

УСПЕХИ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

**Под общей научной редакцией академика РАЕН
Ю. В.Сергеева**

Том I

**МАТЕРИАЛЫ ПЕРВОГО ВСЕРОССИЙСКОГО КОНГРЕССА
ПО МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ**

Москва
Национальная Академия Микологии
2003

ББК 28.591
УДК 58-616.5
У78

Редакционная коллегия:

Сергеев Ю. В. (главный редактор)
Лещенко В. М. (ответственный секретарь)
Белозерская Т. А.
Бибикова М. А.
Дьяков Ю. Т.
Саркисов К. А.
Сергеев А. Ю.
Тутельян В. А.
Феофилова Е. П.

У78 Успехи медицинской микологии. — Т. 1. — М.: Национальная академия микологии, 2003. — 358 с.

В первый том периодического сборника «Успехи медицинской микологии» вошли труды, посвященные вопросам биохимии, физиологии и генетики грибов, имеющих значение для медицины, этиологии и патогенезу грибковых инфекций, а также вирулентности и устойчивости возбудителей микозов. Рассмотрены новые методы лабораторной диагностики микозов, а также перспективные противогрибковые средства. Особая глава посвящена микотоксинам, микотоксикозам и отравлениям грибами. В главе по микогенной аллергии также представлены исследования по аэромикологии и значению грибов в экологии человека. Том завершается главой по грибной биотехнологии и ее приложению в медицине: лекарствам, пищевым добавкам и вакцинам на основе грибов. Издание составлено на основе материалов Первого всероссийского конгресса по медицинской микологии.

ББК 28.591
УДК 58-616.5
У78

**Издано в Российской Федерации в рамках программы
Национальной академии микологии**

*Издание осуществлено при поддержке
Международного общества по медицинской
и ветеринарной микологии (ISHAM)*

© Национальная академия микологии, 2003
© Медицина для всех, оформление, 2003

ПРЕДИСЛОВИЕ

Проблемы медицинской микологии, раздела медицины, рассматривающего влияние грибов на организм человека, являются весьма актуальными в наши дни. По-прежнему высока и продолжает расти заболеваемость дерматомикозами. Учащаются случаи глубоких оппортунистических микозов на фоне СПИД, ятрогенных иммунодефицитов и нейтропений, постоянно выявляются новые возбудители. Возрастает проблема устойчивости патогенных грибов к противогрибковым препаратам. Все большее значение приобретают грибковые инфекции в педиатрии, гинекологии, оториноларингологии и офтальмологии. Широкое распространение грибов в природе, их постоянное присутствие в ближайшем окружении и в самой среде макроорганизма обуславливают неизбежность контактов с ними человека. Большое значение для здоровья человека имеют неинфекционные последствия воздействия грибов и продуктов их жизнедеятельности: микогенная аллергия, микотоксикозы и отравления. Другим аспектом влияния грибов на здоровье человека является грибная биотехнология: разработка и производство лекарственных препаратов, биологически активных добавок и вакцин на основе грибов.

В настоящее время в России и за рубежом наблюдается значительный прогресс в изучении природы грибковых инфекций, микотоксикозов и микогенной аллергии. Картирован геном и изучены факторы патогенности многих болезнетворных грибов. Накоплен значительный клинический опыт диагностики и лечения микозов человека. Развитие молекулярно-генетических, биохимических и иммунологических технологий нашло широкое применение в лабораторной диагностике грибковых инфекций. Совершенствуются методы индикации микотоксинов, диагностики, лечения и профилактики микотоксикозов и грибных отравлений.

Достижения отечественной медицинской микологии в последние годы находили недостаточное освещение в медицинских периодических изданиях. Нередко наблюдалась картина разобщенности исследователей-биологов, изучающих патогенных, аллергенных и токсигенных грибов, и исследователей-врачей, изучающих сами заболевания, обусловленные грибами. Назрела необходимость обмена накопленным опытом врачами и учеными из разных регионов Российской Федерации, а также стран ближнего и дальнего зарубежья.

Для решения этих задач Общероссийской Национальной академией микологии в 2003 г. начато периодическое издание — сборник трудов «Успехи медицинской микологии». В первые два тома настоящего издания вошли материалы Первого Всероссийского Конгресса по Медицинской Микологии, состоявшегося в Москве в феврале 2003 г.

Редакционная коллегия и Организационный комитет конгресса выражают благодарность Международному обществу по медицинской и ветеринарной микологии (ISHAM) за поддержку издания материалов конгресса.

Президент Национальной академии микологии,
Академик РАЕН,
залуженный врач Российской Федерации

Сергеев Ю. В.

ГЛАВА 1

ФИЗИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА ГРИБОВ, ИМЕЮЩИХ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ МИКОЗОВ, ВИРУЛЕНТНОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

ВИДОВОЙ СПЕКТР И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Баженов Л. Г., Артемова Е. В., Шарипов Б. У.

Научный центр хирургии имени академика В. Вахидова МЗ РУз

Ташкент, Узбекистан

Целью исследования явилось изучение видового спектра культур *Candida* spp., выделенных из разных отделов пищеварительного тракта и определение их чувствительности к препаратам, применяемым при лечении микозов.

Изучено 103 штамма, предварительно идентифицированных как дрожжеподобные грибы рода *Candida*. Эти микроорганизмы были выделены из желудочного сока (37, 9%), содержимого кишечника (28, 2%), мазков из ротовой полости (25, 2%) и зева (8, 7%). Их идентификацию проводили параллельно с помощью коммерческой диагностической системы «Ауксаколор» (Франция) и разработанным нами (Л. Г. Баженов, 1994) кристаллографическим методом идентификации микроорганизмов. Чувствительность к антимикробным препаратам определяли методом диффузии в агар с помощью дисков с амфотерицином В, нистатином, кетоконазолом, клотримазолом, флуконазолом, итраконазолом, нитроксолином, цитеалом, интетриксом и анилиновыми красителями: метиленовым синим, бриллиантовым зеленым и генциановым фиолетовым.

Результаты идентификации *Candida* spp. обоими методами совпали в 90, 3% случаев. При использовании коммерческой системы видовая принадлежность 9, 7% штаммов оказалась не однозначной и они были идентифицированы только кристаллографическим методом.

Культуры, выделенные из полости рта, были представлены следующими видами: *C. tropicalis* и *C. parapsilosis* (по 25, 9%), *C. famata* (18, 5%), *C. glabrata* (11, 1%), *C. krusei* (7, 4%), *C. albicans*, *C. pseudotropicalis* и *C. guilliermondii* (по 3, 7%). Из желудочного сока: *C. glabrata* (31, 4%), *C. tropicalis* (28, 6%), *C. albicans* var. *stellatoidea* и *C. krusei* (по 11, 4%), *C. albicans* и *C. famata* (по 8, 6%). Из содержимого кишечника: *C. albicans* var. *stellatoidea* (32, 0%), *C. tropicalis* (28, 0%), *C. glabrata* (16, 0%), *C. famata* (12, 0%), *C. albicans* (8, 0%), *C. krusei* (4, 0%). Таким образом, в полости рта чаще всего встречались *C. tropicalis* и *C. parapsilosis*, в желудке — *C. glabrata* и *C. tropicalis*, а в кишечнике — *C. albicans* var. *stellatoidea* и *C. tropicalis*, а преобладающим видом дрожжеподобных грибов в пищеварительном тракте оказался *C. tropicalis*, тогда как по данным многих исследователей ведущим видом среди *Candida* spp. в ЖКТ является *C. albicans*. Возможно эти расхождения объясняются региональными особенностями распространения кандид.

Тестирование антимикотической активности изученных препаратов показало, что *Candida* spp. проявляли наибольшую чувствительность к нитроксолину, леворину, цитеалу, генциановому фиолетовому и бриллиантовому

зеленому (резистентных штаммов не выявлено), к амфотерицину В и кетоконазолу (по 6, 3% резистентных культур) и к нистатину (9, 4%). Умеренная чувствительность отмечена в отношении метиленовой сини (18, 8% резистентных штаммов), флуконазола (25, 8%), клотримазола (37, 5%) и итраконазола (46, 9%). Необходимо отметить, что чувствительность к названным препаратам практически не зависела от вида дрожжеподобного гриба, за исключением флуконазола, к которому было устойчиво 100% штаммов *C. krusei* и 57, 1% штаммов *C. glabrata*, в то время как все штаммы *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* и *C. parapsilosis* были к нему чувствительны, что согласуется с данными литературы [А. Ю. Сергеев, Ю. В. Сергеев, 2001].

Таким образом, наиболее часто встречающимся видом *Candida spp.* в пищеварительном тракте оказался *C. tropicalis*. Наряду с *C. tropicalis* чаще других обнаруживались: в полости рта — *C. parapsilosis*, в желудке — *C. glabrata*, в кишечнике — *C. albicans var. stellatoidea*. Наибольшую активность против изученных культур кандид демонстрировали нитроксалин, леворин, цитеал, генциановый фиолетовый и бриллиантовый зеленый (резистентных штаммов не выявлено), амфотерицин В и кетоконазол (по 6, 3%) и нистатин (9, 4% устойчивых штамма). К флуконазолу были чувствительны все культуры *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* и *C. parapsilosis*, но оказались устойчивыми *C. krusei* (100%) и *C. glabrata* (57, 1% устойчивых штаммов).

ИЗУЧЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ ГРИБОВ РОДА КАНДИДА, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ, С ПОМОЩЬЮ PARAMESCIUM CAUDATUM

Баженев Л. Г., Таурова Л. С., Артемова Е. В.

Научный центр хирургии имени академика В. Вахидова МЗ РУз
Ташкент, Узбекистан

Высокая частота выявления грибов рода Кандида (ГРК) при значительной степени обсемененности ими гастродуоденальной зоны, клинический эффект при назначении противокандидозных средств свидетельствуют об определенном значении этих микроорганизмов в патогенезе гастродуоденальных язв. В связи с вышеизложенным, задачей настоящей работы явилось изучение вирулентности ГРК, выделенных от больных с язвенной болезнью 12-перстной кишки (ЯБДПК).

Изучено 19 штаммов ГРК, изолированных из желудочного сока (порция натошак), полученного при зондировании желудка больных с ЯБДПК. ГРК выделяли и идентифицировали с помощью традиционных методов. Параллельно проводилось исследование на наличие *Helicobacter pylori* (HP). Наряду с ГРК желудочной локализации для сравнения были изучены 13 штаммов этих грибов, выделенных из других источников (из мокроты — 8 штаммов, из зева — 5). Вирулентность ГРК изучали методом Галикеева Х. Л. с

соавт. (1987), первоначально предложенным для исследования дизентерийных бактерий, при этом в качестве тест-объекта использовали простейших *Paramecium caudatum* (РС). Контролем служили пробы со средой, используемой для культивирования РС.

Установлено, что ГРК, независимо от источника выделения, обладали достоверно более выраженным ингибирующим действием на РС по сравнению с контролем. Однако, при разделении ГРК на штаммы, изолированные из желудочного сока и штаммы, выделенные из легких и зева, оказалось, что происхождение ГРК практически не оказывало влияния на их вирулентность. Однако вирулентность отдельных штаммов варьировала в довольно широком диапазоне. Поэтому, используя метод ранжирования, изученные нами культуры ГРК были разделены на классы. Всего образовалось 7 классов. В 1-й и 2-й классы, включающие наиболее вирулентные микроорганизмы, вошло 3, 1% и 6, 2% культур, соответственно. Микроорганизмы с умеренной вирулентностью, составившие 3-й и 4-й классы, превалировали (31, 3% и 25, 0%, соответственно). ГРК с низкой вирулентностью распределились по стальным 3-м классам: 5-му, 6-му и 7-му (9, 4%, 12, 5% и 12, 5% штаммов, соответственно). Таким образом, подавляющее большинство испытанных культур ГРК (65, 6%) характеризовалось высокой и умеренной вирулентностью. Поэтому весьма вероятна их патогенетическая роль при гастродуоденальных заболеваниях (ГДЗ). Из желудочного сока совместно с ГРК довольно часто высевались и НР, которым отводится ведущая роль в этиопатогенезе ГДЗ. Представлялось интересным рассмотреть, насколько вирулентность ГРК зависит от их ассоциации с НР. Оказалось, что вирулентность грибов в присутствии НР увеличивается, хотя и не достоверно. Однако, при рассмотрении ГРК по классам с учетом наличия НР и без такового, выявлено, что из всех изолированных совместно с НР штаммов грибов, 75% приходилось на микроорганизмы с умеренной вирулентностью, входящих во 2-й и 3-й классы. Следовательно, при выделении из желудочного сока больных с ГДЗ данных ассоциаций микроорганизмов, можно предполагать более тяжелое течение заболевания, а планируемая антимикробная терапия должна предусматривать не только эрадикацию *HP*, но и подавление ГРК.

РОЛЬ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* В МИКРОБИОЦЕНОЗЕ ЖЕЛУДКА ПРИ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗЕ

**Баженов Л. Г., Артемова Е. В.,
Баженова С. С., Шарипов Б. У.**

*Научный центр хирургии имени академика В. Вахидова МЗ РУз
Ташкент, Узбекистан*

Candida spp. (CS) наряду с *Helicobacter pylori* (НР) и лактобактериями (Л) способны колонизировать желудок, так как устойчивы к низким значе-

ниям pH желудочного сока. Однако если НР в последние годы интенсивно изучается, то СS и Л остаются практически в «тени». Недостаточно исследован также характер взаимоотношений между этими тремя группами микроорганизмов в процессе эрадикации НР. Поэтому целью работы явилось определение места СS в микробиоценозе желудка при хеликобактериозе, а также изучение влияния на их персистенцию в желудке противохеликобактерного лечения.

Обследовано 73 больных с гастродуоденальной патологией (ГДП) (язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки), у 23 из них произведено углубленное изучение микробиоценоза желудка, а 50 — подвергнуто стандартной противохеликобактерной терапии (омепразол+метронидазол+амоксациллин). В качестве материала для исследования использовали желудочный сок больных, взятый натощак. СS выделяли на среде Сабуро. Наличие НР определяли с помощью модифицированного нами уреазного теста и культивирования на селективном кровяном эритроит-агаре в микроаэрофильных условиях (Л. Г. Баженов, 1991). Л изолировали с использованием жидкой казеиновой среды и кровяного агара в анаэробных условиях.

Микроорганизмы выявлены у 70% больных первой группы. Из них НР обнаружены у 69% пациентов, причем у 31% этих больных НР присутствовали без сопутствующей флоры, у 19% находились совместно с СS и у 19% — совместно с Л. Сочетания представителей всех трех групп микроорганизмов, а также наличия отдельно Л без ассоциантов не установлено ни одного больного. Следовательно, НР обнаруживаются в желудочном соке в монокультуре, а в случаях ассоциаций, либо только с Л, либо только с СS, тогда как ассоциации СS с Л имеют место только в отсутствии НР. СS, по видимому, также играют определенную роль в развитии ГДП, так как они могут выявляться в монокультуре (12, 5%). Л персистируют в желудке только совместно с НР или с СS и их значение при ГДП требует дальнейшего исследования. В группе больных подвергнутых эрадикационной терапии, НР обнаруживались в 84, 0%, СS — в 36, 0% случаев, обсемененность ими желудочного сока составила $1, 7 \cdot 10^5 \pm 0, 8 \cdot 10^4$ и $1, 2 \cdot 10^3 \pm 0, 9 \cdot 10^2$ КОЕ/мл, соответственно. После противохеликобактерного лечения частота выявления НР снизилась до 50, 0% (РР 0, 01), тогда как высеваемость СS возросла до 74, 0% (РР 0, 01), при этом обсемененность НР уменьшилась до $2, 5 \cdot 10^3 \pm 1, 7 \cdot 10^2$ КОЕ/мл (РР 0, 01), а обсемененность СS возросла до $8, 4 \cdot 10^4 \pm 7, 1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл (РР 0, 01).

