species, were typical lower level of chromatization, which was typical for fungi [5, 6, 11, 12 and etc.] and correlated with lower number of chromosome. In all investigated species transition of mother cells to bud formation were accompanied by increasing of nucleus and nucleolus sizes and level of chromatization. In our opinion, nucleus activation correlated with the starting of mitosis and necessity activation of synthetic processes (synthesis of cytosol and free ribosomes) and organelles proliferation in the mother and daughter cells. For all investigated species, for exclusion *M. pachydermatis*, were typical specific activation of internal structure (proliferation of mitochondria, changes in its topography and etc.)

## REFERENCES

1. Васильева Н.В., Степанова А.А., Сеницкая И.А., Семенов В.В. Сравнительное изучение ультраструктуры штаммов *C. neoformans* разной вирулентности. Проблемы медицинской микологии. 2005; 7 (2): 99 [Vasil'eva N.V., Stepanova A.A., Sinickaya I.A., Semenov V.V. Sravnitel'noe izuchenie ul'trastrukтуры shtammov *C. neoformans* raznoj virulentnosti. Problemy medicinskoj mikologii. 2005; 7 (2): 99 (In Russ)].
2. Васильева Н.В., Степанова А.А., Сеницкая И.А. Ультраструктура капсул зрелых клеток штаммов *Cryptococcus neoformans* in vitro и in vivo. Проблемы медицинской микологии. 2006; 8 (2): 25 [Vasil'eva N.V., Stepanova A.A., Sinickaya I.A. Ul'trastruktura kapsul zrelyh kletok shtammov *Cryptococcus neoformans* in vitro i in vivo. Problemy medicinskoj mikologii. 2006; 8 (2): 25 ((in Russ)].
3. Васильева Н.В., Степанова А.А., Сеницкая И.А. Электронно-микроскопическое изучение биологии развития клеток слабо и сильно вирулентного штаммов *Cryptococcus neoformans* in vitro и in vivo. Проблемы медицинской микологии. 2007; 9 (2): 47-48 [Vasil'eva N.V., Stepanova A.A., Sinickaya I.A. Elektronno-mikroskopicheskoe izuchenie biologii razvitiya kletok slabo i sil'no virulentnogo shtammov *Cryptococcus neoformans* in vitro i in vivo. Problemy medicinskoj mikologii. 2007; 9 (2): 47-48 (In Russ)].
4. Васильева Н.В., Степанова А.А., Сеницкая И.А. Особенности морфогенеза клеток *Cryptococcus neoformans* в зависимости от вирулентности штаммов. Проблемы медицинской микологии. 2007; 9 (4): 23-30 [Vasil'eva N.V., Stepanova A.A.,



- Sinickaya I.A. Osobennosti morfogeneza kletok *Cryptococcus neoformans* v zavisimosti ot virulentnosti shtammov. Problemy medicinskoj mikologii. 2007; 9 (4): 23-30 (In Russ)].
5. Степанова А.А., Сеницкая И.А. Электронно-микроскопическое изучение стареющих клеток *Cryptococcus neoformans* *in vitro* и *in vivo*. Проблемы медицинской микологии. 2011; 13 (2): 110-111 [Stepanova A.A., Sinickaya I.A. Elektronno-mikroskopicheskoe izuchenie stareyushchih kletok *Cryptococcus neoformans* *in vitro* i *in vivo*. Problemy medicinskoj mikologii. 2011; 13 (2): 110-111 (In Russ)].
  6. Васильева Н.В., Степанова А.А. Электронно-микроскопическое изучение клеточной стенки и капсулы зрелых клеток слабо и сильно вирулентных штаммов *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* в ходе *in vitro*→*in vivo* трансформации. Проблемы медицинской микологии. 2018; 20 (1):1 8-24 [Vasileva N.V., Stepanova A.A. Elektronno-mikroskopicheskoe izuchenie kletочноj stenki i kapsuly zrelyh kletok slabo i sil'no virulentnyh shtammov *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* v hode *in vitro*→*in vivo* transformacii. Problemy medicinskoj mikologii. 2018; 20 (1):1 8-24 (In Russ)].
  7. Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Yamaguchi M., et al. Electron microscopy of autopsy material from the human brain cryptococcosis and AIDS. Problems in medical mycology. 2015; 17 (1): 35-40.
  8. Степанова А.А., Босак И.А., Сеницкая И.А. Ультраструктура клеток природных штаммов *Cryptococcus neoformans*. Проблемы медицинской микологии. 2010; 12 (4): 35-41 [Stepanova A.A., Bosak I.A., Sinickaya I.A. Ul'trastruktura kletok prirodnyh shtammov *Cryptococcus neoformans*. Problemy medicinskoj mikologii. 2010; 12 (4): 35-41 (In Russ)].
  9. Stepanova A., Vasilyeva N.V., Yamaguchi M. Cellular pattern of morphogenesis, ultrastructure of senescent and desiccated *in vitro* growing yeast cells of *Cryptococcus neoformans*. Problems in medical mycology. 2016; 18 (4): 47-51.
  10. Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Yamaguchi M., et al. Ultrastructural patterns of interactions between the murine lung macrophages and *Cryptococcus neoformans* yeast cells with different virulence. J. Med. Mycol. 2018; 59 (1): E1-E6.
  11. Yamaguchi M., Shimizu K., Kawamoto S., et al. Dynamics of cell components during budding of *Cryptococcus albidus* yeast cells. Problems in medical mycology. 2014; 16 (1): 29-35.
  12. Stepanova A.A., Yamaguchi M., Chibana H., Vasilyeva N.V. Ultrastructural aspects of cell components migration during the budding of yeast *Cryptococcus laurentii*. Problems in medical mycology. 2016; 18 (3): 24-29.
  13. Yamaguchi M., Shimizu K., Kawamoto S., et al. Ultrastructural observation of cellular components during budding in yeast *Malassezia pachydermatis*. Problems in medical mycology. 2014; 16 (4): 13-18.
  14. Stepanova A.A., Yamaguchi M., Chibana H., Vasilyeva N.V. Electron-microscopic investigation of cell components kinetics during budding in the yeast *Rhodotorula minuta*. Problems in medical mycology. 2017; 19 (3): 51-56.
  15. Васильева Н.В. Факторы патогенности *Cryptococcus neoformans* и их роль в патогенезе криптококкоза. Автореф. дисс. д.б.н. СПб., 2005: 41 с. [Vasileva N.V. Faktory patogennosti *Cryptococcus neoformans* i ih rol' v patogeneze kritikokkoza. Avtoref. diss. d.b.n. SPb., 2005: 41 с. (In Russ)].
  16. Kozubowski L., Yadav V., Chatterjee G., et al. Ordered kinetochore assembly in the human-pathogenic basidiomycetous yeast *Cryptococcus neoformans*. mBio. 2013; 4 (5).

Поступила в редакцию журнала 25.05.2017

Рецензент: Л.В. Филиппова





## АНАЛИЗ ВИРУЛЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ *CANDIDA ALBICANS*, ВЫДЕЛЕННЫХ СО СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЯЗЫКА У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ КАНДИДОЗНЫМ ГЛОССИТОМ

<sup>1,2</sup>Лисовская С.А. (в.н.с.)\*, <sup>1</sup>Халдеева Е.В. (зав. лаб.), <sup>3</sup>Измайлова Г.Р. (врач-стоматолог), <sup>4</sup>Мухамеджанова Л.Р. (профессор кафедры)

<sup>1</sup> Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, Казань; <sup>2</sup> Казанский государственный медицинский университет, Казань; <sup>3</sup> Стоматологическая клиника ООО «ВИЛЬДАН», Казань; <sup>4</sup> Чувашский государственный университет им. И.Н.Ульянова, Чебоксары, Россия

©Коллектив авторов, 2018

Изучен микробный пейзаж поверхности языка. У пациентов с диагнозом «хронический кандидозный глоссит», помимо бактериальной микрофлоры, основное место занимали грибы *Candida albicans*. Причем у лиц с наиболее выраженной естественной складчатостью языка высевались *S. parapsilosis* и *C. tropicalis* совместно с *C. albicans*. Проведен анализ вирулентной активности клинических штаммов *C. albicans*, который осуществляли на 48 часовых культурах грибов, выращенных на среде Сабуро при температуре 30 °С. В исследуемой группе показатели адгезивной активности составили в среднем 26%, тогда как в группе сравнения – 15%. Для определения способности штаммов образовывать биопленки изучали степень связывания кристаллического фиолетового последними в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах. Способность образовывать биопленки была обнаружена у 100% клинических штаммов.

**Ключевые слова:** *Candida albicans*, биопленки, адгезия бласто-спор, патогенность, кандидоз

## ANALYSIS OF VIRULENT ACTIVITY OF *CANDIDA ALBICANS* STRAINS ISOLATED FROM THE MUCOUS MEMBRANE OF THE TONGUE IN PATIENTS WITH CHRONIC CANDIDAL GLOSSITIS

<sup>1,2</sup>Lisovskaya S.A. (leading scientific collaborator), <sup>1</sup>Khaldeeva E.V. (head of the laboratory), <sup>3</sup>Izmailova G.R. (dentist), <sup>4</sup>Mukhamedzhanova L.R. (professor of the department)

<sup>1</sup>Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan; <sup>2</sup>Kazan State Medical University, Kazan; <sup>3</sup>Dental Clinic LLC "VILDAN", Kazan; <sup>4</sup>Chuvash State University, Cheboksary, Russia

©Collective of authors, 2018

The microbial landscape of the surface of the tongue has been studied. In patients with the diagnose of chronic candidal glossitis, in addition to

\* Контактное лицо: Лисовская Светлана Анатольевна  
e-mail: S\_Lisovskaya@mail.ru

bacterial microbiota, the main place was occupied by *C. albicans* fungi. In patients with the most pronounced natural folding of the tongue, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, together with *C. albicans*, were isolated. The virulent activity of *C. albicans* strains was studied, which was carried out on 48 hour cultures of fungi grown on a Sabouraud medium at a temperature of 30° C. In the study group, the indices of adhesive activity averaged 26%, while in the comparison group – 15%. To determine the ability of strains to form biofilms, the degree of yeasts binding of crystalline violet in sterile 96-well polystyrene plates was studied. The ability to form biofilms was found in 100% of clinical strains.

**Key words:** *Candida albicans*, blastospores adhesion, adhesive properties of strains, pathogenicity, candidiasis

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы клиницисты отмечают тенденцию к увеличению распространенности заболеваний полости рта, в частности кандидозного глоссита. Последний отличается длительным течением с периодическими обострениями, что может привести к хроническому процессу [1]. Наиболее частыми причинами развития кандидозного глоссита являются использование ортопедических конструкций и соматические заболевания, создающие благоприятный фон для его развития (болезни кроветворных органов, эндокринные дисфункции и т.д.). Грибы рода *Candida* могут вызывать характерные изменения на слизистой оболочке поверхности языка. Часто при хроническом кандидозном глоссите на языке появляются изменения рельефа, а в гистопатологических срезах обнаруживают инфильтрацию слизистой оболочки псевдомицелием гриба. У некоторых пациентов значительно удлиняются и кератинизируются сосочки языка, углубляя тем самым межсосочковые пространства. Считают, что изменения в ротовой полости могут быть предикторами развивающегося системного кандидоза (с поражением пищевода, кишечника, бронхов, легких). Зачастую пациенты испытывают значительные трудности при гигиеническом уходе за ротовой полостью, что способствует усиленному накоплению зубного налета и, следовательно, повышению степени бактериальной и грибковой обсемененности биотопов рта [2].

Наиболее значимым агентом кандидозного глоссита являются грибы *Candida albicans*. Однако в последнее время многие клиницисты отмечают рост кандидоза, обусловленного и другими видами грибов этого рода [3]. Огромную роль в патогенезе кандидоза играют факторы патогенности самого гриба. Например, адгезия является одним из основных факторов, определяющих поведение микроорганизмов в биоценозах, и она же устанавливает способность их перехода к паразитическому образу существования. Известно, что колонизация организма *Candida* spp., в отличие от кандиданосительства, обусловлена адгезией клеток гриба к эпителию. Способность гриба образовывать псевдомицелий – фактор инвазии клеток в ткани макроорганизма. Кроме того, *C. albicans* являются главными грибковыми агентами, способными образовывать биопленки. Грибковые биопленки не только более резистентны к антимикробным агентам, чем отдельные планктонные клетки, но и способны противостоять иммунным защитным механизмам хозяина [4, 5].

Цель настоящего исследования – оценка частоты встречаемости и степени патогенности штаммов *C. albicans* как основного участника микробного пейзажа слизистой оболочки дорсальной поверхности языка пациентов с хроническим кандидозным глосситом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 32 пациента (24 женщины и 8 мужчин) в возрасте 38-62 лет (исследуемая группа), обратившиеся с целью получения специализированной стоматологической помощи по поводу заболеваний языка. У всех больных был выявлен хронический кандидозный глоссит (у 10 – атрофическая форма, у 22 – гиперпластическая форма). Диагноз верифицирован на основании данных клинического осмотра с использованием световой оптики (биноклярная лупа), люминескопического исследования (система Oral ID), бактериологического и микологического исследований. Забор материала осуществляли в условиях амбулаторного стоматологического кабинета (на диагностическом этапе до назначения лечения) стерильными ватными тампонами с дорсальной поверхности языка при достаточном раскрытии естественных складок рельефа и межсосочковых пространств. Тампон помещали в транспортную среду и в течение 2 часов доставляли в микологическую лабораторию Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии. Идентификацию грибов и бактерий проводили микроскопическими и биохимическими методами. В работе применяли селективные хромогенные среды «CandiSelect 4» (Bio-Rad) и основанные на исследовании ауксаногаммы коммерческие тест-системы «Auxacolor 2» (Bio-Rad).