Полученные результаты свидетельствуют об определенной роли СS при ГДП, при этом стандартная противохеликобактерная терапия способствует усилению роли СS, затрудняющих эрадикацию НР. Последующее изучение ассоциаций микроорганизмов, персистирующих в желудке, позволит более объективно оценить их роль при ГДП, что в свою очередь даст возможность разрабатывать более адекватные методы корригирующей терапии и их эффективной профилактики, в частности с использованием эубиотиков, обладающих антихеликобактерным и антикандидозным действием.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ПЕРЕДАЧЕ СИГНАЛА ГОЛОДА У ГРИБОВ

Белозерская Т. А., Соколовский В. Ю.
Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН
Москва

Дифференцировка и вирулентность, связанные с экспрессией определенных генов в клетках грибов и дрожжей, регулируются с помощью консервативных каскадов сигнальной трансдукции, состоящими из нескольких белковых компонентов. Основными из этих каскадов являются MAP-киназный каскад и каскад G-белок — цАМФ — протеинкиназа А. В работе с помощью мутационного анализа охарактеризованы отдельные этапы каскада, связанного с передачей сигнала голода в ходе дифференцировки *Neurospora crassa* — представителя класса аскомицетов, наиболее подробно изученного в отношении биохимии и генетики.

Основным стрессорным фактором внешней среды, запускающим дифференцировку у дрожжей и мицелиальных грибов, является голодание. Снижение концентрации питательных веществ на определенном этапе в ходе развития при культивировании *N. crassa* на полноценной среде вызывает экспрессию нескольких групп генов. Одна группа так называемых генов *con* (conidiation) выделена на основании их предпочтительной экспрессии в процессе образования конидий. Функция продуктов этих генов неизвестна, однако есть предположение, что они кодируют формирование внутриклеточных компонентов защиты от стресса. Вторая группа представлена генами *bli* (blue-light-inducible), уровень мРНК которых увеличивается после освещения синим светом (350–500 нм). Наиболее важным из этой группы является ген *bli-7* (*eas*), кодирующий особый класс белков — гидрофобины. Эти белки обнаружены только у грибов, выявлены на поверхности воздушных гиф, плодовых тел и конидий и, по-видимому, выполняют защитную функцию от неблагоприятных внешних факторов. К обеим вышеупомянутым группам можно отнести гены *albino* (*al-1* и *al-2*) кодирующие два фермента — фитоиндегидрогеназу и фитоинсинтетазу. Эти ферменты обеспечивают функционирование двух последовательных реакций на пути биосинтеза нейроспороксантина — основного каротиноида, присутствующего в клетках *N. crassa*. Экспрессия генов *al-1* и *al-2* индуцируется как после освещения, так и в процессе формирования конидий. По-видимому, в клетках *N. crassa* каротиноиды выполняют не только фотопротекторную функцию в ходе онтогенеза. Таким образом, экспрессия генов развития обеспечивает формирование внутриклеточных защитных механизмов против внешних стрессорных факторов.

Интересно, что в ходе развития у *N. crassa* можно вызвать ускоренную экспрессию представленных выше генов путем снижения концентрации азота или глюкозы в среде культивирования (в 25 раз).

Сравнительный анализ экспрессии генов при культивировании *N. crassa* на полноценной среде и на среде с пониженным содержанием азота, пока-

зал, что экспрессия охарактеризованных ранее групп генов *N. crassa* сильно стимулируется при азотном голодании. Что же контролирует накопление транскриптов генов *al*, *bli* и *con* в условиях голода?

Обмен азота в клетках грибов регулируется несколькими факторами транскрипции. Один из них — основной регулятор азотного метаболизма в клетках грибов — NIT2 является положительным фактором передачи сигнала азотного голода. Он дерепрессирует экспрессию генов в ответ на азотное голодание. Еще один регуляторный белок — NMR1 определяет дерепрессию контролируемых азотом генов при культивировании гриба на полноценной среде. NMR1 является отрицательным регуляторным фактором, поскольку, связываясь с белком NIT2 и формируя димер, он снижает активность фактора транскрипции NIT2. Для выяснения участия факторов транскрипции NIT2 и NMR1 в экспрессии генов защитных механизмов в ходе развития *N. crassa* было проведено сравнительное исследование их экспрессии у дикого типа *N. crassa* и у мутантов с дефектными факторами транскрипции — NIT2 и NMR1. Установлено, что у мутантов *nit-2*, и у мутантов *nmr-1*, экспрессия исследованных генов, как на полноценной среде, так и в условиях азотного голода, отличается от их экспрессии в клетках дикого типа. Однако характер экспрессии генов защитных механизмов в мутантах *nit-2* и *nmr-1* при разной концентрации азота в среде, отличается от характера экспрессии у этих мутантов основных генов азотного обмена, таких как гены нитрат редуктазы (*nit-3*) и нитритредуктазы (*nit-6*). По-видимому, в процессе регуляции анализируемых нами генов уровнем внеклеточного азота включаются регуляторные факторы, не связанные с функционированием NIT2 и NMR1.

Известно, что в передаче сигнала глюкозного голода как у прокариотических, так и у эукариотических организмов, в том числе и у грибов, принимает участие система цАМФ. В эту систему входят аденилатциклаза, катализирующая синтез цАМФ, цАМФ-специфичная фосфодиэстераза, катализирующая гидролиз циклического нуклеотида, а также цАМФ-зависимая протеинкиназа, состоящая из двух регуляторных и двух каталитических субъединиц. Фермент меняет активность в зависимости от концентрации цАМФ. Кроме того, в систему трансдукции, связанной с изменением концентрации глюкозы в среде, входят транспортеры глюкозы, рецепторные G-белки и белок-мишень для цАМФ-зависимой протеинкиназы (CREB), являющийся фактором транскрипции и действующий через CRE-элемент (TGACGTCA) в промоторах генов.

В клетках *N. crassa* обнаружены все компоненты системы цАМФ. Анализ экспрессии исследованных нами генов в мутантах *crisp 1* (*cr-1*) с пониженным уровнем цАМФ ввиду нарушения синтеза аденилатциклазы и мутанте *crpk*, в котором имитируется повышенный уровень цАМФ ввиду дефекта регуляторной субъединицы протеинкиназы A, показал, что понижение внутриклеточного уровня цАМФ приводит к увеличению экспрессии генов, связанных с развитием. Кроме того, обнаружена строгая корреляция между количеством CRE-элементов в промоторах этих генов и их экспрессией как в условиях глюкозного, так и азотного голодания. Присутствие CRE-эле-

мента в промоторе гена *nit-2* позволяет сделать предположение относительно возможного участия цАМФ в экспрессии этого гена. На основании полученных результатов можно заключить, что цАМФ-зависимая сигнальная система является основной в ходе регуляции экспрессии генов *N. crassa* при передаче сигналов как глюкозного, так и, по-видимому, азотного голода. Важно подчеркнуть, что цАМФ-зависимый путь передачи сигнала глюкозного голода универсален для мицелиальных грибов и дрожжей. Обсуждается возможная роль других сигнальных каскадов, в частности, Ras-зависимого и MAP — киназного, в регуляции дифференцировки мицелиальных грибов и дрожжей, таких как *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans*.

Работа проводилась при поддержке РФФИ, грант 01-04-48567

ЭТИОЛОГИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ КАНДИДОЗОВ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

Горбунов В. А., Титов Л. П.,
Ермакова Т. С., Молочко В. А.

ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии

Минск, Беларусь

Candida spp. нередко является возбудителем различных формнозокомиального кандидоза, который в ряде случаев плохо поддается терапии. Одна из важнейших проблем, связанных с тяжелыми инфекциями, вызванными *Candida spp.*, заключается в том, что адекватная терапия назначается своевременно только 15–40% пациентов. За последнее десятилетие число случаев диссеминированного кандидоза увеличилось, летальность при этом остается на уровне 50–88%. Возросло значение инфекций, вызванных не только *C. albicans*, но и другими видами *Candida spp.* Цель: Исследовать видовой состав возбудителей поверхностных форм кандидозов, и резистентность изолятов. Методы: Культуры *Candida spp.* выделяли при выраженных клинических симптомах кандидозной инфекции. Культуры кандид получали традиционной микологической техникой, а видовую идентификацию и определение чувствительности к противогрибковым препаратам проводили с использованием анализатора *ATB-Expression* (BioMerieux). Результаты: В ходе исследования выделена 381 культура дрожжеподобных грибов *Candida*. В структуре полученных изолятов преобладали: *C. albicans* (46, 72%), *C. sake* (7, 61%), *C. kefyr* (3, 41%), *C. glabrata* (2, 36%), *C. inconspicua* (1, 57%), удельный вес других видов: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lambica*, *C. globosa*, *C. holmii*, *C. hellenica*, *C. pulcherrima*, *C. curvata*, *C. valida*, *C. norvegensis* составил от 0, 26 до 0, 79%. 34, 12% культур идентифицированы как *Candida spp.* Таким образом, в этиологии поверхностных форм кандидозов играют роль не менее 15 видов грибов рода *Candida spp.* Исследована чувствительность выделенных культур кандид к Амфотерицину В, Флуцитозину, Кетоконазолу, Миконазолу, Нистатину, Эконазолу. Доля устойчивых и умеренно устойчивых штаммов *C. albicans* к амфотери-

цину В составила 1,8%, к Флуцитозину — 6,1%, к Кетоконазолу — 11,0%, к Миконазолу — 3,0%, к Нистатину — 3,7%, к Эконазолу — 9,2%. Удельный вес устойчивых форм среди других видов кандид колеблется в пределах 1–15%, в зависимости от вида возбудителя и типа препарата. Достоверных различий в видовой резистентности *Candida spp.* не установлено. Выводы: В этиологии поверхностных кандидозов участвуют 15 видов *Candida*. Они характеризуются относительно не высоким удельным весом устойчивых к противогрибковым препаратам вариантов. Процент устойчивых форм колеблется от 1,8 до 9,2%. Трудности терапии кандидозов, очевидно, связаны не только с антимикробной устойчивостью возбудителей, но и с биологической активностью кандид, тяжестью основного заболевания, обуславливающих нарушение функции иммунной системы и дисметаболические расстройства в организме.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ГРИБОВ РОДА CANDIDA К ДЕЙСТВИЮ ЛАКТОБАЦИЛЛ

Ермоленко Е. И., Ждан-Пушкина С. Х.,
Гефен Г. Е., Запх Г. А., Тец В. В.

Санкт-Петербургский медицинский университет имени И. П. Павлова
межрайонная клинико-диагностическая лаборатория г. Санкт-Петербурга
Санкт-Петербург

Вероятность возникновения и тяжесть течения кандидоза во многом определяются особенностями взаимодействия лактобацилл и *Candida spp.*. В настоящее время не существует стандартных подходов в оценке чувствительности грибов к антагонистическому действию *Lactobacillus spp.* В экспериментах с супернатантами, фильтратами, экстрактами или цельными бактериями, выделяющими свои продукты в культуральную среду, в подавляющем числе случаев регистрировали фунгистатический эффект или отмечали уменьшение скорости размножения *Candida spp.*. Чаще всего в исследованиях использовали только *C. albicans* или видовую принадлежность грибов не учитывали.

Целью данной работы явилось изучение чувствительности различных штаммов *C. albicans* и *C. krusei* к действию лактобацилл.

В работе использовали эталонную культуру *Candida albicans* ATCC 885-653, а также 5 штаммов *C. albicans* и 5 штаммов *C. krusei*, выделенные из урогенитального тракта при хроническом кольпите. В качестве антагонистов были выбраны коллекционные культуры *L. plantarum* 8a-P3, *L. casei* DN-114001 *defensis* и 15 штаммов лактобацилл, выделенных у практически здоровых женщин.

Микробный антагонизм исследовали модифицированным нами методом двухслойного агара, добавляя в нижний слой агара различные количества лактобацилл (1–7 IgKOE на 1 мл среды) и нанося одинаковые количества

грибов (6lg КОЕ на 1 мл) на поверхность верхнего слоя агара. Контролем служили чашки, в которые лактобациллы не добавляли. Для выявления фунгистатического и фунгицидного эффекта микробов антагонистов использовали метод реплик.

При внесении бактерии в среду в максимальных количествах (7 lg КОЕ на 1 мл), обнаружены штаммы *Candida. spp.* устойчивые к действию лактобацилл. Кроме того, выявлены статистически достоверные различия в чувствительности грибов различных видов к фунгицидному действию *Lactobacillus spp.*. Так, штаммы *C. krusei* были чувствительны только к 27, 7% штаммов лактобацилл, *C. albicans* погибали при росте в присутствии 72, 7% штаммов бактерий.

При подсчете минимального количества КОЕ лактобацилл, оказывающих фунгицидный эффект на *C. albicans*, эта величина колебалась в пределах от 0, 6 до 1, 6 lg КОЕ. Значительно меньшие количества бактерий оказывали подобное действие на *C. krusei*. Данный показатель варьировал у них в пределах 2, 6– 2, 6 lg КОЕ. Фунгистати-ческий эффект наблюдали в чашках, в которых количество внесенных в нижний слой агара *Lactobacillus spp.* было в 10–100 раз меньшим.

Таким образом, при совместном росте *Candida spp.* с лактобациллами на двухслойном агаре были выявлены критические минимальные количества бактерий, способные оказывать не только фунгистатический, но и фунгицидный эффект. Использованный нами подход позволил установить, что *C. albicans* обладают большей чувствительностью к действию веществ, выделяемых лактобациллами, по сравнению с *C. krusei*. Последнее имеет практическое значение при выборе оптимальных способов лечения и профилактики кандидозов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ РОСТА ТЕСТ КУЛЬТУРЫ ДРОЖЖЕЙ *S. CEREVISIAE* НА ОСНОВЕ ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

Ершов Ю. А., Куценко П. А.
МГТУ имени Н. Э. Баумана
Москва

Разработан алгоритм автоматизированной обработки экспериментальных данных по росту микробных культур, позволяющий прогнозировать биологическую активность различных химических агентов.

Рост клеточных культур при воздействии добавок может быть описан уравнением экотоксикологической модели популяций:

$$\text{Время роста} — t(c_1) = \frac{1}{np_x} \ln \left[\frac{c_1}{c_0} \left(\frac{K_1 - c_0}{K_1 - c_1} \right)^{1+n} \right] \quad (1)$$

Здесь $K_i = (fbp - p_x b_x) / (ap_x)$ (2) — предельная плотность культуры, c_0, c_i — начальная плотность и плотность растущей культуры, a, b, p — параметры модели роста интактной культуры, p_x, b_x — параметры модели роста, зависящие от концентраций добавок x_1, x_2 и от параметров активности добавок $d_{11}, d_{12}, d_{21}, d_{22}$:

$$p_x = p + d_{11}x_1 + d_{12}x_2 \quad (3); \quad b_x = b + d_{21}x_1 + d_{22}x_2 \quad (4); \quad n = aK_i/b_x.$$

Получены экспериментальные данные о динамике роста дрожжей *S. c.* для: 30 серий — действие отдельных добавок, 22 серии — сочетанное действие добавок.

За критерий идентификации параметров модели (1) принят минимум суммы квадратов разностей расчетных $K_i(x)$ и опытных $Q_i(x)$ значений предельных плотностей:

$$\tilde{\theta} = \arg \min_{\theta} \left\{ \sum_{i=1}^N \left(K_i(\vec{x}) - Q_i(\vec{x}, \vec{\theta}) \right)^2 \right\} \quad (5)$$

где x — вектор концентраций добавок), θ — вектор параметров, N — число экспериментов.

Идентификацию модели проводили по следующему алгоритму.

1. В отсутствие добавок выражения (1) и (2) имеют вид:

$$t(c_j) = \ln[(c_j/c_0)\{(K_0 - c_0)/(K_0 - c_j)\}^2]/p \quad (6), \quad \text{где } K_0 = b/a \quad (7)$$

Определяют из эксперимента предельную плотность K_0 и проводят минимизацию квадратичного отклонения расчетных данных от опытных. Это позволяет рассчитать параметр p .

$$p = \arg \min_p \left[\sum_{j=0}^M \left\{ T_j - \frac{1}{p} \ln \left(\frac{c_j}{c_0} \left(\frac{K_0 - c_0}{K_0 - c_j} \right)^2 \right) \right\}^2 \right] \quad (8)$$

где c_j — опытные значения плотности популяции в момент времени T_j , M — число экспериментальных точек.

2. Используя опытные данные о предельной плотности популяции при раздельном действии каждой из добавок, получают системы линейных уравнений относительно $\{d_{11}, d'_{21}\}$ и $\{d_{12}, d'_{22}\}$, где $d'_{21} = d_{21}/a$, $d'_{22} = d_{22}/a$.

3. Обратная подстановка найденных параметров $\{d_{ij}\}$ в выражение для предельной плотности (2) дает ее расчетное значение по модели. Оптимальный вектор параметров $\{d_{ij}\}$ определяют в соответствии с критерием идентификации (5).