Использовали клинические штаммы *C. albicans* и непатогенный музейный штамм №4 из коллекции музея ЦКВИ (г. Москва) как возможный отрицательный контроль. Изучали 48-часовые культуры *C. albicans*, выращенные на среде Сабуро при температуре 30 °C [6].

Группа сравнения (сопоставимого гендерно-возрастного состава) была представлена 30 пациентами, неотягощёнными заболеваниями языка, обратившимися с целью плановой санации ротовой полости.

Определение адгезивных свойств выделенных штаммов *C. albicans* проводили на ранее разработанной авторами модели адгезии клеток гриба на нитроцеллюлозную пленку с иммобилизованным гемоглобином [7]. Установление уровня адгезии осуществляли по разнице начальной и конечной оптической плотности суспензии клеток, а также прямым подсчетом клеток в суспензии с помощью микроскопа Биолам Р-11 при увеличении 10x20, подсчитывали не менее 10 полей зрения.

Способность гриба к образованию псевдомицелия выявляли с помощью теста на образование герминативных (проростковых, или зародышевых) трубок. Колонию гриба вносили в пробирку с 0,5-1 мл средой №199 и инкубировали при 37 °C в течение 0,5-3 часов. После инкубации каплю содержимого пробирки помещали на предметное стекло и исследовали под световым микроскопом при увеличении 10x40. При микроскопировании отмечали образование дрожжевыми клетками филаментов (зародышевых трубок) – предшественников истинных гиф.

Формирование биопленок грибов *C. albicans* выполняли по методу Ramage et al. (2001). Культуру грибов засекали в жидкую среду Сабуро и инкубировали в орбитальном шейкере (180 об/мин.) при 30 °C в течение 24 часов. Затем культуру промывали два раза стерильным фосфатным буфером и ресуспендиро-

вали в жидкой среде Сабуро с конечной плотностью  $1,0 \cdot 10^6$  клеток/мл. Суспензию клеток в количестве 100 мкл вносили в 96-луночные плоскодонные полистироловые микропанели и инкубировали в течение 48 часов при 37 °C. Степень или количество формирования биопленок оценивали колориметрическим способом. Оптическую плотность регистрировали на ридере с вертикальным лучом света с использованием светофильтра 620 нм [5].

Статистическую обработку проводили с помощью программного обеспечения Prisma для биомедицинских исследований.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выявили, что у пациентов группы сравнения основными представителями микробного пейзажа дорсальной поверхности языка были бактерии *Streptococcus* spp. и *Staphylococcus epidermidis*. Однако в 33% случаев в микробиологических посевах обнаруживали грибы *C. albicans* в количестве  $<10^3$  КОЕ/мл. У больных с диагнозом «хронический кандидозный глоссит», помимо бактериальной микробиоты, основное место занимали представители грибов рода *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* (Рис. 1). Однако *C. albicans* занимали лидирующее место среди других видов по встречаемости у пациентов с диагнозом «хронический кандидозный глоссит» (87% – в моно- и миксткультуре совместно с другими видами *Candida* spp.). Отметим, что у больных с наиболее выраженной естественной складчатостью языка высевались *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*, в восьми случаях – совместно с *C. albicans*, тогда как у лиц с относительно ровным рельефом дорсальной поверхности выявляли только *C. albicans*.

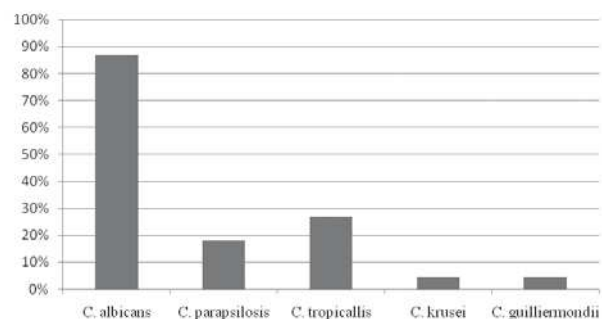


Рис. 1. Частота встречаемости *Candida* spp. в микробиологических посевах от группы больных с хроническим кандидозным глосситом.

Мы не наблюдали каких-либо особенностей люминескопической картины в зависимости от различий в микробном пейзаже: во всех случаях отмечали очаги гашения люминесценции в виде темных пятен серо-болотного цвета, у пациентов с выраженной складчатостью – «глубокие» тени по периферии складок, что указывает на вовлечение в воспалительный процесс перипликальных тканей.

Поскольку *C. albicans* были основными представителями микотической инфекции и обнаруживались при различной клинической картине грибкового поражения, нами были проведены исследования патогенного потенциала данных штаммов. Результаты изучения клинических штаммов *C. albicans* показали отличия в степени патогенности среди клинических штаммов двух групп.

Так, в исследуемой группе показатели адгезивной активности составили в среднем 26%, тогда как в группе сравнения – 15%. Максимальный уровень адгезии изолятов *C. albicans*, выделенных от больных, достигал 36%, тогда как штаммы, изолированные от пациентов в отсутствии клинических проявлений, имели уровень адгезии от 12,6% до 18% (табл. 1). Таким образом, уровень адгезивной активности штаммов, выявленных от лиц с диагнозом «кандидозный глоссит», в 1,5-2 раза превышал уровень адгезии штаммов, выделенных у пациентов группы сравнения.

Таблица 1

**Адгезивная активность штаммов *C. albicans* исследуемой группы, выделенных от больных с клинически доказанным хроническим кандидозным глосситом, и группы сравнения.**

Группа штаммов	Количество штаммов	Адгезивная активность штаммов <i>C. albicans</i> , (%)
Исследуемая	32	26±5,3 (18-36)
Сравнения	30	15±1,5 (12,6-18)
Контроль	1*	3,1±0,01 (3,0-3,14)

Примечание: \* – контроль (отрицательный), непатогенный музейный штамм №4 из коллекции музея ЦКВИ (г. Москва), в 10 повторах, различия в средних значениях между группами и контролем достоверны,  $p < 0,05$

Изучение способности формирования ростковых трубок и псевдомицелия клетками гриба показало, что все штаммы *C. albicans* способны образовывать филаменты. Однако три штамма, выделенные от больных с гиперпластической формой кандидозного глоссита, более активно формировали ростковые трубки уже в течение первого часа постановки пробы, тогда как штаммы, изолированные от пациентов группы сравнения, – лишь через 2-2,5 часа. Максимальное количество ростковых трубок в 10 полях зрения при увеличении 10х40 под микроскопом, после часа инкубации, у штаммов, выявленных от пациентов, составило 67% от общего количества клеток, тогда как у штаммов, выделенных от лиц группы сравнения, – менее 9%.