4. Переходят из базиса параметров $\{K_0, p, d_{11}, d_{12}, d'_{21}, d'_{22}\}$ в базис $\{b, p, d_{11}, d_{12}, d_{21}, d_{22}\}$. Для этого находят параметр a . Значение a рассчитывают аналогично параметру p , но при этом привлекают данные всех серий опытов. По найденному a определяют $d_{21} = d'_{21}a$, $d_{22} = d'_{22}a$, $b = K_0a$.

ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТООБРАЗУЮЩИХ СВОЙСТВ У ГРИБОВ РОДА *TRICHOPHYTON*

Глушко Н. И., Файзуллина Е. В.

Лаборатория грибковых аллергенов Казанского государственного
института эпидемиологии и микробиологии МЗ РФ
кафедра дерматовенерологии
Казанского государственного медицинского университета
Казань

Целью нашей работы стало изучение особенностей выделения протеолитических ферментов у музейных и свежевыделенных штаммов дерматофитов рода *Trichophyton* (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*).

Для выполнения данной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Идентифицировать штаммы дерматофитов с учетом их биохимических свойств.
2. Разработать модель изучения кератинолитической активности дерматофитов рода *Trichophyton*.
3. Изучить динамику роста и образования протеолитических ферментов у музейных и свежевыделенных штаммов.
4. Изучить спектр субстратной специфичности и оптимум pH у наиболее активного штамма.

Материалом исследования явились грибы музейных культур и свежевыделенных штаммов от больных рода *Trichophyton* (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*).

Штамм *T. rubrum* 82 получен из коллекции музея ЦКВИ (г. Москва) и используется в качестве производственного при получении антигенных препаратов. Штамм *T. rubrum* 3 выделен от больного с дерматомикозом кожи рук. Штамм *T. mentagrophytes* 200 выделен от больного с микозом ногтей. Штамм *T. mentagrophytes* 236 является музейным штаммом. Штаммы 4 (*T. rubrum*), 225 (*T. rubrum*), 254 (*T. mentagrophytes*), выделены от больных с онихомикозами в микологической лаборатории КНИИЭМ.

В соответствии с поставленными задачами первым этапом нашего исследования явилось подробное морфологическое, культуральное и биохимическое изучение штаммов грибов, с которыми предполагалось провести основную часть работы. В результате нами были выбраны для дальнейшего изучения типичные музейные и свежевыделенные штаммы дерматофитов двух наиболее распространенных видов — *T. rubrum* и *T. mentagrophytes*.

В результате проведенного изучения была подтверждена видовая идентификация свежевыделенных и музейных штаммов дерматофитов. С помощью теста на уреазную активность удалось идентифицировать штаммы рода *Trichophyton*. В соответствии с данными литературы *T. mentagrophytes* способен выделять уреазу в питательную среду («+» результат), а *T. rubrum* не продуцирует уреазу («-» результат). Для дальнейшей работы были выбраны наиболее активные штаммы *T. rubrum* 3, 82 и *T. mentagrophytes* 200, 236 и

провели разработку модели культивирования дерматофитов для индукции протеолитических (кератинолитических) ферментов.

Изучение изменения состава среды и динамики образования протеолитических ферментов проводили при сравнительном изучении роста штаммов *T. rubrum* и *T. mentagrophytes* на разработанной нами синтетической питательной среде и среде Сабуро. На синтетической питательной среде источником углерода служила глюкоза, а источником азота — кератин волос. Для проведения опыта нами были выбрано по одному штамму видов из микологического музея и по свежeweделенному штамму видов рода Трихофитон.

На синтетической среде в процессе культивирования отмечено накопление в среде растворимых белков с 5-10 до 40-50 мкг/мл. Во время роста грибы — дерматофиты создают кислую среду, снижая pH культуральной жидкости с 6, 5 — 7 до 3, 5-4, 5. Эти результаты являются косвенными данными, свидетельствующими о выделении протеолитических ферментов изучаемыми штаммами грибов. Для прямого подтверждения мы проделали непосредственное измерение протеолитической активности.

Изучение динамики протеолитической активности грибов-дерматофитов рода *Trichophyton* на среде Сабуро и на синтетической среде показало, что максимальная протеолитическая активность в культуральной жидкости наблюдается после 1-ой недели культивирования. Снижение уровня протеолитической активности наблюдается через 2 — 3 недели роста биомассы. Максимальная продукция протеолитических ферментов наблюдается у свежeweделенных штаммов (шт. *T. mentagrophytes* 200) на среде Сабуро и на синтетической среде.

По величине протеолитической активности можно предположить, какой из штаммов является более патогенным. Таким образом, нашими результатами подтверждается предположение о взаимосвязи уровня протеолитической активности и патогенности.

Дальнейшая работа по изучению некоторых параметров протеолитических ферментов проводилась нами с синтетической культуральной средой наиболее активного штамма *T. mentagrophytes* 200. Мы изучали влияние pH реакционной смеси на уровень протеолитической активности.

В результате было показано, что максимальный уровень протеолитической активности наблюдался при крайних значениях pH (3, 2 и 9, 0). Поэтому мы можем предположить у изучаемого гриба наличие двух различных ферментов — кератиназы и кислой протеиназы. Для ряда кератинолитических и протеолитических ферментов грибов получены данные о широкой субстратной специфичности.

Выводы:

1. Тест на уреазную активность может быть использован для определения видовой принадлежности штаммов дерматофитов.
2. Разработана модель культивирования дерматофитов рода *Trichophyton* в жидкой синтетической питательной среде на кератине волос.
3. Максимальная продукция протеолитических ферментов наблюдается у свежeweделенных штаммов дерматофитов, причем максимальная активность отмечена после 1-ой недели культивирования.

4. Уровень протеолитической активности штамма *T. mentagrophytes* 200 наиболее высок при РН среды 3,0 и 8,5.
5. Протеолитические ферменты обладают широким спектром субстратной специфичности по отношению как к растворимым, так и нерастворимым белкам, однако максимальная протеолитическая активность отмечена с кератином волос.

В качестве практической реализации проведенных исследований считаем целесообразным внедрение теста на уреазную активность в клиническую практику для дифференциальной видовой диагностики грибов рода *Trichophyton*.

Возникает сомнение в правомерности широко распространенного мнения о целесообразности применения подкисленных растворов для профилактики микозов стоп.

ЭТИОЛОГИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ КАНДИДОЗОВ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

Горбунов В. А., Титов Л. П.,
Ермакова Т. С., Молочко В. А.

ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии
Минск, Беларусь

Candida spp. нередко является возбудителем различных форм нозокомиального кандидоза, который в ряде случаев плохо поддается терапии. Одна из важнейших проблем, связанных с тяжелыми инфекциями, вызванными *Candida spp.*, заключается в том, что адекватная терапия назначается своевременно только 15–40% пациентов. За последние 10 лет число случаев диссеминированного кандидоза увеличилось, летальность при этом остается на уровне 50–88%. Возросло значение инфекций, вызванных не только *C. albicans*, но и другими видами *Candida spp.*

Цель: Исследовать видовой состав возбудителей поверхностных форм кандидозов, и резистентность изолятов.

Методы: Культуры *Candida spp.* выделяли при выраженных клинических симптомах кандидозной инфекции. Культуры кандид получали традиционной микологической техникой, а видовую идентификацию и определение чувствительности к противогрибковым препаратам проводили с использованием анализатора *ATB-Expression (BioMerieux)*.

Результаты: В ходе исследования выделена 381 культура дрожжеподобных грибов *Candida*. В структуре полученных изолятов преобладали: *C. albicans* (46, 72%), *C. sake* (7, 61%), *C. kefyr* (3, 41%), *C. glabrata* (2, 36%), *C. inconspicua* (1, 57%), удельный вес других видов: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lambica*, *C. globosa*, *C. holmii*, *C. hellenica*, *C. pulcherrima*, *C. curvata*, *C. valida*, *C. norvegensis* составил от 0, 26 до 0, 79%. 34, 12% культур идентифицированы как *Candida spp.* Таким образом, в этиологии поверхностных форм кандидозов играют роль не менее 15 видов грибов рода *Candida spp.*

Исследована чувствительность выделенных культур кандид к Амфотерицину В, Флуцитозину, Кетоконазолу, Миконазолу, Нистатину, Эконазолу. Доля устойчивых и умеренно устойчивых штаммов *C. albicans* к амфотерицину В составила 1, 8%, к Флуцитозину — 6, 1%, к Кетоконазолу — 11, 0%, к Миконазолу — 3, 0%, к Нистатину — 3, 7%, к Эконазолу — 9, 2%. Удельный вес устойчивых форм среди других видов кандид колеблется в пределах 1-15%, в зависимости от вида возбудителя и типа препарата. Достоверных различий в видовой резистентности *Candida spp.* не установлено.

Выводы: В этиологии поверхностных кандидозов участвуют 15 видов *Candida*. Они характеризуются относительно не высоким удельным весом устойчивых к противогрибковым препаратам вариантов. Процент устойчивых форм колеблется от 1, 8 до 9, 2%. Трудности терапии кандидозов, очевидно, связаны не только с антимикробной устойчивостью возбудителей, но и с биологической активностью кандид, тяжестью основного заболевания, обуславливающих нарушение функции иммунной системы и дисметаболические расстройства в организме.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ГАЛОТОЛЕРАНТНОСТИ ДРОЖЖЕЙ РОДА *MALASSEZIA* С НАЛИЧИЕМ ВНЕШНЕЙ ЛИПИДНОЙ ОБОЛОЧКИ

Гейдебрехт О. В., Шелемех О. В., Арзуманян В. Г.

Институт микробиологии РАН
Москва

Дрожжи рода *Malassezia* представляют собой один из компонентов нормальной микрофлоры кожи человека и в чистых культурах не растут в отсутствие липидных добавок, т. е. являются облигатно липофильными. Наряду с этим уникальным среди прочих дрожжей свойством, *Malassezia* способны выживать и расти при концентрациях соли в среде до 18% [Гейдебрехт О. В., Арзуманян В. Г., 2002]. Основными механизмами, обычно обеспечивающими осмопротекцию клеток микроорганизмов, считают способность к поддержанию высокой концентрации внутриклеточного пула ионов [Kushner D. J., 1978] или к синтезу неионных осмопротекторов таких, как некоторые аминокислоты или глицерин [Матвеева Н. И. с соавт., 1997; Андреищева Е. Н. с соавт., 1999]. Предполагают, однако, что у *Malassezia* особую роль по обеспечению галотолерантности играет внешняя липидная оболочка клеток [Barfatani M. et al, 1964; Mittag H., 1995], хотя данная гипотеза до сих пор не имеет экспериментального подтверждения. Целью настоящего исследования явилось проверка этой гипотезы.

Объектом исследования была 2 суточная культура дрожжей *Malassezia spp.*, выращенная на среде Диксона при 32°C. Суспензии клеток дрожжей инкубировали при концентрациях NaCl 0% (контроль I) и 34% (насыщенный раствор) в течение 2 часов при 28° С. Для удаления липидной оболоч-

ки использовали разработанный ранее способ, при котором клетки, после обработки 1% раствором додецилсульфата натрия (*SDS*) при 50°C 25 минут, полностью сохраняли жизнеспособность и целостность цитоплазматической мембраны [Арзуманян В. Г. с соавт., 2000]. Клетки без липидной оболочки инкубировали с 0% (*контроль 2*) и 34% *NaCl* аналогичным образом. После инкубации интактных и обработанных *SDS* клеток с солью и без соли производили высевы на плотную среду, а спустя 2 дня учитывали количество выросших колоний, т. е. жизнеспособных особей в единице объема суспензии. Число колоний в контроле (0% соли) принимали за 100%. Объектом сравнения была 2 суточная культура дрожжей *Candida albicans* (коллекция НИИВС им. Мечникова РАМН).

В результате трехкратного повторения опытов получены следующие идентичные данные. После 2-часовой обработки интактных клеток *Malassezia* насыщенным раствором *NaCl* количество жизнеспособных особей составило $81.6 \pm 15.6\%$ по сравнению с *контролем 1* (среднеарифметическое $\pm$ среднеквадратичное отклонение). В то же время после аналогичной обработки клеток *Malassezia*, лишенных липидной оболочки, количество живых клеток составило $7.8 \pm 5.4\%$ по сравнению с *контролем 2* ($p < 0.1$). Очевидно, что 7 — 10 кратное снижение устойчивости клеток к действию насыщенного раствора соли в результате обработки *SDS* обусловлено отсутствием липидной оболочки. Дрожжи *Candida albicans*, не проявляющие галотолерантных свойств и не имеющие внешней липидной оболочки, после инкубации в насыщенном растворе соли, без предварительной обработки *SDS*, сохраняли в жизнеспособном состоянии $28.0 \pm 2.8\%$ от исходного количества живых клеток.

Таким образом, данное исследование показало, что у дрожжей рода *Malassezia* внешняя липидная оболочка действительно выполняет функцию галопротектора.

ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ТАКСОНОМИИ ГРИБОВ ГРУППЫ *ASPERGILLUS NIGER*

Хмельницкая И. И., Зеленкова Н. Ф.,
Винокурова Н. Г., Аринбасаров М. У.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
имени Г. К. Скрыбина РАН
Пушино, Московская область

Грибы рода *Aspergillus* Mich, относящиеся к классу Deuteromycetes, по числу таксонов, распространению и биологической активности занимают одно из ведущих мест среди представителей этого класса. Эти грибы являются условно патогенными микроорганизмами и многие из них — активные продуценты микотоксинов. Учитывая их потенциальную опасность

представляется актуальным изучение таксономических связей грибов этого рода. В современной систематике микроорганизмов, в частности микроскопических грибов, в качестве дополнительного таксономического критерия широко используется анализ профилей вторичных метаболитов. По литературным данным видоспецифичным вторичным метаболитом для *A. niger* является ниграгиллин, представляющий собой восстановленный дикетопиперазин (циклический дипептид).

Известна трудность в таксономическом разграничении грибов видов *A. niger* v. *Tieghem* и *A. phoenicis* (Corda) Thom, относящихся к группе *A. niger* и обладающих сходными морфологическими признаками.

В работе использован 31 изолят видов *A. niger* и *A. phoenicis*, принадлежащих к группе *A. niger*, выделенных из почв различных регионов РФ и Украины (Тверская область — 4 изолята Т, Форос — 6 изолятов Ф, Симеиз — 4 изолята С, Алушка — 4 изолята Ал, Пущино — 6 изолятов О и Б, Самарская область — 4 изолята Рс, Томск — 3 изолята ТО). Несмотря на широкое распространение грибов вида *A. niger*, среди выделенных изолятов только два Т7(1) и Т7(2) по комплексу морфологических признаков были отнесены к этому виду.

Анализ экстрактов и препаративное выделение метаболитов осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках силифола УФ-254 (Чехия) в системе хлороформ-метанол-25%-ный раствор NH_4OH (90:10:0, 1). Вещества на пластинках обнаруживали по поглощению в УФ-свете и после опрыскивания реагентами, дающими цветные реакции с функциональными группами. Отдельные зоны элюировали и регистрировали с использованием спектрофотометра.

В восьми из 31 исследованного изолята: Ф31, С75, Б51, О15, О18, О23, ТО1, Ф39 и Ф71 было обнаружено соединение, относящееся к группе триптофансодержащих алкалоидов (метаболит I). Данный метаболит по хроматографической подвижности (R_f 0, 10-0, 15) соответствовал б-циклопиазоновой кислоте, и имел характерный для нее электронный спектр поглощения в УФ-области с максимумами при λ 224, 254, 274 (плечо), 282 и 292 нм.

Метаболиты фенольной природы (группа метаболитов II) зафиксированы у изолятов: Ал136, Ф39, Ф55, Ф65, Рс29 и ТО4.

Только у изолятов Т7(1) и Т7(2) обнаружены соединения, имеющие липидную природу. Основное из них (метаболит III) с R_f 0, 43 в УФ-области имеет только один максимум поглощения при 210 нм.

Помимо функционального анализа методом ТСХ с использованием цветных реакций у выделенных изолятов регистрировались соединения, поглощающие в УФ-области. Для большинства изолятов характерны два основных метаболита: метаболит IV с R_f 0, 46 и метаболит V с R_f 0, 63. Метаболит IV был обнаружен у всех изолятов, кроме Т7(1), Т7(2) и О18; а метаболит V выявлен практически в половине образцов, но не зафиксирован в Т7(1) и Т7(2).