Согласно литературным источникам, процесс адгезии клеток на субстрат не всегда приводит к образованию биопленки, хотя и является начальной стадией в цикле ее формирования, а переход клеток грибов от планктонного существования к биопленочному, предположительно, инициируется сигналами, поступающими из окружающей среды, и здесь, возможно, играет важную роль длительная иммуносупрессия, соматическая патология, нерациональное применение антимикробных и гормональных препаратов, различные виды имплантов и протезов [6].

В связи с этим следующей задачей была оценка степени формирования биопленок данными штаммами.

Во время исследования установлено, что все штаммы *C. albicans*, включая штаммы группы сравнения, формируют биопленку. Однако замечено, что для штаммов, выделенных от пациентов с хроническим кандидозным глосситом, характерно повышенное пленкообразование, по сравнению со штаммами, изолиро-

ванными от лиц группы сравнения (средние значения пленкообразования составили 0,164 и 0,087 оптических единиц соответственно) (табл. 2).

Таблица 2

**Пленкообразование клиническими штаммами *C. albicans*, выделенными от пациентов двух групп**

Локализация штамма	Штаммы <i>C. albicans</i> , выделенные от больных с клинически доказанным хроническим кандидозным глосситом		Штаммы <i>C. albicans</i> , выделенные от пациентов, неотягощённых заболеваниями языка, обратившимися с целью плановой санации ротовой полости	
	N	Количество сформированной биопленки	N	Количество сформированной биопленки
Слизистая оболочка поверхности языка	32	0,164 + 1,2 (0,368-0,154)	30	0,087 + 0,002 (0,064-0,098)

Примечание: Даны значения  $D_{620}$  (за вычетом фона) поглощения красителя в лунках микропанили.

Максимальные значения для исследуемой группы составили 0,368 оптических единиц, а для группы сравнения – 0,098. В то же время в изучаемой группе выявили штаммы, количественные значения пленкообразования которых не превышали 0,154 оптических единиц.

## ВЫВОДЫ

Анализ вирулентной активности штаммов, выделенных из двух групп, показал, что наличие выраженных адгезивных свойств, активное формирование псевдомицелия и повышенное пленкообразование были характерны для штаммов, изолированных от больных с диагнозом «хронический кандидозный глоссит». Причем высокие значения адгезивных свойств и гифообразования указывают, вероятно, на развитие острого патологического процесса. В то же время высокая степень пленкообразования была характерна для штаммов, выявленных от группы больных с хронической формой поверхностного кандидоза.

Кроме того, микробный пейзаж дорсальной поверхности языка у пациентов с хроническими формами кандидоза отличался разнообразием за счет представителей микробиоты, причем наиболее выраженным – при складчатости рельефа. Диагноз, поставленный только на основании клинических признаков, следует подтверждать результатами микроскопических и культуральных исследований. Особый интерес также представляет дальнейшее изучение механизмов формирования биопленки, локализованной в межсосочковых пространствах и складках языка как особой экологической ниши кандидозной биоты.

Полученные сведения могут быть использованы при составлении алгоритмов назначения препаратов антимикотического действия, дифференцированных в зависимости рельефа дорсальной поверхности языка.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шумский А.В., Железняк В.А. Кандидоз полости рта. Монография. Самара, 2008: 4-8 [Shumskij A.V., Zpeleznyak V.A. Kandidoz polosti rta. Monografiya. Samara, 2008: 4-8 (In Russ)].
2. Казеко Л.А., Александрова Л.Л., Довнар А.Г. Грибковые инфекции ротовой полости (обзор лекций). Медицинский журнал. 2014; 2: 15-22 [Kazeko L.A., Aleksandrova L.L., Dovnar A.G. Gribkovye infekcii rotovoj polosti (obzor lekciy). Medicinskij zhurnal. 2014; 2: 15-22 (In Russ)].
3. Клишко Н.Н., Козлова Я.И., Хостелиди С.Н. и др. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели LIFE program. Проблемы медицинской микологии. 2014; 16 (1): 3-8 [Klimko N.N., Kozlova YA.I., Hostelidi S.N. i dr. Rasprostronennost' tyazhelyh i hroniceskikh mikoticheskikh zabolevanij v Rossijskoj



- Federacii po modeli LIFE program. Problemy medicinskoj mikologii. 2014; 16 (1): 3-8 (In Russ)].
4. Lisovskaya S., Khaldeeva E., Salmakova A., Kulikov S. Evaluation of the Influence of Antifungal Drugs on Growth of Candida albicans in the Biofilm. BioNanoScience. 2016; 6 (4): 588-590.
  5. Межевикина Г.С., Дармограй В.Н., Морозова С.И., Савельева Н.А. Современные аспекты этиологии и патогенеза кандидоза слизистой оболочки полости рта. Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2012; 3: 152-157 [Mezhevikina G.S., Darmograj. V.N., Morozova S.I., Savel'eva N.A. Sovremennye aspekty ehtiologii i patogeneza kandidoza slizistoj obolochki polosti rta. Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova. 2012; 3: 152-157 (In Russ)].
  6. Аравийский Р.А., Клишко Н.Н., Васильева Н.В. Диагностика микозов. СПб.: Издательский дом СПбМАПО, 2004: 186 с. [Aravijskij R.A., Klimko N.N., Vasil'eva N.V. Diagnostika mikozev. SPb.: Izdatel'skij dom SPb-MAPO, 2004: 186 s. (In Russ)].
  7. Лисовская С.А., Глушко Н.И., Халдеева Е.В. Лабораторная модель для определения адгезивных свойств дрожжеподобных грибов. Проблемы медицинской микологии. 2006; 8 (3): 36-39 [Lisovskaya S.A., Glushko N.I., Haldeeva E.V. Laboratornaya model' dlya opredeleniya adgezivnyh svojstv drozhzhopodobnyh gribov. Problemy medicinskoj mikologii. 2006; 8 (3): 36-39 (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 13.08.2018

Рецензент: Т.С. Богомолова



## УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТОК ШТАММОВ *CANDIDA ALBICANS* И *CANDIDA PARAPSILOSIS*, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И УСТОЙЧИВЫХ К АЗОЛАМ

Степанова А.А. (зав. лаб.)\*, Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой), Выборнова И.В. (н.с.), Босак И.А. (с.н.с.), Чилина Г.А. (зав. лаб.)