Таким образом, на основании данных ТСХ, функционального анализа метаболитов с применением цветных реакций и поглощения в УФ-области,

изучаемые изоляты *A. niger* и *A. phoenicis*, выделенные из почв различных регионов, были поделены на две группы: в первую группу вошли изоляты Т7(1) и Т7(2), а во вторую — все остальные, что находится в соответствии с их идентификацией по морфологическим признакам.

Анализ хлороформенных экстрактов выполняли также методом ВЭЖХ, позволяющим регистрировать большее количество метаболитов разных групп по сравнению с ТСХ. Сравнительный анализ экстрактов исследуемых изолятов проводили методом ВЭЖХ на обращеннофазном сорбенте Nova Pak C₁₈, 4 мкм (стальная колонка 3, 9 Ч 150 мм) на жидкостном хроматографе, оборудованном УФ-детектором с переменной длиной волны и интегратором. В качестве элюирующей системы использовали смесь метанол-вода- 25%-ный раствор NH₄OH (56:44:0, 036% об), скорость подачи элюента 1 мл/мин, рабочая длина волны 220 нм.

Несмотря на то, что максимумы полос поглощения в УФ-спектрах выделенных методом ТСХ метаболитов находились в широком интервале, рабочая длина волны 220 нм позволила проводить определение этих соединений с достаточно высокой чувствительностью.

При анализе хроматограмм обнаружено, что одну группу представляют изоляты Т7(1) и Т7(2), относящиеся к виду *A. niger*, экстракты которых содержат преимущественно метаболит III с временем удерживания 7. 9 мин. Отличительной особенностью образцов второй группы изолятов, относенных к виду *A. phoenicis*, явилось отсутствие или незначительное содержание этого компонента, с одной стороны, и наличие определяющего метаболита VI с временем выхода 7, 24 мин, с другой стороны.

В свою очередь изоляты вида *A. phoenicis* по набору и соотношению продуцируемых метаболитов могут быть разделены на 5 подгрупп. В первую могут быть отнесены Т10(1) и Т10(2), экстракты которых содержат преимущественно метаболит VI при полном отсутствии б-ЦПК (метаболит I с временем удерживания 3. 24 мин) и фенольных соединений (метаболит II с временем удерживания 1. 68 мин). Вторая подгруппа объединяет 4 изолята, в экстрактах которых отсутствует метаболит V с временем удерживания 2. 0 мин. У изолятов третьей подгруппы не выявлено фенольных метаболитов (7 изолятов). Самая многочисленная четвертая подгруппа (15 изолятов) характеризуется наличием в экстрактах всех тестируемых компонентов. Пятая подгруппа представлена единственным изолятом Т05, качественный состав экстракта которого резко отличается от состава других проб и характеризуется преимущественным содержанием компонента VII с временем удерживания 32. 0 мин.

Таким образом, показано, что результаты хроматографических методов находятся в соответствии с морфологической характеристикой изученных изолятов и, следовательно, могут служить дополнительным критерием при идентификации близких видов *A. niger* и *A. phoenicis*. Кроме того, эти методы позволяют не только фиксировать видовую специфичность изолята, но и обнаруживать разнообразие метаболической активности в пределах одного вида.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХИЩНЫХ ДРОЖЖЕЙ *ARTHROASCUS*

Казарян Е. С., Кондратьева В. И.,
Наумов Г. И.

ГосНИИ Генетика
Москва

Очень ограниченное количество видов дрожжей, относимых к роду *Arthroascus* и таксономически сходному роду *Saccharomycopsis* (входящих в так называемый клад «*Saccharomycopsis*» (Kurtzman, Robnett, 1998), являющихся хищниками. Они способны проникать в клетки аскомицетных и базидиомицетных дрожжей и убивать их (Kreger-van Rij, Veenhuis, 1973; Lachance, Pang, 1997; Lachance et al., 2000). Биология этого феномена только начала изучаться и несомненно заслуживает внимание медицинских микологов и фитопатологов. Хищные дрожжи очевидно могут использоваться как биоконтролирующие микроорганизмы.

Использование ауксотрофных мутантов позволило выяснить особенности жизненного цикла всех трех видов рода *Arthroascus*: *A. javanensis*, *A. schoenii* и *A. fermentans*. Обнаружено, что скрещивание гаплоидных вегетативных клеток у видов *Arthroascus* происходит не на минимальной, а на голодной мальтозной среде. Анализ внутривидовых гибридов показал, что они диплоидны: наблюдали дигенное расщепление контрольных родительских маркеров. У дрожжей *Arthroascus* сосуществуют клетки как в гаплоидном, так и диплоидном состояниях. Эти дрожжи являются гомоталличными гапло-диплонтами.

Изучение межвидовой гибридизации *A. javanensis*, *A. schoenii* и *A. fermentans* показало, что все три вида генетически изолированы (Наумов и др., 1985; 1999). Несмотря на то, что они способны скрещиваться в любой комбинации, их гибриды стерильны с выживаемостью аскоспор 0–6%. Изучение случайной выборки спор показало отсутствие ауксотрофных рекомбинантов и значительное преобладание прототрофных сегрегантов. Данные изучения ДНК–ДНК-реассоциации у видов *Arthroascus* хорошо согласуются с результатами генетического анализа. Внутри видов реассоциация составляет 85–100%, а между видами — 6. 7–41% (Smith et al., 1990; Lee et al., 1994).

Основное внимание мы уделили генетическому сравнению штаммов *A. schoenii* различных географических популяций Европы, Дальне-Восточной Азии, Северной Америки и Гавайских островов. Анализ внутрштаммовых и внутрипопуляционных гибридов показал, что они высокофертильны и имеют нормальные дигенные расщепления контрольных маркеров. Несколько ниже была фертильность межпопуляционных гибридов, однако и здесь имеет место нормальная мейотическая рекомбинация контрольных маркеров. Полученные результаты позволяют считать, что проанализированные штаммы, несмотря на различное географическое происхождение, относятся к одному и тому же биологическому виду *A. schoenii*. Судя по достаточно

высокой фертильности гибридов нет существенной генетической дивергенции между популяциями *A. schoenii*, обитающими в Европе, Дальне-Восточной Азии, Северной Америке и на Гавайских островах. По крайней мере, они не находятся на уровне дивергенции таксономических разновидностей, как это наблюдалось нами у географических популяций дрожжей *Zygofabo-spora* (*Kluyveromyces*) *lactis* и *Saccharomyces paradoxus* (Naumov, Naumova, 2002; Naumov et al., 1993, 1997, 1998).

ОППОРТУНИСТИЧЕСКИЕ МИКРОМИЦЕТЫ АНТРОПОГЕННО- ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ

Киреева Н. А., Бакаева М. Д.,
Галимзянова Н. Ф.

Башкирский Государственный Университет
Уфа

В связи с усиливающимся воздействием человека на природу все большее значение приобретает исследование антропогенных территорий как места обитания живых организмов. Микроскопические грибы городских почв являются не только универсальными деструкторами органического материала таких почв, они могут служить источниками отравлений и развития микозов у человека. Наблюдается рост числа и увеличение степени тяжести заболеваний, вызываемых условно-патогенными грибами. В связи с этим приобретает актуальность изучение изменений, происходящих в комплексе почвенных микромицетов под воздействием различных типов загрязнения почв, представленности условно-патогенных грибов в антропогенно-загрязненных почвах.

В качестве типичных поллютантов нами были выбраны нефть, дизельное топливо, бензин и машинное масло в концентрации от 1% до 20% от веса почвы. В лабораторных и полевых условиях было исследовано влияние нефти и нефтепродуктов на видовой состав почвенных микромицетов. Проводившиеся в течение года наблюдения над обработанными нефтью образцами почвы и соответствующими незагрязненными контрольными образцами выявили различия в видовом составе микроскопических грибов загрязненных и незагрязненных почв. Организмы, занимающие минорные позиции в исходной ненарушенной почве, становились доминирующими в обработанных нефтепродуктами почвах и наоборот доминанты контрольных почв не встречались или редко встречались в нефтезагрязненных образцах. Так из содержащих ксенобиотики почв полностью исчезли представители рода *Trichoderma*. В группу доминирующих видов нефтезагрязненных почв вошли *Aspergillus fumigatus* и *Penicillium funiculosum*, а при наличии в почве моторного масла *A. niger*. Высокая степень загрязнения почв нефтепродукта-

ми значительно сузила группу типичных частых видов, что еще более увеличило в ней долю таких условно-патогенных и токсинообразующих грибов как *A. flavus* и *A. niger*. Неблагоприятным признаком можно считать и общее увеличение доли представителей рода *Aspergillus* в нефтезагрязненной почве по отношению к представителям других грибных семейств.

Загрязнение городской среды нефтепродуктами, таким образом, способно оказывать не только прямое негативное воздействие на здоровье людей путем попадания в организм ядовитых химических соединений, но и опосредованное через увеличение риска заболевания грибными инфекциями.

GROWTH CURVES IN DERMATOPHYTES FUNGUS

**Mendoza M., Alio S. A., Zambrano E. A.,
Diaz E., Cavallera E.**

*Mycology Laboratory and Dermatology Department,
Instituto de Biomedicina,
Central University of Venezuela
Каракас, Венесуэла*

Superficial cutaneous fungal infections caused by dermatophytes, are frequent in clinical practice in dermatology with a high morbidity in our tropical human population. *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* are the species more frequently isolated. We have not found enough studies concerning the biology of their growth curves. We determine the growth curves from 40 strains of dermatophytes: *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Epidermophyton floccosum* using the dry weight and spectrophotometric methods, to estimate the specific growth rate of each dermatophyte and the biomass reached during the incubation. Our study was performed according to the guidelines for filamentous fungi of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, document M38-P, 1998) with small modifications adopted to our protocol. At 192 hours, all the dermatophytes studied showed an active exponential phase curve. The biomass of the specimens of dermatophytes grew constantly and progressively. We observed that *T. rubrum* grew very slowly; who required 105. 96 hours to reach a biomass of 0. 00654 g in contrast to *M. canis*, reached a biomass of 0. 01 g in 69. 30 hours. In our study, we did two growth curves for each strain of dermatophyte, where we could see parallel discrepancies at the latency and deceleration phase of the curve as well as retardation at the beginning of the exponential phase between dermatophytes of the same strain. The method of optical density offered the advantage of using the same inoculum with continuous monitoring in time, and also permitted us to define the different phases of the growth curve more precisely and concisely. These results demonstrate differences in the growth rate curve of the strains studied.

CRYPTOCOCCUS ISOLATION FROM THE EUCALYPTUS SPP. TREE AT THE NATIONAL PARK EL AVILA

**Mendoza M., Diaz E., Farias N., Torres J.,
Bazurto O., Guia J., Alio S. A.**

*Mycology Laboratory, Instituto de Biomedicina
Каракас, Венесуэла*

Cryptococcus neoformans is a worldwide distributed mycoses. It has been classified in 2 varieties and 4 serotypes, *va r. neoformans* (serotype A and D), *var gattii* (serotype B and C). It has been suggested as the natural habitat of *var. neoformans* as, the pigeons and pet birds droppings which causes infection from the inhalation of the contaminated dust. *Var. gattii* occurs in tropical and subtropical climates (Australia, USA, Brazil, Mexico, Spain, Italy, India and Uruguay) and it's environmental niche has been identified in *Eucalyptus* trees. The *Eucalyptus* trees were introduced in Venezuela in 1910, specifically planted and surrounding all the border of the capital at the National Park El Avila. The aim of the present study was to evaluate the most frequent sites crowded oftenly by the population

(Lomas de Viento and Venaos) and search of the presence of *Cryptococcus spp.* in the urban environment trees. **Materials and Methods:** Samples of bark, trunk and leaves were taken from 20 different genus *Eucalyptus spp* trees, and processed with two methods using the flotation method and cultured in Petri capsule dish containing esculin + antibiotic medium and the intraperitoneal inoculation method in NMRI mice. **Results:** From the former method no *Cryptococcus* yeasts were isolated Only mosses, bacterias were isolated from the trunk, leaves, and bark of the *Eucalyptus* trees. From the last method, yeasts were isolated from the bark. This mucoid yeast reacted positive in Urease and Sculin medium. Other tests were performed to define the specie, variety and serotype of this yeast. This finding is the first reported case in our country, which demonstrates the close relationship between *Cryptococcus* yeast and the *Eucalyptus spp* trees.

Key words: *Cryptococcus spp.*, *Eucalyptus spp.*, sculin medium.

ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В ВОЗДУХЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ОТДЕЛЕНИЙ ГНЦ РАМН

Петрова Н. А., Клясова Г. А., Фуньгина Л. П.

*Гематологический научный центр РАМН
Москва*

Целью исследования явилось изучение распространения мицелиальных грибов и особенностей формирования комплексов микромицетов в воздухе гематологического стационара. Исследования состава воздуха регулярно проводили во всех отделениях гематологического центра (в операционных, палатах, душевых комнатах, коридоре, процедурных, кабинетах переливания

крови). Забор проб воздуха осуществляли прибором ПУ-1Б в режиме 250 л/мин. Идентификацию мицелиальных грибов проводили на среде Чапека.

За период с сентября 2000 г. по май 2002 г. было отобрано и проанализировано 342 пробы воздуха. Микромицеты были выявлены в 96% образцов. Всего было выделено 27378 колониеобразующих единиц (КОЕ). Численность микромицетов варьировала в 1 образце от 0 до 1300 КОЕ/м³. При идентификации микроскопических грибов было выявлено 43 вида, относящихся к 18 родам.

Наиболее распространенными были грибы *Penicillium spp.* Обильное выделение представителей этого рода наблюдалось во все периоды исследования и составило 74%. Вторыми по частоте встречаемости были отмечены *Aspergillus spp.* (63%). Темноокрашенные грибы сем. *Dematiaceae* были представлены родами *Cladosporium* (41%), *Botrytis* (6%), *Alterternaria* (3%). Представители класса *Zygomycetes* (*Mucor*, *Rhizopus*) были выявлены только в 1% образцов.

Сезонные изменения проявились в колебании численности наиболее распространенных родов микромицетов. Наибольшее содержание *Aspergillus spp.* и *Penicillium spp.* было выявлено в осенний и зимний периоды, а грибы рода *Cladosporium* преобладали в летнее время.

В воздухе гематологических отделений отмечено разнообразие представителей рода *Aspergillus*. Всего было выделено 11 видов грибов, наиболее распространенными были 5 видов *A. versicolor* (42%), *A. fumigatus* (17%), *A. niger* (18%), *A. ochraceus* (11%) и *A. flavus* (4%).

За этот период грибы рода *Aspergillus* были обнаружены в посевах патологического материала (мокрота, бронхоальвеолярная жидкость, смыв с бронхов) у 15 больных, находящихся на лечении в ГНЦ РАМН. У 11 пациентов (53%) возбудителем явились *A. fumigatus*, у 3-х — *A. niger* (27%) и у 2-х — *A. flavus* (20%). Пик выявления грибов из биосубстратов от больных пришелся также на осенне-зимний период. На основании полученных данных можно предположить возможность инфицирования больных спорами грибов *Aspergillus* из воздуха. Необходимы более детальные исследования, направленные как на поиск наиболее вероятных источников инфицирования, так и на изучение механизмов возникновения инвазивного аспергиллеза.

В 2002 г. дополнительно изучены образцы воздуха в различных палатах («ламинары» — оснащенные 2 НЕРА-фильтрами, «боксы» — на 1 больного, общие палаты на 4-х и более больных), а также в душевых комнатах, прилегающих к палатам и коридоре. При сопоставлении численности микромицетов в воздухе обследуемых палат минимальное содержание их отмечалось в палатах, оснащенных фильтрами с ламинарным потоком воздуха (средняя концентрация спор составила 1 КОЕ/м³). Наибольшая численность микромицетов наблюдалась в воздухе 4-х местных палат: 94 КОЕ/м³ в палатах, расположенных в здании 1990 года постройки и 211 КОЕ/м³ — в здании, которому более 50 лет. Существенных отличий в количественном содержании грибов в воздухе палат и душевых комнат не было выявлено.

В воздухе палат с ламинарной подачей воздуха был обнаружен скудный рост, в равном количестве выявлялись грибы рода *Aspergillus* и *Penicillium*.