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

©Коллектив авторов, 2018

В статье приведены данные по микроморфологии и ультраструктуре выращенных *in vitro* клеток *Candida albicans* (РКПГУ-1624, РКПГУ-1314, РКПГУ-1274) и *Candida parapsilosis* (РКПГУ-1579, РКПГУ-1525), различающиеся по чувствительности к антимикотикам (флуконазол и вориконазол). Выявлены различия в строении клеточных стенок дрожжевых клеток чувствительных и устойчивых штаммов изученных видов к антимикотикам. Для дрожжевых клеток резистентных штаммов *C. albicans* (РКПГУ-1274, РКПГУ-1624) было характерно присутствие толстых клеточных стенок, тогда как для дрожжевых клеток резистентного штамма *C. parapsilosis* (РКПГУ-1525) – наличие тонких меланифицированных клеточных стенок. Для клеток псевдомицелия изученных штаммов двух видов описанные особенности не были характерны, они имели тонкие клеточные стенки и однотипное строение.

**Ключевые слова:** *in vitro*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, культура, микроморфология, резистентность, ультраструктура, чувствительность

## ULTRASTRUCTURE OF CELLS OF *CANDIDA ALBICANS* AND *CANDIDA PARAPSILOSIS* STRAINS RESISTANT AND SUSCEPTIBLE TO ASOLES

Stepanova A.A. (head of the laboratory), Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the department), Vybornova I.V. (scientific collaborator), Bosak I.A. (senior scientific collaborator), Chilina G.A. (head of the laboratory)

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

©Collective of authors, 2018

The data regarding the micromorphology and ultrastructure growing *in vitro* cells of *Candida albicans* (РКПГУ-1314, РКПГУ-1274, РКПГУ-1624) and *Candida parapsilosis* (РКПГУ-1579, РКПГУ-1525) differing in sensitivity to antifungals (fluconazole and voriconazole) were presented in the article. Differences in the structure of cell walls of sensitive and resistant strains yeast cells of studied species to antimicrobials were revealed. For yeast cells of resistant strains (РКПГУ-1274, РКПГУ-1624) of *C. albicans* more thick walls were typical and for susceptible *C. parapsilosis* strain (РКПГУ-1525) more thin but melanized cells walls. For the cells of pseudomycelium of the studied strains of two species the described features were not typical, they had thin cells walls with the same structure.

**Key words:** *in vitro*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, culture, micromorphology, resistance, sensibility, ultrastructure

\* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна, e-mail: amaliya.stepanova@szgmu.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение вопросов резистентности грибов рода *Candida* к противогрибковым препаратам – одна из актуальных задач современной медицины [1]. Знание механизмов резистентности *Candida* spp. необходимо для оптимизации тактики лечения больных с диагнозом «кандидоз» и разработки новых противогрибковых препаратов.

Цель исследования – анализ строения клеток, выращенных *in vitro* чувствительных и резистентных штаммов *C. albicans* и *C. parapsilosis* современными методами световой и трансмиссионной микроскопии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Культуры трех штаммов *C. albicans* (С.Р. Robin) Berkhout (РКПГУ-1314, РКПГУ-1274 и РКПГУ-1624) и двух штаммов *C. parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice выращивали 8 суток на среде Сабуро в термостате при 37 °С.

РКПГУ-1314 был выделен со слизистой оболочки пищевода, РКПГУ-1274 – со слизистой оболочки ротовой полости пациента (И., 59 лет) с хроническим кандидозом. Первый штамм был чувствителен к флуконазолу и вориконазолу, тогда как второй – резистентным по отношению к данным препаратам. Также дополнительно в работу был привлечен резистентный к флуконазолу и вориконазолу штамм (РКПГУ-1624) *C. albicans*, полученный от пациентки (Г., 40 лет) с хроническим кандидозным вульвовагинитом.

Чувствительный к антимикотикам штамм (РКПГУ-1579) *C. parapsilosis* был выделен из крови взрослого пациента (В., 30 лет), тогда как резистентный штамм этого вида (РКПГУ-1525) – с отделяемого кожи недоношенного младенца (А.).

Идентификацию культур проводили с использованием методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и ДНК-секвенирования.

Кусочки агаризованной среды из периферической, средней и центральной частей колонии гриба фиксировали глутаральдегидом-параформальдегидом-осмием по методике, описанной нами ранее [2]. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-V (Швеция) с помощью стеклянных ножей, окрашивали раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе просвечивающего типа JEM 100 CX-2 (Япония).

Колонии грибов фотографировали с помощью стереоскопического микроскопа SreREO Lumar.V12. Полутонкие эпоксидные срезы толщиной 3 мк получали с эпоксидных блоков на пирамитоме 11800 (LKB) с использованием стеклянных ножей. Полутонкие срезы анализировали и фотографировали в микроскопе AxioImager.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с оптикой Номарского.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через 8 суток роста на среде Сабуро колония штамма РКПГУ-1314 *C. albicans* достигала в диаметре 2,8 см. Форма колонии округлая, с четко очерченным периферическим ободком и волнистым краем (Рис. 1 а). На поверхности колонии, примыкающей к периферическому ободку, наблюдали кратерообразные сферические образования варьирующего диаметра. Колония кремовая, мягкой консистенции, с умеренным числом

гиф псевдомицелия (Рис. 1 б), перемежающихся с таким же количеством дрожжевых клеток (Рис. 1 б, в). Последние одиночные или в многочисленных группах, круглоовальные (3,0-5,0 x 4,0-8,0 мкм, Рис. 1 в).

Диаметр колонии штамма РКПГУ-1274 *C. albicans* через 8 суток роста на среде Сабуро составлял 3,3 см. Колония округлой формы, гладкая, с четко очерченным периферическим ободком и волнистым краем (Рис. 1 г), кремовая, мягкой консистенции. В составе колонии выявили умеренное число гиф псевдомицелия (Рис. 1 д), перемежающихся с массивными неправильной формы скоплениями дрожжевых клеток (Рис. 1 д), которые имели круглоовальную (3,0-6,0 x 4,0-8,9 мкм, Рис. 1 е) форму.

Колония *C. albicans* штамма РКПГУ-1624 через 8 суток роста на среде Сабуро имела диаметр 3,0 см, округлую форму, гладкий центр и периферический ободок (Рис. 1 ж); большая часть контура ровная, а меньшая – в виде гладких и с веерообразной поверхностью раковинообразных выростов. Колония кремового цвета и мягкой консистенции, в ее полутонких эпоксидных срезах отмечали небольшое количество гиф псевдомицелия (Рис. 1 з), перемежающихся с дрожжевыми клетками, формирующими крупные группы неправильной формы (Рис. 1 з). Дрожжевые клетки одиночные, круглоовальные (3,0-6,0 x 3,5-8,7 мкм, Рис. 1 и).