Видовой состав микромицетов в воздухе других палат был более разнообразным, встречались представители сем. *Dematiaceae* и класса *Zygomycetes*.

Таким образом, мицелиальные грибы были обнаружены практически во всех образцах воздуха. Типичными для комплекса микромицетов в воздухе гематологического стационара были грибы рода *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*. Колебания численности представителей данных родов носили сезонный характер. Пик выделения грибов рода *Aspergillus* в посевах патологического материала от больных и воздуха пришелся на осенне-зимний период. Минимальное содержание микромицетов отмечено в палатах, оснащенных вентиляционными системами с ламинарным потоком воздуха.

КОЛОНИЗАЦИЯ СЛИЗИСТОЙ ЗЕВА ДРОЖЖЕВЫМИ ГРИБАМИ У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗА

Петрова Н. А., Клясова Г. А., Шарикова О. А.

*Гематологический научный центр РАМН
Москва*

Цель — выявить частоту колонизации слизистой зева дрожжевыми грибами у больных гемобластозами при современных режимах высокодозной химиотерапии в период 2000–2002 гг.

Методы. Первичный посев со слизистой зева осуществляли на плотную среду Сабуро с хлорамфениколом (bio Merieux, Франция). Идентификацию *C. albicans* проводили с использованием селективной среды CHROMagar (Becton Dickinson, США), штаммов *C. non-albicans* и иных дрожжевых грибов — с помощью API 20 C Aux (bio Merieux, Франция).

Результаты и обсуждение. Частота выделения дрожжевых грибов со слизистой зева составила в 2000 г. — 37% (635/1698), в 2001 г. — 40% (555/1375), в 2002 г. — 33% (323/975). Ассоциации грибов (≥ 2 видов) выявлялись в 5, 6–13% исследований. Дрожжевые грибы были представлены родами *Candida*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*. На долю *Candida spp.* пришлось 98–99%. Преобладающими среди *Candida spp.* были штаммы *C. albicans*: в 2000 г. они составили 73%, в 2001–2002 гг. — 70%. Отмечено расширение видового спектра *C. non-albicans*, выявляемого у больных гемобластозами: в 2000 г. было идентифицировано 7 видов, в 2001 — 11, в 2002 гг. — 13 видов. Наиболее распространенными были штаммы *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*. Частота выявления их представлена в таблице.

	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
2000 г. <i>n</i> =64	8 (12, 5%)	18 (28%)	7 (11%)	18 (28%)	10 (16%)
2001 г. <i>n</i> =167	56 (34%)	42 (25%)	18 (11%)	12 (7%)	20 (12%)
2002 г. <i>n</i> =96	15 (16%)	21 (22%)	17 (18%)	4 (4%)	17 (18%)

Необходимо отметить возрастание числа штаммов *C. norvegensis* с 2% (3/167) — в 2001 г. до 12, 5% (12/96) — в 2002 г. Частота выявления *C. lusitaniae* в 2001 г. составила 1, 2% (2/167), в 2002 г. — 2, 1% (2/96). Среди дрожжевых грибов, относящихся к иным родам, чаще выявлялись *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*) — 4/7 — в 2001 г., 5/8 — в 2002 г.

Заключение. Частота колонизации слизистой зева в 2000–2002 гг. составила 33–40%. При культуральном исследовании преобладали грибы рода *Candida*; доминирующими среди них были *C. albicans*, доля которых составила 70%. Отмечено расширение видового спектра дрожжевых грибов, колонизирующих слизистую зева у иммунокомпрометированных больных.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ, К СОВРЕМЕННЫМ ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ

*Петрова Н. А., Клясова Г. А., Толкачева Т. В.,
Сперанская Л. Л., Шарикова О. А.*
Гематологический научный центр РАМН
Москва

Определение чувствительности выделенных штаммов дрожжевых грибов к противогрибковым препаратам является необходимой составляющей каждой лаборатории клинической микробиологии в современных условиях. В Гематологическом научном центре в течение 2001 — 2002 гг. была изучена чувствительность 264 штаммов дрожжевых грибов, выделенных из патологического материала у 180 пациентов. Дрожжевые грибы были выделены из крови (16), удаленного катетера (9), бронхоальвеолярной жидкости (45), мокроты (29), мочи (65), зева (31), кала (53), раневого отделяемого (10), биоптатов (5), гайморовых пазух носа (1). Первичное тестирование чувствительности было проведено у 249 штаммов, у 15 штаммов — повторное. Результаты повторного определения чувствительности совпадали с первоначальными данными.

В 95% случаев (в 237 из 249) тестируемыми штаммами были дрожжевые грибы рода *Candida* (107 — *C. albicans*, 13 — *C. parapsilosis*, 20 — *C. kefyr*, 9 — *C. tropicalis*, 5 — *C. famata*, 3 — *C. guilliermondii*, 1 — *C. rugosa*, 1 — *C. magnolia*, 48 — *C. glabrata*, 25 — *C. krusei*, 5 — *C. norvegensis*). Кроме того, чувствительность была изучена у *Geotrichum capitatum* (1), *Trichosporon* (*T. asahii* — 7, *T. mucoides* — 1), *Rhodotorula mucilaginosa* (2), *Saccharomyces cerevisiae* (1).

Чувствительность выделенных штаммов дрожжевых грибов определяли с помощью тест-системы «Fungitest» (Bio Rad, США), включающей пороговые концентрации 6 антимикотиков: амфотерицина В (АВ), флуконазола

(Flu), итраконазола (Itr), миконазола (Mcz), кетоконазола (Ket), 5-флуцитозина (5 Fc). Проанализирована чувствительность штаммов дрожжевых грибов при концентрации амфотерицина В — 2 мкг/мл, флуконазола — 8 мкг/мл, итраконазола, миконазола и кетоконазола — 0, 5 мкг/мл, 5 — флуцитозина — 2 мкг/мл. Штаммы, проявляющие промежуточную чувствительность, не включены в анализ.

Чувствительность 159 штаммов *Candida* (исключение *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. glabrata*) была следующей: к АВ — 97, 5%, к Flu — 87, 5%, к Itr — 66, 7%, к Mcz — 79, 3%, к Ket — 79, 9%, к 5 Fc — 92, 5%. Профиль чувствительности *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. glabrata* (n=78) составил 93, 6% к АВ, 48, 7% к Itr. Среди штаммов *C. glabrata* чувствительность к флуконазолу проявили 58,3% (28/48). Активность антимикотиков к дрожжевым грибам, принадлежащим к родам *Geotrichum*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* и *Rhodotorula* (n=12), была следующей: АВ — 41,7%, Flu — 58,3%, Itr — 33,3%, Mcz — 75%, Ket — 41,7%, 5 Fc — 41,7%.

Сопоставление результатов чувствительности к антимикотикам штаммов дрожжевых грибов *Candida spp.* в 2001 г. и 2002 г. (исключение *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. glabrata*) представлено в таблице.

За анализируемый период чувствительность штаммов дрожжевых грибов осталась неизменной. Подобное можно объяснить как ограниченным использованием противогрибковых препаратов для профилактики, так и адекватное назначение антимикотиков при инвазивных микозах у иммунокомпрометированных больных.

ЧАСТОТА ВЫДЕЛЕНИЯ И ВИДОВОЙ СПЕКТР ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ В КИШЕЧНИКЕ У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

Толкачева Т. В., Петрова Н. А., Клясова Г. А.

Гематологический научный центр РАМН
Москва

Целью исследования явилось определение количественного содержания, спектра и доминирующих видов дрожжевых грибов, колонизирующих кишечник у больных гемобластозами.

Методы. Для выделения грибов из толстого кишечника использовали стандартные методы микробиологического исследования. Чистую дрожжевую культуру получали на агаре Сабуро с хлорамфениколом (*bio Merieux* Франция). Первичную идентификацию дрожжевых грибов (*C. albicans* и *C. non-albicans*) проводили на селективной среде CHROMagar (Becton Dickinson США). Для видового типирования штаммов *C. non-albicans* использовали тест систему *API 20 AUX* (*bio Merieux* Франция).

Результаты. В течение трех лет (2000 — 2002 гг.) проведено 756 исследований количественного и качественного состава микрофлоры толстого кишечника у 687 больных гемобластозами. У всех пациентов был выявлен дисбактериоз кишечника разной степени выраженности. В 419 (55, 4%) случаях в кишечнике были обнаружены дрожжевые грибы. Отмечено повышение частоты выявления дрожжевых грибов в кишечнике с 53% в 2000 г. до 65% и 63% в 2001 и 2002 гг., соответственно. В 186 случаях (44, 4%) содержание дрожжевых грибов в кишечнике у больных не превышало 10^3 КОЕ/г, а диагностически значимое количество более 10^3 КОЕ/г и достигающее уровня 10^7 КОЕ / г было выявлено в 233 (55, 4%) исследованиях.

Проведение видовой идентификации показало лидирующее положение *C. albicans* в сравнении с *C. non-albicans*, частота выявления которых составила 52, 5% против 47, 5%. Колонизация кишечника грибами *C. albicans* была зарегистрирована в 46, 8% исследований, а обнаружение диагностически значимых количеств в 53, 2%. Колонизация кишечника *C. non-albicans* была выявлена в 41, 7% исследований, а диагностически значимое их количество в 58, 3%. Ассоциации из двух и более видов грибов обнаружены в 77 исследованиях (38, 7%), среди них ассоциации, состоящие из двух видов *C. non-albicans*, составили 15% ($n=30$). Причем, в 2000г. подобные ассоциации были только в 6% исследований, а 2001 и 2002 гг. частота их выявления увеличилась в три раза, составив 17, 6 и 18, 4% соответственно.

Наиболее распространенными среди грибов *C. non-albicans* в течение всего периода исследования были *C. krusei* — 79 штаммов из 199 (40%). Второе место по частоте выявления занимает *C. glabrata* — 55 штаммов (28%) с незначительной динамикой увеличения по годам: с 26% в 2000г. до 31, 6% в 2002 г. На третьем месте находится

C. kefyr — 31 штамм (15, 6%) и далее *C. parapsilosis* — 16 штаммов (8%). Наряду с выше перечисленными, наблюдается расширение видового спектра дрожжевых грибов. В 2000 г. были впервые выделены из кишечника *C. rugosa* и *Rhodotorula spp.*, в 2001 г. — *C. norvegensis*, *C. inconspicua*, *C. magnolia*, *C. lusitaniae*, в 2002г. обнаружены *Saccharomyces cerevisiae*. В 2002 г частота встречаемости этих видов (*C. norvegensis*, *C. famata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa* и *Saccharomyces*) составила 15, 8%. Спектр дрожжевых грибов, колонизирующих кишечник у больных гемобластозами был представлен 15 видами.

Закключение. Частота выделения дрожжевых грибов из кишечника иммуноскомпромитированных больных сохраняется высокой, достигая в пос-

ледние два года 65–63%. Соотношение частоты выявления штаммов *C. albicans* и *C. non-albicans* составляет 52, 5% против 47, 5%. Среди штаммов *C. non-albicans* доминируют *C. krusei* (40%), *C. glabrata* (28%) и *C. kefyr* (15, 6%). Отмечено увеличение частоты встречаемости ассоциаций из двух видов *C. non-albicans* и расширение видового спектра дрожжевых грибов, колонизирующих кишечник больных гемобластозами.

ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДНОГО СОСТАВА *ABSIDIA CORYMBIFERA*

Конова И. В., Батраков С. Г.,
Галанина Л. А.

Институт микробиологии РАН
Москва

Исследован состав липидов, синтезированных *de novo* *A. corymbifera* F-965 — представителем муковых зигомицетов из рода *Absidia*. Установлено, что состав жирных кислот клеточных липидов *A. corymbifera* типичен для представителей семейства *Mucoraceae*, при этом отмечено высокое содержание (до 24%) γ -линоленовой кислоты в сумме кислот. Кислоты C-20 присутствуют как минорные фракции, содержание арахидоновой кислоты не превышало 2, 4%.

При ТСХ-анализе в составе липидных классов были обнаружены необычные фракции, идентификация которых с использованием квалифицированного молекулярно-структурного анализа выявила кроме фосфатидилэтаноламина (ФЭ), присутствие новых фосфолипидов: *N*-ацетилфосфатидилэтаноламин (АФЭ) и *N*-этоксикарбонилфосфатидилэтаноламин (ЭКФЭ) [Батраков С. Г. и др., 2001]. Суммарное содержание ФЭ, АФЭ и ЭКФЭ составляет более 50% всех фосфолипидов. При этом отмечено низкое содержание холинсодержащего фосфолипида, что нетипично для грибов.

Среди нейтральных липидов стерина природы кроме эргостерина и эфиров стерина выявлен необычный компонент, исследование молекулярной структуры которого показало, что этот липид является эндоперекисью эргостерина (Батраков С. Г. и др.). Вопрос биологической функции эндоперекисей стерина остается открытым, однако известно, что аналогичная эндоперекись эргостерина была обнаружена у патогенного гриба *Sporotrix schenckii* (Burdon da Craca S. D. et. al., 1997). Возможно, это соединение может рассматриваться как маркер патогенности гриба, факты патогенности вида *A. corimbifera* описаны в литературе.

Вышесказанное не позволяет рассматривать перспективу использования *A. corimbifera* F-965 как продуцента γ -линоленовой кислоты, составляющей четверть суммы всех жирных кислот гриба.

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ГРИБОВ РОДА *PENICILLIUM*, ВЫДЕЛЕННЫЕ С ОРБИТАЛЬНОЙ СТАНЦИИ «МИР»

Козловский А. Г., Желифонова В. П., Антипова Т. В.,
Адашин В. М., Новикова Н. Д., Дешевая Е. А., Грефе У.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
имени Г. К. Скрыбина РАН
Пушино

Государственный научный центр РФ —
Институт медико-биологических проблем РАН
Москва

Институт по изучению природных продуктов имени Х. Кнолля
Йена, Германия

В настоящее время поиск новых продуцентов биологически активных соединений ведется среди грибов, выделяемых из экстремальных мест обитания, так как именно у них с большей вероятностью можно ожидать синтез новых вторичных метаболитов, новых потенциальных биологически активных соединений, которые могут помогать продуценту выживать и адаптироваться к данным условиям. Очевидно, что такая уникальная экологическая система как станция «Мир», которая в течение многих лет подвергалась непрерывному воздействию как факторов искусственной техногенной среды, так и факторов космического полета, может рассматриваться как уникальная экосистема. При длительной эксплуатации ОКС «Мир» были выявлены основные закономерности формирования экосистем микроорганизмов на ОКС, а также особенности эволюции микрофлоры в этих условиях и факторы, влияющие на эти процессы. Было установлено, что отдельные представители микрофлоры обладают способностью к резидентному заселению среды обитания космического объекта. По частоте обнаружения преобладали два вида грибов рода *Penicillium* — *P. chrysogenum* и *P. expansum*.

Эти виды известны как продуценты вторичных метаболитов различного строения, обладающие широким спектром биологической активности.

В работе исследовано 5 штаммов *P. chrysogenum* и 6 штаммов *P. expansum*, выделенных в орбитальных отсеках ОКС «Мир» в 1997-1998 гг. При изучении синтеза вторичных метаболитов проводили как поверхностное культивирование штаммов на агаризованной среде Чапека, так и глубинное на среде Абе. Метаболиты извлекали из фильтрата культуральной жидкости экстракцией хлороформом, а из агаризованной среды и колоний грибов смесью хлороформ: метанол (1:1) при щелочных и кислых значениях pH. Анализ метаболитов осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Соединения в индивидуальном состоянии получали методом препаративной ТСХ. Установление строения и идентификацию метаболитов проводили сохроматографией со стандартными образцами, УФ-спектрофотометрией, масс-спектрометрией и ЯМР-спектроскопией.

При изучении спектра низкомолекулярных азотсодержащих вторичных метаболитов у этих культур было показано, что все они синтезируют мета-

болиты алкалоидной природы, как известные для грибов этих видов — рокефортин, 3, 12-дигидророкефортин, мелеагрин, виридикатин, виридикатол, так и новые -изоругулозувин, ругулозувин Б, N-ацетилтриптамин и «желтый» метаболит, строение которого устанавливается.

По структуре синтезируемых метаболитов штаммы делятся на две группы. Самая многочисленная, куда входят все штаммы вида *P. chrysogenum* и два штамма *P. expansum* отличается продукцией метаболитов рокефортиновой группы, характерных для этих видов. В другую группу входят четыре штамма *P. expansum*, синтезирующие ди-кетопиперазиновые алкалоиды: изоругулозувин и ругулозувин Б, впервые обнаруженные у данного вида. Один из этих штаммов, кроме того, синтезировал хинолиновые алкалоиды (виридикатин и виридикатол), известные для данного вида. Сравнение этих данных с результатами кластерного анализа ДНК полиморфизма методом ПЦР со случайно подобранным праймером показало корреляцию: у резидентных штаммов, относящихся к одному клону, наблюдалась идентичность спектра метаболитов. Следует отметить, что штаммы-резиденты *P. chrysogenum* 1-6 и *P. expansum* 2-7 начали синтезировать общие метаболиты с родственными штаммами только после длительного хранения и пересевов. При первоначальном скрининге эти штаммы продуцировали только «желтый» метаболит. Аналогичная ситуация наблюдалась с транзитным штаммом *P. chrysogenum* 1-5. Этот штамм, продуцирующий при первичном скрининге только «желтый» метаболит, после хранения и пересевов начал синтезировать только алкалоиды группы рокефортина. Синтез «желтого» метаболита возобновился только при культивировании этих штаммов на среде с цинком (1 мг/л). Следует отметить, что при повышении концентрации ионов цинка в среде до 3 мг/л синтез «желтого» метаболита увеличился в 10 раз и составил 100 мг/л. При изучении динамики роста и синтеза «желтого метаболита» при глубинном культивировании штамма *P. expansum* 2-7 установлено, что динамика накопления «желтого метаболита» вписывается в идиофазную кинетику синтеза вторичных метаболитов микроорганизмами.

ГРИБЫ КАК ЭЛЕМЕНТ МИКРОФЛОРЫ АСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ

**Крутиков С. Н., Криворутченко Ю. Л., Куница В. Н.,
Крутикова М. С., Кирсанова М. А., Постникова О. Н.**

Крымский государственный медицинский университет,
кафедра внутренних болезней, кафедра микробиологии
Симферополь

Спонтанный перитонит осложняет течение асцита примерно у 8% больных с циррозом печени, особенно часто при тяжелом декомпенсированном течении. Считается, что инфицирование происходит гематогенным путем и в

90% случаев вызвано одним возбудителем, обычно кишечной группы. Проникновению микробов в кровь способствует нарушение проницаемости барьера кишечной стенки, имеющее место при циррозе. Бактерии обнаруживаются в брыжеечных лимфатических узлах. Защитные механизмы при циррозе печени нарушены, микробицидная активность асцитической жидкости (АЖ) снижена, а также угнетена функция ретикулоэндотелиальной системы. АЖ становится благоприятной средой для роста микроорганизмов, дефицит опсонинов нарушает нормальный фагоцитоз. Опсоническая активность АЖ прямо пропорциональна количеству белка, поэтому спонтанный микробный перитонит чаще возникает при концентрации белка менее 1г%. Если количество нейтрофилов не превышает 250 клеток в кубическом мм, тогда, как правило, в посеве из АЖ обнаруживают рост бактерий. Принято считать, что число бактерий в АЖ невелико. Чаще всего выявляют *E. coli*, или стрептококки группы D, реже — менингококк, *Campylobacter fetus* и бактерии группы *Pasteurella*. Анаэробы выявляются крайне редко. При угнетении функции иммунной системы могут обнаруживаться условно патогенные микроорганизмы. Посев крови выявляет рост микробов в 80% случаев.

По данным ВОЗ, микозы в той или иной форме диагностируются у каждого пятого жителя планеты. Причем грибковые заболевания проявляются не только различными местными поражениями кожи, ногтей, но также поражением слизистых оболочек пищевого канала, урогенитального тракта и внутренних органов. Поэтому изучение грибковой флоры асцитической жидкости является актуальной проблемой на сегодняшний день.

Мы провели лабораторное исследование 37 больных с циррозом печени. При этом у всех больных АЖ была исследована микроскопически. У части больных проводили ее посев на различные питательные среды.

При исследовании мазков АЖ у всех больных были обнаружены различные морфологические формы, присущие бактериям и грибам разных видов. Среди них были спорангии, характерные для некоторых представителей семейства *Actinomycetaceae*, макроконидии, характерные для грибов рода *Trichophyton*, споры различных размеров и формы, мицелий, как истинный, так и ложный.

Только у 4-х больных при посеве АЖ на питательные среды удалось получить рост грибов в культуре. Причем, у одной больной трижды проводился парацентез, посев и микроскопия мазков АЖ. При микроскопии у этой больной выявлялся истинный мицелий. При посеве выделенная из АЖ микрофлора его не образовывала. Она представляла собой бактериально-грибковый микст, включавший частично кислотоустойчивые бактерии (окраска по Цилю-Нильсену), по-видимому, относящиеся к роду *Nocardia*. В микст также входили грибы 2-х типов: представители рода *Candida*, образующие псевдомицелий из овальных клеток с выраженной стенкой средних размеров, и овальные дрожжеподобные клетки с толстой слизистой капсулой, образующие коричневые колонии на модифицированной среде Staiba, что соответствует характеристикам *Cryptococcus neoformans*.

Кроме того, в АЖ больных циррозом печени обнаруживались прорастающие макроконидии грушевидной формы и споры, формирующие септированный мицелий, что, несомненно, подтверждает рост и развитие грибов в организме больных.

Суммируя данные, полученные при микроскопии и посевах на питательные среды АЖ, можно предположить, что в организме больных циррозом печени происходит развитие дрожжевых грибов и трихофитонов, а также бактерий, принадлежащих к семейству *Actinomycetaceae*, в частности ноккардий. Причем, комбинации указанных форм микроорганизмов могут быть различными.

Таким образом, выявление различных грибов в асцитической жидкости у всех изученных нами больных свидетельствует об участии этих микроорганизмов в развитии патологического процесса в брюшной полости и прогрессировании цирроза печени.

УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ СПОСОБНЫЕ К РОСТУ В АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

Лаврентьев Р. Б., Кураков А. В.

*Международный биотехнологический центр МГУ имени М. В. Ломоносова,
факультет почвоведения,
кафедра биологии почв МГУ имени М. В. Ломоносова
Москва*

Многие патогенные и условно-патогенные грибы, для развития внутри организма человека, особенно, в интенсивно разрушающихся тканях (при их некрозе), по-видимому, должны быть адаптированы к условиям недостатка кислорода. Известно, что к анаэробному росту способны дрожжевые грибы, хитридиомикеты, обитающие в кишечном тракте травоядных животных и крайне ограничены сведения о таковом для мицелиальных грибов. Практически все условно-патогенные микромицеты широко распространены в почвах, разлагающихся в них органических остатках, на растениях.

В связи с этим в объектах окружающей среды, главным образом, в почвах изучали таксономическое разнообразие микроскопических грибов, способных к росту в анаэробных условиях, и провели сопоставление выявленной группировки микромицетов с известными условно-патогенными видами грибов.

Для выделения мицелиальных грибов использовали известный в бактериологии метод Хангейта, введя в него ряд модификаций, которые позволяли изолировать из почв чистые культуры микромицетов. Инкубацию проводили на матрасах с твердой средой, в состав которой введены микроэлементы, дрожжевой экстракт и витамины. Растворенный кислород удаляли из среды путем кипячения. Атмосфера воздуха в матрасе замещается на азот, предварительно очищенный от следов кислорода при пропускании через

колонку Хангейта с раскаленными медными стружками. В среду для подавления роста бактерий добавляли антибиотики: стрептомицин и хлорамфеникол (в более высоких концентрациях по сравнению с посевами в аэробных условиях). Для инокуляции матрасов использовали мелкозем и в некоторых случаях водно-почвенные разведения. Срок инкубации и температура взяты оптимальными для грибов и составляли 7-14 дней при температуре 25-27°C.

Объектами исследования служили почвы разных типов: дерново-подзолистая почва из-под ельника кисличника, дерново-подзолистая почва из-под пашни, темно-серая лесная почва, чернозем выщелоченный и черноземно-лугово-солончаковая, дерново-аллювиальная почва, аллювиально-луговая пойменная почва, низинно-торфяная почва, мхи разной степени разложения и торф с верхового болота.

Проведенный анализ состава микроскопических грибов, выделенных в анаэробных условиях, показал, что в эту группу входят *Mucor racemosus*, *M. hiemalis*, *Trichoderma harzianum*, *T. aureoviride*, *T. atroviride*, *Trichoderma* sp., *Rhizopus oryzae*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Mortierella* sp., *Gliocladium penicilloides*, *Zygorhynchus moelleri*, *Z. heterogamus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Absidia* sp., *Humicola grisea*. Если для мукоровых и фузариев способность к анаэробному росту отмечалась ранее, то для видов *Trichoderma aureoviride*, *T. atroviride*, *Mortierella* sp., *Gliocladium penicilloides*, *Zygorhynchus moelleri*, *Paecilomyces lilacinus*, *Humicola grisea*, *Absidia* sp. это показано впервые.

Все эти грибы являются факультативно-анаэробным организмами, так как развиваются в аэробных и анаэробных условиях.

Наиболее высокая численность и разнообразие грибов, способных развиваться в анаэробных условиях, отмечены в гидроморфных почвах (пойменных, болотных, луговых) и почвах с выраженной агрегатным строением, в черноземах.

Установлена почти постоянная встречаемость во всех изученных почвах представителей факультативно-анаэробных грибов родов *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, однако в черноземных почвах преобладали фузарии, в серых лесных и дерново-подзолистых почвах возрастала представленность и разнообразие мукоровых, в болотных почвах и болотах — доминировали среди этих грибов различные виды триходермы. Некоторые отличия в составе этой группировки в разных типах почв были связаны также с грибами *Gliocladium penicilloides*, *Humicola grisea*, *Paecilomyces lilacinus*, которые выделяются из почв при анаэробной инкубации посевов реже.

Анализ приведенного списка грибов показал, что способностью к росту в анаэробных условиях обладают такие известные условно-патогенные грибы, как *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor racemosus*, *M. hiemalis*, *Mortierella*. В качестве оппортунистических видов рассматриваются также грибы рода *Trichoderma* (*T. harzianum*), *Gliocladium penicilloides* (Саттон и др., 2001).

Определение радиальной скорости роста у данных грибов свидетельствует об их адаптации к анаэробнобиозу: у большинства она снижалась в ана-

эробных условиях только в 1, 5–2 раза, и у некоторых оставалась такой же (у одного штамма даже несколько возрастала).

Следует подчеркнуть, что накопление биомассы в анаэробных условиях, особенно при низких концентрациях глюкозы было намного ниже, чем в аэробных условиях. Так, биомасса гриба *Fusarium oxysporum* при росте в жидкой среде с нитратом в анаэробных условиях на порядок (в 20 раз) ниже по сравнению с аэробными, а радиальная скорость роста в аэробных и анаэробных условиях различается гораздо менее значительно (максимум в 1, 5–2 раза, а часто не различается или даже выше в анаэробных условиях, в частности у некоторых фузариев).

Радиальная скорость роста у большинства мукоровых и триходермы была ниже на нитратах, чем на аммонии. У многих фузариев, глиокладиума и хумиколы не менялась в зависимости от источника азота, у отдельных видов, таких как, *F. solani*, была выше на нитрате.

Изученные грибы можно разделить на две группы по характеру изменения радиальной скорости роста в зависимости от концентрации глюкозы в среде. В первую группу можно отнести представителей родов *Trichoderma*, *Mucor*, *Zygorhynchus*, у которых при уменьшении концентрации глюкозы радиальная скорость падает (причем практически в равной степени в аэробных и анаэробных условиях). У грибов из второй группы (*Fusarium*, *Gliocladium*, *Humicola*) она не изменялась при уменьшении концентрации глюкозы в среде вплоть до минимальной концентрации (0, 001%) как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Среди продуктов анаэробного метаболизма у них установлены этанол и ацетат (т. е. все они осуществляют субстратное фосфорилирование), большинство видов (за исключением мукоровых) продуцировали закись азота на средах с нитритом, а фузарии и на — нитратах.

Все они представляли факультативных анаэробов, способных к брожению на глюкозо-минеральной среде с аммонийным и аминным (пептон) азотом, а ряд из них, такие как фузарии, триходермы и на нитратах/нитритах. В условиях аноксии грибы родов *Fusarium*, *Trichoderma* помимо двуокиси углерода, этанола, ацетата и трехуглеродного спирта образовывали и закись азота.

ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИГЕНОВ СОССИДИОИДЕС IMMITIS ПОСЛЕ ИХ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ

Лесовой В. С., Липницкий А. В.

Научно-исследовательский противочумный институт
Волгоград

Кокцидиомикоз — особо опасная инфекция, вызываемая почвенным грибом *S. immitis*. Наиболее надежным методом диагностики болезни является выделение чистой культуры возбудителя, однако эта процедура

весьма трудоемка и не всегда доступна. Поэтому иммунологические методы играют существенную роль в идентификации гриба и выявлении антител в организме больного. С этой целью чаще всего используют корпускулярные антигены (взвесь клеток) или фильтраты гриба. Для обнаружения специфических антител у больных применяют иммуноферментный анализ, реакции связывания комплемента, агглютинации частиц латекса и некоторые другие методы.

Ранее нами из штаммов *C. immitis* были получены антигенные препараты на основе артроспор с примесью фрагментов мицелия, обеззараженных различными способами (формалин, ацетон, автоклавирование), и водных экстрактов плотной культуральной среды, на которой выращивали гриб в мицелиальной фазе (осаждение с помощью ацетона, ацетона и мертиолата, фильтрование через мембранные фильтры). Все препараты лиофильно высушивали и хранили при 4 °С. Исходные образцы антигенов в концентрации 10 мг/мл образовывали зоны преципитата в реакции иммунодиффузии в агаре (РИД) с кроличьими антикокцидиоидными сыворотками, разведенными до 1:16 — 1:32.

В опытах по изучению серологической активности антигенов кокцидиоидного гриба после их 20-25 летнего хранения в названных условиях использовали 89 препаратов из 24 штаммов кокцидиоидного гриба, отличающихся между собой по вирулентности, интенсивности спорообразования и способности конверсии в сферулы. Сыворотки против *C. immitis* получали путем иммунизации животных (козы, кролики) артроспорами штамма *C. immitis* 36-S (Сильвейра).

Анализ данных, полученных в РИД с козьей антисывороткой, свидетельствует о том, что наибольшую активность сохраняли корпускулярные антигены (клетки гриба), инаktivированные различными способами. Активность водных экстрактов сохранялась лишь при обеззараживании их путем фильтрации и при ее сочетании с последующим осаждением ацетоном.

В дальнейшем, антигены, положительно реагирующие с козьей антисывороткой (44 образца), были испытаны в РИД с кроличьими антисыворотками. Из них лишь 28 дали положительные результаты, причем 16 (57, 2%) приходится на корпускулярные и 12 (42, 8%) — на антигены, представляющие собой лиофильно высушенные водные экстракты. Следует отметить, что потеря активности в основном приходилась на антигены, обеззараженные автоклавированием.

На следующем этапе 16 образцов антигенов, положительно реагировавших в РИД как с козьей, так и с кроличьими антисыворотками, были исследованы с различными разведениями козьей антикокцидиоидной сывороткой. При этом было показано, что активность антигенов, как правило, не проявлялась с разведениями сывороток выше, чем 1:4, т. е. по сравнению с исходными образцами отмечено ее снижение. По-видимому, в процессе длительного хранения антигенных препаратов происходила деградация наименее устойчивых к действию факторов внешней среды белковых компонентов антигенов. Тем не менее, столь длительное (20-25 лет) сохранение определенной активности антигенных препаратов *C. immitis* подтверждает

полученные нами ранее данные о высокой устойчивости полисахаридного компонента гриба, который является важным группоспецифическим антигеном, перспективным для создания иммунологических тест-систем.

ОСОБЕННОСТИ ЭТИОЛОГИИ ГРИБКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ И ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ВЫЯВЛЕННЫХ ГРИБКОВЫХ ПАТОГЕНОВ К ФЛЮКОНАЗОЛУ

**Макарова Н. Ю., Кравченко А. В.,
Юрин О. Г., Покровский В. В.**

*Академическая группа под руководством Покровского В. В.
Федеральный научно-методический центр МЗ РФ
по профилактике и борьбе со СПИД
Москва*

Применение флюконазола в практике этиотропной терапии грибковых заболеваний позволило быстро и эффективно излечивать грибковые заболевания любой локализации у больных ВИЧ-инфекцией. Однако в последние несколько лет в мире стали появляться сообщения, свидетельствующие о негативных последствиях применения этого препарата, которые связаны с возникновением резистентности у традиционного возбудителя грибковых заболеваний *C. albicans* и увеличении доли *non-albicans* видов, в том числе генетически устойчивых к действию флюконазола, в этиологии грибковых заболеваний. Кроме того, некоторые исследователи указывают на возможность внутрибольничной передачи устойчивых к флюконазолу грибковых патогенов у больных ВИЧ-инфекцией.