Через 8 суток роста на среде Сабуро колония штамма РКПГУ-1579 *C. parapsilosis* достигала в размере 2,5 x 4,2 см, эллипсоидальной формы, снабжена периферическим ободком и волнистым краем (Рис. 1 к), центральная часть – гладкая. Колония кремового цвета и мягкой консистенции; обнаружили равное количество гиф псевдомицелия (Рис. 1 л), перемежающихся с таким же количеством дрожжевых клеток (Рис. 1 л). Псевдомицелий хорошо развит, ветвистый, Конидии одиночные или в многочисленных группах, круглоовальные (2,0-5,0 x 4,0-7,0 мкм, Рис. 1 м), равномерно покрывали псевдогифы.

Колония штамма РКПГУ-1525 *C. parapsilosis* через 8 суток роста на среде Сабуро имела несколько вытянутую форму (3,0 x 3,8 см), гладкая, с четким периферическим ободком и волнистым краем (Рис. 1 о), кремовая, мягкой консистенции. Наблюдали большое количество гиф псевдомицелия (Рис. 1 и), перемежающиеся с таким же количеством дрожжевых клеток (Рис. 1 п, р). Гифы псевдомицелия сильно ветвящиеся. Дрожжевые клетки одиночные или в многочисленных группах, круглоовальные (3,0-5,2 x 3,5-8,0 мкм, Рис. 1 р), часто располагаются на ветвящихся гифах псевдомицелия.

Вышеприведенные данные показывают отсутствие существенных различий по скорости роста и размерам дрожжевых клеток изученных чувствительных и резистентных штаммов *C. albicans* и *C. parapsilosis*. Обращает на себя внимание тот факт, что в культурах резистентных штаммов *C. albicans* (Рис. 1 д, ж), в отличие от чувствительного (Рис. 1 б), дрожжевые клетки доминировали. Они формировали массивные скопления неправильных очертаний (Рис. 1 д, з, стрелки). Для псевдомицелия *C. parapsilosis* был характерен тип роста *Mycosandida* [3].

При исследовании клеточных стенок штаммов разных видов (табл.) выявили, что наиболее толстые клеточные стенки были характерны для дрожжевых кле-

ток резистентных штаммов *C. albicans* (РКПГУ-1274, РКПГУ-1624).

Таблица

**Средние значения толщины слоев клеточных стенок (мкм) зрелых дрожжевых клеток и клеток псевдомицелия штаммов *C. albicans* и *C. parapsilosis*, мкм**

Номер штамма и отношение к атимикотикам	Толщина слоев клеточной стенки дрожжевых клеток	Суммарная толщина клеточной стенки дрожжевых клеток	Толщина слоев клеточной стенки клеток псевдомицелия	Суммарная толщина клеточной стенки дрожжевых клеток
<i>C. albicans</i>				
РКПГУ-1314 чувствительный	0,05*	0,10	0,04 0,04	0,08
РКПГУ-1274 резистентный	0,05 0,45	0,50	0,05 0,20	0,25
РКПГУ-1624 резистентный	0,02 0,53	0,55	0,05 0,10	0,15
<i>C. parapsilosis</i>				
РКПГУ-1579 чувствительный	0,02 0,19	0,21	0,03 0,03	0,10
РКПГУ-1525 резистентный	0,04 0,21	0,25	0,04 0,04	0,08

\*Примечание: в знаменателе – толщина первого (внутреннего) слоя, в числителе – толщина второго (наружного) слоя.

В то же время для дрожжевых клеток этого вида наиболее тонкие клеточные стенки были присущи для чувствительного штамма (РКПГУ-1314). Клетки псевдомицелия у изученных штаммов *C. albicans* имели более тонкие клеточные стенки по сравнению с дрожжевыми клетками. Однако они были в 2-5 раз толще таковых клеток псевдомицелия *C. parapsilosis*. Стенки дрожжевых клеток и гиф псевдомицелия чувствительного штамма *C. albicans* (РКПГУ-1314) состояли из двух слоев. Сходное двуслойное строение было характерно и для клеточных стенок дрожжевых клеток и гиф псевдомицелия других штаммов *C. albicans* [4-9].

У чувствительного штамма нижний слой в составе стенки был светлый, с хаотично ориентированными микрофибриллами, тогда как верхний – электронно-плотный, с вертикально расположенными темными и высококонтрастными микрофибриллами (Рис. 2 а, б, слой 2). Очевидно, что темный цвет второго слоя обусловлен присутствием меланина, что было показано другими авторами [6]. Дрожжевые клетки резистентных штаммов *C. albicans* имели клеточные стенки различного строения. У штамма РКПГУ-1274 первый слой состоял из перемежающихся слоев микрофибрилл разной плотности (Рис. 2 в, слой 1), у другого резистентного штамма (РКПГУ-1624) он был умеренной электронной плотности, гомогенным по плотности расположения микрофибрилл (Рис. 2 д, слой 1). Второй слой в стенках обоих штаммов был темным, с хаотично расположенными микрофибриллами (Рис. 2 в, д, слой 2). Клеточные стенки гиф псевдомицелия у резистентных штаммов *C. albicans* состояли из двух слоев (Рис. 2 г, е): нижнего толстого светлого и верхнего темного с хаотично расположенными микрофибриллами.

Дрожжевые клетки чувствительного (РКПГУ-1579) и резистентного (РКПГУ-1525) штаммов *C. parapsilosis* практически не различались между собой по толщине клеточной стенки (табл.). Толщина их клеточных стенок была в два раза меньше, чем у дрожжевых клеток резистентных штаммов *C. albicans* и в два раза больше таковых чувствительного штамма последнего вида. Морфологической особенностью строения клеточной стенки дрожжевых клеток резистентного штамма *C. parapsilosis* был тот факт, что первый нижний слой



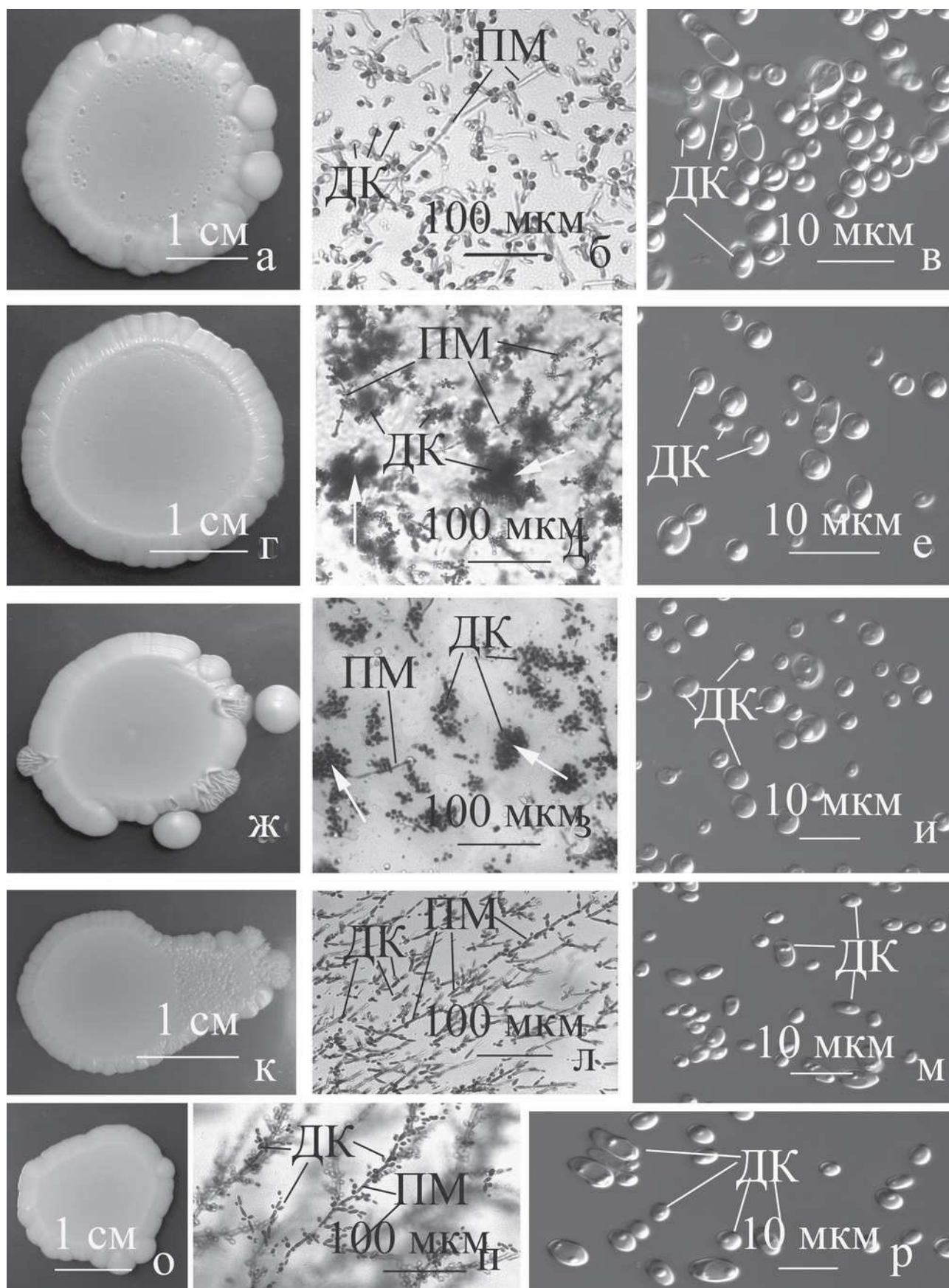


Рис. 1. Особенности микроморфологии колоний (а, г, ж, к, о) и строения клеток культур в световом микроскопе на полутонких эпиксидных срезах (б, д, з, л, п) и с использованием оптики Номарского (в, е, и, м, р). *S. albicans*: а-в – РКПГУ-1314, г-е – РКПГУ-1274, ж-и – РКПГУ-1624, *S. parapsilosis*: к-м – РКПГУ-1579, РКПГУ-1525. Условные обозначения: ДК – дрожжевые клетки, ПМ – псевдомицелий.

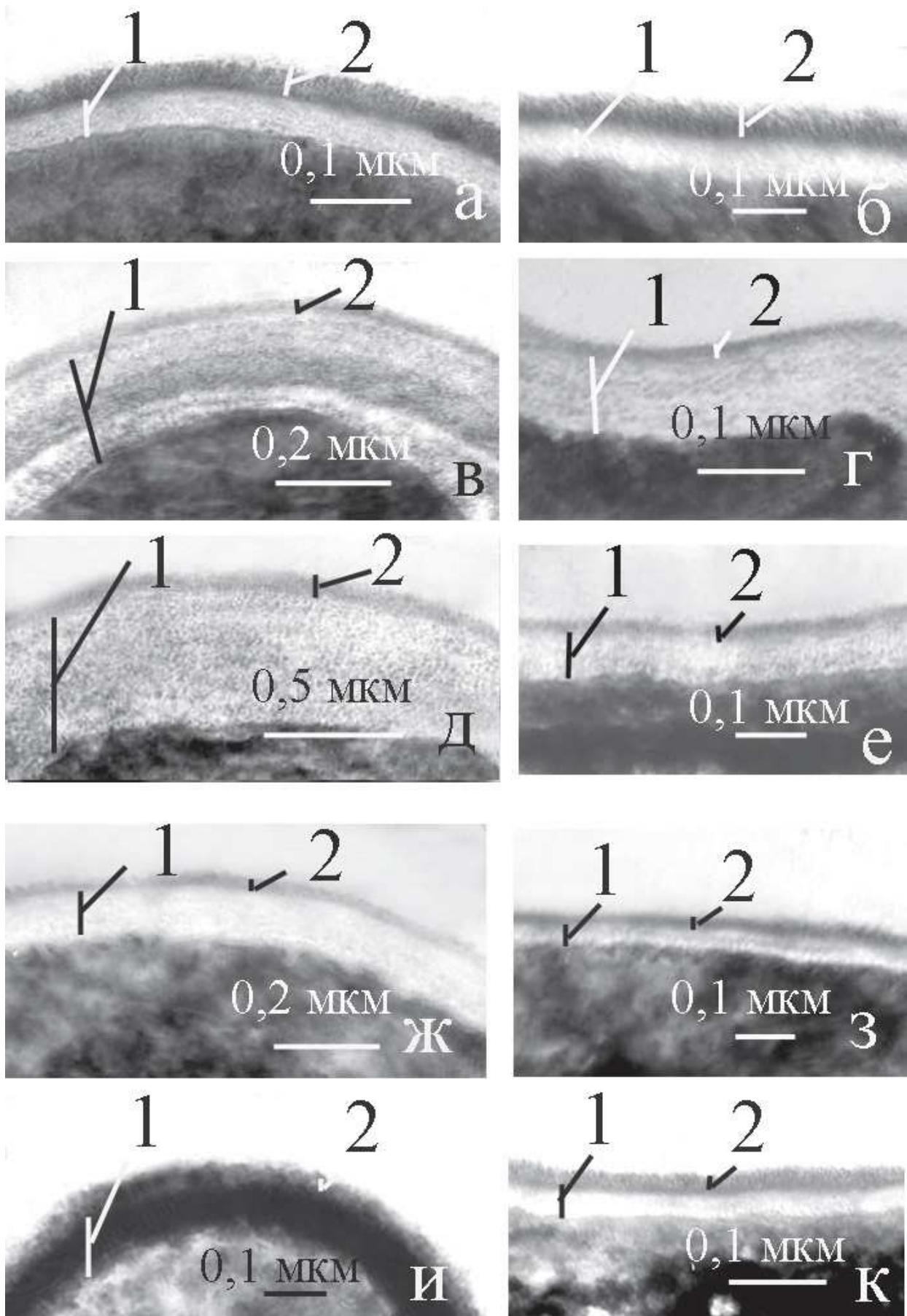


Рис. 2. Ультраструктура клеточных стенок дрожжевых клеток и гиф псевдомицелия *S. albicans* и *S. parapsilosis*. а, б – *S. albicans* (РКПГУ-1314), в, г – *S. albicans* (РКПГУ-1274), д, е – *S. albicans* (РКПГУ-1624), ж, з – *S. parapsilosis* (РКПГУ-1579), и, к – *S. parapsilosis* (РКПГУ-1525).