В связи с вышеизложенным целью наших исследований явилось определение особенностей этиологии и лекарственной устойчивости возбудителей грибковых заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией для коррекции лекарственной терапии и профилактики внутрибольничного распространения условно-патогенных грибов в специализированных стационарах для данной категории больных.

Материалы и методы. Предметом исследования явились 577 штаммов грибковых патогенов, выделенных из микотических очагов от 432 больных ВИЧ-инфекцией с первичными и рецидивирующими формами грибковых заболеваний в период с 1991 по 2000 гг.. Микроскопия отделяемого из очагов поражений, *APY-20 C-AUX* использованы для идентификации грибковых патогенов.

Для исследования устойчивости выделенных штаммов возбудителей к флюконазолу применен метод микроразведений в соответствии с NCCLS-27a протоколом.

Проведено сравнение относительных рисков в изучении связи между применением флюконазола, длительной (более 7 дней) госпитализацией,

этиологией грибковых поражений и лекарственной устойчивостью *C. albicans* у больных с первичным и рецидивирующим кандидозом.

Результаты и обсуждение. 64% грибковых заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией было обусловлено монокультурами *C. albicans*. Доля ассоциаций *C. albicans* с другими видами грибковых патогенов в этиологической структуре составила 33. 0%. Выявлены единичные случаи заболеваний, обусловленных грибами *non-albicans* видов.

Устойчивость *in vitro* *C. albicans* к флюконазолу составила 11. 0%. Устойчивость *in vitro* грибов *non-albicans* видов более чем в 10 раз превышала таковую у *C. albicans*. Относительный риск участия в этиологии грибковых поражений *non-albicans* видов был в 4 раза больше у больных с рецидивирующим кандидозом, т. е получавших флюконазол и в 7. 3 раза — у больных, получавших флюконазол и имевших длительные госпитализации, по сравнению с больными не получавшими флюконазол и ранее не находившихся в стационаре.

Относительный риск участия резистентных к флюконазолу *C. albicans* в этиологии грибковых поражений у больных ВИЧ-инфекцией увеличивался в 5 раз у больных, получавших флюконазол и в 7. 7 раза — у больных, получавших флюконазол и имевших длительные госпитализации, по сравнению с группой больных не получавших флюконазол и ранее не пребывавших в стационаре.

Таким образом, этиотропная терапия флюконазолом способствует изменению этиологии микотических заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией, формированию резистентности у штаммов *C. albicans* и вовлечению в этиологию *non-albicans* возбудителей. Длительная госпитализация больных, по всей вероятности, создает условия для трансмиссии устойчивых к флюконазолу грибковых патогенов и определяет дополнительную вероятность их вовлечения в этиологию микозов у больных ВИЧ-инфекцией.

В комплексе мероприятий, направленных на снижение доли резистентных к флюконазолу грибковых патогенов в этиологии микозов у больных ВИЧ-инфекцией основными являются мониторинг этиологии и лекарственной устойчивости возбудителей микозов и уменьшение сроков госпитализации больных.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ, ПОВРЕЖДАЮЩИХ ПРОИЗВЕДЕНИЯ ИСКУССТВА

Митковская Т. И., Коваль Э. З.

*Национальный научно-исследовательский реставрационный центр Украины,
Киев, Украина*

Прогрессирующее увеличение частоты регистрации инвазивных микозов, вызываемых условно-патогенными грибами, обязывает обращать более тщательное внимание на обстоятельства, при которых происходит инфицирование, в том числе и на возможные его источники.

Анализ результатов многолетних микологических обследований музейных зданий и хранящихся в них коллекций, а также памятников архитектуры и культовых сооружений Украины позволяет сделать вывод о значительной контаминации их микромицетами. Из выявленных более 100 видов микромицетов почти 35% по критерию «уровня биологической опасности» (BSL) относится ко 2^{ой} группе потенциальных возбудителей глубоких и оппортунистических микозов.

Произведения масляной и темперной (иконы) живописи, акварели и пастели, графика, экспонаты из кожи, дерева, тканей, археологическая керамика чаще всего колонизировались такими условно-патогенными микромицетами: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Mucor plumbeus*, *Mortierella alpina*, *Penicillium citrinum*, *P. variable*, *Trichoderma viride*. Эти же виды доминировали на настенной живописи и внутренних поверхностях (стенах, потолке, оконных проемах) музейных и церковных зданий. Особенно тщательно исследовались предметы, которые после экспонирования находились в фондохранилищах в течение многих десятилетий и подлежали реставрации. С целью установления максимально возможного инфицирования и учета жизнеспособности спор на произведениях искусства XIV-XIX столетий при выделении грибов варьировали условия опыта по влажности, температурах, составу сред и срокам культивирования. Субстратная специализация проявлялась чаще всего на уровне штамма, но четко разграничивались моно- и полибиотрофы. Специфичность колонизации зависела от многих неустановленных факторов, но вполне объяснима проявлением физиологических свойств, особенно отношением к влаге, как субстратной, так и воздуха, а также к температуре, что четко прослеживалось на труднодоступных неростовых или лимитированных по основным трофическим компонентам субстратах (керамика, металл и т. п.). Отмечены штаммы, которые в опыте предпочтительно колонизировали соответствующие субстраты, не распространяясь на питательную среду. Выполненные исследования свидетельствуют о необходимости проведения соответствующих санитарных мероприятий как в музеях, так и в реставрационных мастерских, поскольку произведения искусства также могут являться резервуаром сохранения условно-патогенных грибов.

КИЛЛЕРНЫЕ ТОКСИНЫ ДРОЖЖЕЙ РОДА MALASSEZIA

Ожован И. М., Арзуманян В. Г.

*Институт Вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова
105064, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а*

Дрожжи рода *Malassezia* являются компонентом облигатно комменсальной микрофлоры кожи Человека и встречаются у 70% взрослых людей. [Арзуманян В. Г., 1999]. Термином «киллерная активность» обозначают способность дрожжей вырабатывать вещества, подавляющие рост, в основном, осо-

бей своего вида и рода, реже — других родов [Golubev W. I., 1998]. Широко известное у многих родов дрожжей явление образования киллерных токсинов до сих пор не было показано у *Malassezia spp.*

При работе с группой здоровых носителей дрожжей *Malassezia* (32 человека) нами было отмечено, что в течение 2 лет у трех человек из группы видовой состав *Malassezia*, выделяемых с кожи, изменился. Причем новые культуры обладали более высокой скоростью роста по сравнению с предыдущими. Этот интригующий факт навел нас на мысль о возможном наличии киллерных штаммов среди дрожжей рода *Malassezia*. Для проверки данной гипотезы мы использовали две известные методики оценки киллерной активности — проверка жизнеспособности клеток после инкубации с предполагаемым токсином [Голубев В. И. с соавт., 1988] и быстрый метод с использованием красителя, позволяющий проверить целостность мембраны цитоплазмы (ЦПМ) после обработки токсинсодержащим препаратом [Kurzweilova H. et al, 1993].

В качестве штамма-продуцента токсина нами был выбран самый быстро растущий изолят *Malassezia spp.* Культуру выращивали в жидкой среде Диксона до поздней стационарной фазы, затем культуральную жидкость (КЖ) отделяли центрифугированием, пропускали через мембранный фильтр и в течение 2 часов обрабатывали исследуемые культуры *Malassezia spp.*: сам штамм-продуцент и еще 7 изолятов *Malassezia sympodialis*. До и после обработки делали высевы на плотную среду, а также окрашивали клетки бромкрезоловым пурпурным. Три из 8 культур не теряли жизнеспособности и целостности ЦПМ после действия КЖ — продуцент и еще две. Остальные 5 в той или иной степени оказались чувствительными к препарату — часть клеток теряла жизнеспособность и окрашивалась красителем в результате нарушения целостности ЦПМ. Между числом жизнеспособных клеток и количеством поглощенного красителя отмечена обратная корреляция ($p = -0.709$).

Наличие киллерной активности у дрожжей рода *Malassezia*, по всей вероятности, должно способствовать распространению более быстро растущих культур, а также защите кожных покровов от заселения прочими дрожжами, в том числе оппортунистическими, например, *Candida albicans*.

ЯВЛЕНИЕ ДИМОРФИЗМА В СВЕТЕ ТЕОРИИ САМООРГАНИЗАЦИИ

Панина Л. К., Богомолова Е. В.

*Санкт-Петербургский государственный университет
Санкт-Петербурге*

В настоящее время известно большое число видов грибов, способных к диморфизму — формированию и чередованию двух типов формы клеток, как правило, мицелиальной и дрожжевой. Мицелиально-дрожжевые ($m > y$) морфологические переходы типичны для многих патогенных грибов, и диморфизм признан одним из основных факторов вирулентности.

Явление диморфизма и, в целом, процессы формообразования у грибов исследуются, в основном, на генетическом и биохимическом уровнях (proc. European research conference «human fungal pathogens: fungal dimorphism and disease» 1999, 2001). Однако для понимания общих принципов выявляемых биологических закономерностей много может дать общесистемный подход, рассматривающий поведение эволюционирующей грибной системы как процесс самоорганизации. Такой подход к любой биосистеме позволяет обоснованно применить современные достижения теории самоорганизации (синергетики), а именно ввести основные физические представления и логические связи, оптимально построить эксперимент и математическую модель, а также прогнозировать развитие грибных организмов (как на уровне клетки, так и на уровне колоний) в изменяющихся условиях среды.

В настоящее время с позиций синергетики исследуется множество биологических процессов, сводящихся к образованию и развитию пространственно-временных упорядоченных структур, например, на миксомицетах *dictyostelium discoideum* (белинцев, 1984, 1991; kessler, levine, 1993), миксобактериях *myxococcus xanthus* (losick, kaiser, 1993), бактериях *escherichia coli* (будрене, 1985; иваницкий и др., 1991, 1998; budrene, berg, 1991, 1995; brenner et al, 1998) и *bacillus subtilis* (ben-jacob et al., 1995, 1996), дрожжах (sams et al, 1997), стрептомицетах (савельев и др., 1999, 2001).

Поскольку рассматриваемая система (грибы Ы среда) является открытой термодинамической системой, к ней в достаточной мере применимы ключевые понятия теории самоорганизации, такие как диссипативные структуры, спонтанное нарушение симметрии, бифуркации, нелинейность и т. Д. Поэтому процессы формообразования и роста грибов правомерно трактовать в этих терминах. Можно выделить следующие этапы в процедуре описания: 1) переложение на язык синергетики соответствующих понятий морфогенеза — компетенции, индукции и т. п.; 2) уровневое описание процесса, т. е. разложение его на дискретные динамические уровни в соответствии с иерархией времен; 3) включение в рассмотрение сведений об элементарных внутриклеточных процессах, генерирующих макроскопические изменения в биосистеме (белоусов, 1986).

Сформулированные представления о динамической структуре грибной системы требуют как биологических экспериментов (обнаружения конкретных индуцирующих факторов, выявления условий возникновения той или иной формы роста клеток, исследования динамики переходов), так и привлечения математического моделирования с целью раскрытия механизмов самоорганизации и прогноза поведения системы.

Предлагаемый подход был применен нами для рассмотрения диморфных переходов у гриба *phaeococcomyces chersonesos ch 49* («черные дрожжи»), обладающего широким морфологическим потенциалом (богомолова, 1999) и способного к обратимым диморфным переходам дрожжи — мицелий в ответ на изменения условий окружающей среды. В рамках этих представлений дискретный спектр встречающихся макроскопических структур гриба

(мицелий, дрожжи) был интерпретирован как набор устойчивых состояний системы. В соответствии с иерархией времен процессов, за внешние управляющие параметры было принято поле факторов, индуцирующих диморфные переходы, за параметр порядка принималась концентрация клеток в дрожжевой фазе.

На основании введенных теоретических предпосылок была построена математическая модель, описывающая поведение системы при диморфных переходах (буляница и др., 2002). Данная модель позволяет идентифицировать критические значения управляющих параметров, при которых ансамбль клеток переключается на другую форму роста, определить пределы значений комплекса внешних факторов (фазовое пространство), где возможно существование одной из форм (мицелия или дрожжей), и промежуточную область, где две формы могут существовать одновременно.

Предлагаемый подход может служить основой для поиска путей управления сменой формы роста у диморфных грибов в экспериментальных условиях. Поскольку диморфизм является частным случаем морфогенеза, сформулированные представления могут представлять интерес с точки зрения общей биологии.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА ДРОЖЖЕЙ И ДРОЖЖЕПОДОБНЫХ ГРИБОВ — ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МИКОЗОВ

Пашкявичюс А. Ю.

Институт ботаники

Вильнюс, Литва

Существует множество патогенных для человека микромицетов. Возбудителей разных заболеваний разделяют по основному их месту обитания на зоофильные, антропофильные и геофильные. В Литве чаще всего встречаются антропофильные и зоофильные патогены а геофильные очень редки. Из практических соображений патогенные для человека грибки условно разделяют на группы: дерматофиты, дрожжи и дрожжеподобные грибы, плесени и возбудители глубоких микозов. В республике наиболее актуальным является распространение дерматофитов, повреждающих кожу и ее придатки. Второе место по распространению занимают дрожжи и дрожжеподобные грибы, повреждающие слизистую оболочку и кожу, реже внутренние органы, как следствие медицинских манипуляций и системного лечения, подавляющего иммунитет.

Основная цель наших исследований — выяснить какие именно виды дрожжей и дрожжеподобных грибов чаще всего встречаются среди больных дерматомикозами. Исследования были проведены в Дермато-венерологи-

ческом центре клиники Сантаришкес больницы Вильнюсского университета. Для идентификации дрожжей использовали классические методы и тест-системы «Candifast» и «Funichrom» (International Microbio, Франция).

Обследованы 2216 больных. Выявлено 1030 грибковых заболеваний. Установлено, что дрожжи рода *Candida* составили 17, 61%, а *Rhodotorula* — 0, 17% от числа всех выделенных дерматофитов. Проведенная идентификация позволила установить, что изоляты вида *Candida albicans* составили 49%, *C. parapsilosis* — 36%, *C. krusei* — 10%, *C. tropicalis* — 2%, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. famata* — 3% среди всех выделенных дрожжей рода *Candida*. Исследования показали, что *C. albicans* чаще всего вызывала кандидоз ногтевых валиков и ногтей (55%), кожи и слизистых оболочек (43%) и лишь в редких случаях повреждения верхних дыхательных путей (2%). Между тем, частота встречаемости *C. parapsilosis* на поврежденных ногтях и ногтевых валиках составила 76%, а на коже и слизистых оболочках — 24%.

Заслуживает внимания факт увеличения обилия вида дрожжей *Rhodotorula rubra*. В Литве был выявлен очень опасный и ранее незарегистрированный вид дрожжеподобного гриба *Coccidioides immitis*. Этот возбудитель кокцидиоза очень распространен на материке Южной Америки. Поэтому нельзя ограничиваться только лишь классическим видовым составом дерматофитов, так как в современных условиях при увеличении миграции людей, возможны и реальны изменения видового состава дерматофитов. Кроме того возрастает число больных СПИДом, характерным проявлением которого являются грибковые инфекции. В таких случаях также необходима точная идентификация вида возбудителя. Поэтому лаборатории занимающиеся идентификацией возбудителей грибковых инфекций, обязаны совершенствовать и расширять свою деятельность.

СОХРАНЕНИЕ ГРИБОВ, ИМЕЮЩИХ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ, В КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР БАЗИДИОМИЦЕТОВ ЛЕ (БИН)

Псурцева Н. В.