(собственно клеточная стенка) в них был полностью меланифицирован (Рис. 2 и). Он был гомогенно темный; небольшой по толщине наружный слой клеточной стенки также был темным, с четко различимыми микрофибриллами. Отметим, что меланификация клеточной стенки происходит у дрожжевых клеток *Cryptococcus neoformans* при выращивании их на среде L-DOPA [9] и у тканевых форм этого вида гриба [10].

Первый слой в составе клеточных стенок чувствительного штамма *C. parapsilosis* (РКПГУ-1579) имел умеренную электронную плотность и слабоконтрастные микрофибриллы. Второй наружный слой был в четыре раза тоньше, темный, с хаотично ориентированными микрофибриллами (Рис. 2 ж). Клеточные стенки гиф псевдомицелия *C. parapsilosis* тонкие (табл.), с однотипным строением – состояли из двух слоев одинаковой толщины (Рис. 2 з, и). Нижний слой, умеренно электронно-плотный, состоял из слабоконтрастных, беспорядочно расположенных микрофибрилл, тогда как микрофибриллы верхнего слоя были темные и вертикально ориентированные.

## РЕЗЮМЕ

Установлено, что у дрожжевых клеток резистентных штаммов *C. albicans* и *C. parapsilosis*, в отличие от чувствительных, имеются значительные изменения в строении клеточных стенок, характерные для каждого из них. Пока остается открытым вопрос о том, как можно объяснить контрастные изменения в строении стенок дрожжевых клеток резистентных штаммов двух видов *Candida* под влиянием сходных антимикотиков. Важен тот факт, что изменения в строении клеточных стенок дрожжевых клеток под действием антимикотиков не исчезают при переходе их в культуральную форму, то есть представляют собой генетически закрепленный признак. Интересно, что стенки гиф псевдомицелия не были утолщены и имели сходное строение у штаммов двух изученных видов. Можно предположить, что *in vivo* они не подвергаются изменениям и сохраняют присущее им строение, иными словами, дрожжевые клетки более чувствительны к влиянию антимикотиков, в отличие от клеток псевдомицелия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Капустина О.А., Карташова О.Л., Пашинин Н.С., Нургалиева Р.М. Чувствительность к противогрибковым препаратам грибов рода *Candida*, выделенных из разных биотопов тела человека. Современные наукоемкие технологии. 2010; 2: 94-95. [Kapustina O.A., Kartashova O.L., Pashinin N.S., Nurgalieva R.M. CHuvstvitel'nost' k protivogribkovym preparatam gribov roda Candida, vydelennyh iz raznyh biotopov tela cheloveka. Sovremennye naukoemkie tekhnologii. 2010; 2: 94-95 (In Russ)].
2. Степанова А.А., Васильева Н.В., Чжан Ф., Тонг Д. Ультроструктурное исследование клеток вегетативного мицелия *Aspergillus candidus* Link, выращенных *in vitro*. Проблемы медицинской микологии. 2016; 18 (2): 23-27. [Stepanova A.A., Vasil'eva N.V., Chzhan F., Tong D. Ul'trastrukturnoe issledovanie kletok vegetativnogo miceliya *Aspergillus candidus* Link, vyrashchennyh *in vitro*. Problemy medicinskoj mikologii. 2016; 18 (2): 23-27 (In Russ)].
3. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А. и др. Краткий атлас медицински значимых микромицетов рода *Candida*. СПб: Изд-во СЗГМУ им. Н.Н. Мечникова. 2013: 73 с. [Elinov N.P., Vasil'eva N.V., Stepanova A.A. i dr. Kratkij atlas medicinski znachimyh mikromicetov roda *Candida*. SPb: Izd-vo SZGMU im. N.N. Mechnikova. 2013: 73 s. (In Russ)].
4. Gow N.A.R., Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. Current Opinion in Microbiol. 2012; 15: 406-412.
5. Iwada K., Kanda Y., Yamaguchi H., Osumi M. Electron microscopic studies on the mechanism of action of clotrimazole on *Candida albicans*. Sabouraudia. 1973; 11: 205-209.
6. Gow N.A.R., Latge J.-P., A. Munro C.A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. Microbiology. 2017; 5 (3): 1-25.
7. Степанова А.А., Шевяков М.А., Авдеенко Ю.Л. и др. Изучение слизистой оболочки пищевода при кандидозе у ВИЧ-инфицированного больного. Проблемы медицинской микологии. 2011; 13 (1): 54-61. [Stepanova A.A., Shevyakov M.A., Avdeenko Y.L. i dr. Izuchenie slizistoj obolochki pishchevoda pri kandidoze u VICH-inficirovannogo bol'nogo. Problemy medicinskoj mikologii. 2011; 13 (1): 54-61 (In Russ)].
8. Степанова А.А., Цинзерлинг В.А., Шевяков М.А. и др. Сканирующая электронная микроскопия слизистой оболочки пищевода при кандидозе у ВИЧ-инфицированного больного. Проблемы медицинской микологии. 2008; 10 (2): 81-82. [Stepanova A.A., Cinzerling V.A., Shevyakov M.A. i dr. Skaniruyushchaya ehlektronnaya mikroskopiya slizistoj obolochki pishchevoda pri kandidoze u VICH-inficirovannogo bol'nogo. Problemy medicinskoj mikologii. 2008; 10 (2): 81-82 (In Russ)].
9. Васильева Н.В. Факторы патогенности *Cryptococcus neoformans* и их роль в патогенезе криптококкоза: Дисс. на соискание уч. степени д.б.н.. СПб, 2005: 340 с. [Vasil'eva N.V. Faktory patogennosti *Cryptococcus neoformans* i ih rol' v patogeneze kriptokokkoza: Diss. na soiskanie uch. stepeni d.b.n.. SPb, 2005: 340 s. (In Russ)].
10. Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Yamaguchi M., et al. Electron microscopy of autopsy material from the human brain cryptococcosis and AIDS. Problems in medical mycology. 2015; 17 (1): 35-40.

Поступила в редакцию журнала: 05.09.2018

Рецензенты: Т.С. Богомолова, Е.В. Фролова