Ботанический институт имени В. Л. Комарова РАН
Санкт-Петербург

Сохранение генофонда макромицетов, имеющих значение для медицины, в коллекциях культур имеет большое значение для успешного использования грибных ресурсов в медицине и развития этой отрасли медицинской микологии. Депонирование культур — продуцентов биологически-активных веществ в коллекциях культур дает возможность надежного их сохранения в биологически активном состоянии за счет создания оптимальных условий поддержания культур и постоянного контроля их состояния. Работа с коллекционными культурами также уменьшает риск, связанный с ошибками в идентификации как исходных образцов грибов, из которых были

получены культуры, так и самих культур, в случае заражения микромицетами во время выделения или при пересевах. Кроме того, видовое разнообразие и штаммовая вариабельность культур, поддерживаемых в коллекционных фондах, позволяет проводить скрининг видов и селекционный отбор штаммов с биологической активностью.

Коллекция ЛЕ (БИН) является крупнейшей и единственной в России специализированной коллекцией, поддерживающей культуры макромицетов различной таксономической принадлежности, относящиеся к разным экологическим группам и собранные в разных географических районах. Сохранение разнообразия макромицетов в культуре, а также изучение биологических особенностей и возможностей практического использования этих культур в настоящее время является приоритетным направлением развития Коллекции Культур Базидиомицетов Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН.

Начало Коллекции было положено в конце 50х годов прошлого века, когда изучение биологической активности *Inotus obliquus* (чага) побудило начать работу по выделению и поддержанию в чистой культуре дереворазрушающих базидиомицетов. Многие годы развитие коллекции было связано, в основном, с поиском и изучением продуцентов биологически активных веществ среди базидиомицетов. В течение 1970х, 80х и 90х годов исследования фокусировались на культурах макромицетов, возможных источниках протеолитических ферментов с тромболитической и молокосвертывающей активностью, окислительных ферментов с лакказной, пероксидазной, полифенолоксидазной и тирозиназной активностью, полисахаридов с противоопухолевой активностью и галлюциногенных веществ.

В настоящее время основной упор развития Коллекции направлен на решение проблемы сохранения природного микологического разнообразия. Поэтому пополнение фонда Коллекции, регулярно осуществляемое в последние годы, проводится с целью расширения видового разнообразия и штаммового представительства культур макромицетов. Сейчас в Коллекции поддерживается около 1000 штаммов 428 видов из 157 родов, 47 семейств и 21 порядков агарикоидных, афиллофороидных и гастероидных базидиомицетов. Основной объем коллекционного фонда составляют оригинальные штаммы, выделенные сотрудниками Коллекции из грибов, собранных в различных географических районах, в основном, на территории бывшего СССР. Макромицеты поддерживаются в Коллекции методом субкультур на агаризованной среде, а также в дистиллированной воде и под вазелиновым маслом.

В соответствии с разработанной стратегией развития Коллекционного фонда ЛЕ(БИН) большое внимание уделяется поддержанию и изучению культур макромицетов, имеющих практическое значение и, в частности, интересных для медицины. В последние годы в Коллекции не только сохраняются культуры тех видов макромицетов, которые представляют интерес для медицинских исследований, но было пополнено число таких видов и увеличено их штаммовое представительство.

В настоящее время в коллекции ЛЕ (БИН) поддерживаются культуры таких видов, как *Dictyophora duplicata* (3), *Flammulina velutipes* (15), *Fomes fomentarius* (7), *Fomitopsis officinalis* (1), *Fomitopsis pinicola* (10), *Ganoderma lucidum* (14), *Grifola frondosa* (4), *Hericium erinaceum* (3), *Heterobasidion annosum* (5), *Hypholoma fasciculare* (3), *Hypsizygus ulmarius* (4), *Inonotus obliquus* (6), *Laetiporus sulphureus* (5), *Lampteromyces japonicus* (3), *Lentinula edodes* (9), *Lenzites betulina* (4), *Panellus mitis* (1), *Phellinus igniarius* (7), *Piptoporus betulinus* (6), *Pleurotus ostreatus* (5), *P. pulmonarius* (22), *Pycnoporellus fulgeus* (1), *Pycnoporus cinnabarinus* (3), *Shizophyllum commune* (8), *Trametes hirsuta* (7), *T. suaveolens* (3), *T. versicolor* (5) и некоторых других видов, представляющих интерес для медицины. В скобках указано число штаммов в коллекционном фонде. Некоторые из этих видов хорошо известны в народной и научной медицине своим лечебным эффектом. Другие встречаются в научных публикациях как обладающие широким спектром биологически активных веществ. Однако, ряд видов, например *Laetiporus sulphureus*, *Lenzites betulina*, *Panellus mitis*, *Piptoporus betulinus* и некоторые другие известны только из фольклорных источников и представляют интерес для научного исследования их терапевтического эффекта.

Культуры токсичных и галлюциногенных грибов, таких как *Amanita citrina*, *A. muscaria*, *A. phalloides*, *Galerina marginata*, *Psilocybe cyanescens* и *P. semilanceata* также представлены в Коллекции.

В Коллекции ЛЕ (БИН) регулярно проводится таксономическая ревизия фонда в соответствии с современными номенклатурными нормами. Учитываются все существенные изменения, произошедшие в систематике макромицетов за последние годы. Особенно это важно для таксонов, имеющих медицинское значение.

Таксономические исследования *Flammulina* и *Pleurotus*, проведенные в мире в течение последних лет, позволили пересмотреть таксономический состав этих родов. В связи с этим были предприняты усилия по верификации коллекционных культур. Для уточнения видовой принадлежности штаммов *Flammulina* и *Pleurotus* из Коллекции ЛЕ (БИН) в соответствии с биологической концепцией вида были получены монокарионы этих штаммов и проведено их скрещивание с тест-культурами. Было показано, что р. *Flammulina* представлен в Коллекции не только штаммами *F. velutipes*, как предполагалось ранее, но и *F. ononidis*, *F. rossica*, *F. populicola* и *F. fennae*. Род *Pleurotus* — штаммами *Pleurotus calypttratus*, *P. cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. dryinus*, *P. eryngii*, *P. ostreatus* и *P. pulmonarius*. *Pleurotus columbinus*, *P. florida* и *P. salignus* явились одним биологическим видом с *P. ostreatus*. *Pleurotus sajor-caju* оказался биологически совместим с *P. pulmonarius*. Большое значение использованный метод скрещивания сыграл для выявления видовой принадлежности коллекционных штаммов, поддерживаемых в Коллекции на протяжении многих лет и которые являются возможными продуцентами тех или иных биологически активных веществ.

Культуры из Коллекции ЛЕ (БИН) могут быть востребованы как для научных, так и для практических целей по обмену или на основе коммерческого сотрудничества.

РОЛЬ ГЕОБИОЦЕНОЗОВ В ФОРМИРОВАНИИ ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ МИКРОМИЦЕТОВ, ИНФИЦИРУЮЩИХ КОЖУ И ЕЕ ПРИДАТКИ

Руденко А. В., Коваль Э. З.

*Институт урологии АМН Украины
Киев, Украина*

Если патогенные свойства дерматомицетов у больных онихомикозом не вызывают сомнений, то способность микромицетов принимать активное участие в патогенетическом процессе все еще отвергается многими медиками, несмотря на прогрессирующее увеличение выделения их у больных с соответствующим клиническим диагнозом. Очевидно, что положительный результат затянувшихся дискуссий может быть достигнут только на основании сравнительного анализа физиолого-биохимических и экологических свойств этих групп грибов. Без учета закономерностей формирования взаимоотношений паразита и хозяина на молекулярном и экосистемном уровнях невозможно понимать и трактовать такое свойство, как патогенность, характерное многим микромицетам, в том числе и дерматомицетам.

Медики и микологи исходят из разных принципов определения патогенности, часто не придавая значения понятию, что эти свойства микромицетов проявляются при недостаточно активной защитной реакции организма.

Особенно важным в этом аспекте можно считать установление источника инфекции. В природных условиях обычным резервуаром ее является почва, где многие патогенные виды находятся в сапрофитной стадии. Именно в геобиоценозах происходят процессы деструкции накапливающихся органических субстратов растительного и животного происхождения, что и обуславливает определенную трофическую специализацию микроорганизмов разного таксономического положения. При этом формируются группы моно- и полибиотрофов, обладающих значительной амплитудой свойств от гетеротрофов до узкоспециализированных паразитов представителей различных Царств природы. Преобладание трофического типа — сапрофитного или биотрофного — может быть характерно для таксонов разного уровня, как Царств, так и отдельных штаммов. Это особенно четко проявляется у геофильных микромицетов, которые характеризуются не только наличием мощных ферментных систем, но и высокой экологической валентностью, а также уникальной способностью сохранять жизнеспособность в экстремальных условиях существования.

Геобиоценозы являются для микромицетов и дерматомицетов общей средой обитания, что не может не влиять на формирование общих свойств, в том числе и патогенности у возбудителей онихомикоза.

Многочисленные исследования в области эпидемиологии дерматомикозов подтверждают гипотезу о возможности почвы служить источником возбудителей инфекционно-воспалительного процесса. В почвах различной степени окультуренности обнаружены такие распространенные во всех ре-

гионах мира патогенные дерматомицеты как *Trichophyton gypsum*, *T. rubrum*, *T. terrestris*, *Keratinomyces ajelloi*, *Microsporum canis*, *M. cookei*, и др. (Кашкин, 1950; Степанцова, 1965; Малкина, 1967; Вольц, Вассер, 1991; Hoog e. a., 2000). По экологическому критерию современной классификации эти и подобные им виды отнесены к группе геофильных дерматомицетов. Очевидно, почва для них является естественной средой обитания, где они находятся в сапротитной стадии и сохраняют свои патогенные свойства благодаря трофическим источникам специфического состава, наличие которых возможно при разложении животных останков, попадающих в почву.

Согласно предлагаемым новым классификационным системам дерматомицеты относятся к диморфным представителям порядка *Onygenales* и по сумме признаков занимают соответствующее место в классе *Hyphomycetes*, в котором находятся и все почвенные микромицеты. Кроме некоторых общих морфологических признаков, главным отличительным физиологическим для дерматомицетов считается наличие комплекса кератинолитических ферментов, которые обеспечивают конкурентноспособность в отношении колонизации соответствующих субстратов, в том числе кожи и ее придатков. Однако при более тщательном изучении сапротитной стадии дерматомицетов с помощью метода кератиновых ловушек, помещаемых в почву, оказалось, что вместе с видами родов *Trichophyton*, *Keratinomyces*, *Microsporum* и др., они заселяются и видами микромицетов из родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Scopulariopsis* и др., которые выделяются и у больных с пораженными ногтевыми пластинками и относятся к группе условно-патогенных грибов.

Относительно патогенности выделяемых штаммов геофильных дерматомицетов имеются противоречивые данные. В лабораторных экспериментах они проявляли различную активность — от слабой до высокой, в то время как в естественных условиях служили источником инфекции у больных, контактирующих с почвой, а также мышевидных грызунов. Экспериментально было показано, что вирулентность геофильных дерматомицетов можно искусственно усиливать путем культивирования на соответствующем субстрате. Патогенность выделенного из почвы штамма *Keratinomyces ajelloi*, который в предварительных опытах характеризовался низкой вирулентностью, изменяли путем прививки его людям. После первого такого пассажа он четырежды был пассирован через кожу морских свинок и каждый раз клинические явления проявлялись более четко (Малкина, 1965).

При сравнении ростовых характеристик 6 видов микромицетов, выделенных из почвы и выделенных из пораженных ногтей, принципиальных отличий не отмечено (Руденко, Коваль, 2001). Они были идентичны для вариантов культивирования на среде Сабуро и ногтевой пластинке. Эта же закономерность была отмечена и для штаммов *Trichophyton rubrum*, выделенных из пораженных ногтевых пластинок у больных с диагнозом «онихомикоз». Предположение, что штаммы *Trichophyton rubrum*, выделенные из пораженных ногтей, будут существенно отличаться от микромицетов активностью роста и темпом деструкции, не подтверждались. Эти эксперименты были поставлены в условиях воздействия на ноготь монокультурой гриба.

Однако в естественных условиях, инфицирование происходит на конкурентной или синтрофной основе, что обуславливает доминирование штамма с более высокой экологической валентностью (Руденко и др. 2001).

Сопоставляя существующую информацию о формировании патогенности у микроорганизмов, можно сделать выводы о важности проведения исследований на популяционном уровне с учетом естественных экониш. Любой организм в момент воздействия на него нового фактора внешней среды либо резистентен, либо адаптируется. Приспособление к колеблющимся условиям среды достигается за счет онтогенетических и физиологических реакций, соответствующих пластичным признакам генотипа (Шмальгаузен, 1982).

Остается еще достаточно «белых пятен» в эпидемиологии и этиологии возбудителей онихомикоза в современных условиях усиливающегося антропогенного прессинга. Но предположение о возрастающей роли патогенных геофильных микромицетов и их активизации подтверждается многочисленными клиническими наблюдениями.

ISOLATION OF GRISEOFULVIN RESISTANT STRAINS OF PREVALENT DERMATOPHYTES IN ISFAHAN, IRAN

Chadeganipour M., Shadzi S., Chabavizadeh J.

*Mycology and Parasitology Departmentm, Isfahan Medical School
Исфаган, Иран*

The emerge of drug resistance in dermatophytes would affect the incidence of infection in the society and causes difficulties for both physician and patient. With report of cases of griseofulvin resistant dermatophytes, the use of new antifungal drugs is recommended which are more expensive or somehow rare in Iran. Therefore, the necessity of griseofulvin sensitivity pattern of dermatophytes in Isfahan is perceived which could lead to a more effective and less expensive treatment for dermatophytoses. 50 isolates of the most prevalent dermatophytes in Isfahan were isolated from patients and then the standard homogenized suspension from them were prepared for future inoculation. The minimum inhibitory concentration (MIC) of griseofulvin was determined by modified macrodilution method for each isolate and then results were compared and analysed with standard values of MICs of dermatophytes and the resistant species identified. All 100% tested isolates had MIC mode of <0.25 , 90% had <8 and 50% ranged between <0.25 -1 $\mu\text{g/ml}$. From all isolates, 10% of them including three *Trichophyton verrucosum*, one *Microsporum canis* and one *T. mentagrophytes* had MIC out of standardized range therefore, they considered as griseofulvin resistant isolates. Although MIC values of drugs at in vivo and in vitro are somewhat different but in vitro values could be used as additional parameters in the decision making of treatment for dermatophytoses, in particular it's recalcitrant types or in areas which the resistant species may have high prevalence.

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ РОДА *MALASSEZIA* ПО ОТНОШЕНИЮ К *CANDIDA ALBICANS*

Шелемех О. В., Арзуманян В. Г.

Институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова
Москва

Представители нормальной микрофлоры человека, как правило, являются симбионтами с более или менее выраженной положительной, зачастую защитной, функцией. Для дрожжей рода *Malassezia*, населяющих кожу большинства половозрелых индивидуумов, описана противогрибковая активность по отношению к дерматофитам, представленная веществами липидной природы [Weary P. E., 1968]. Однако до сих пор не было данных о наличии или отсутствии такого эффекта на другие оппортунистические грибы. Целью настоящей работы явилась проверка наличия антагонизма дрожжей рода *Malassezia* в отношении наиболее распространенных клинически значимых дрожжей — *Candida albicans*.

Культура дрожжей *Malassezia spp.* и 11 изолятов *C. albicans* выделены нами ранее и идентифицированы [Guillot J., Gueho E. et al, 1996; Barnett J., Yarrow D., 1996; Арзуманян В. Г., 2002]. Наличие отсроченного антагонизма оценивали разработанным нами количественным методом: культуру дрожжей *Malassezia* засекали газон в чашки Петри диаметром 4 см, содержащие агар Диксона, и выращивали в течение 7 суток при комнатной температуре; затем агар переворачивали тонким стальным шпателем и на обратную его сторону засекали суспензии клеток *C. albicans* так, чтобы исходное количество живых клеток составляло 50-150 КОЕ; далее чашки инкубировали при комнатной температуре. Контролем служили чашки с чистой средой Диксона. Учет результатов проводили на 2, 6 и 14 сутки после засева *C. albicans*. Для каждого изолята *C. albicans* опыты 2-3 раза повторяли.

Через 2 суток во всех контрольных вариантах отмечен рост колоний *C. albicans* размером 0.5-1.0 мм, тогда как во всех опытных рост не наблюдали. Появившиеся в опытных вариантах на 6 сутки микроколонии были едва различимы — их можно было увидеть лишь в бинокляр при увеличении в 100 раз. К 14 суткам стали очевидны различия между штаммами *C. albicans*: у 4 из 11 изолятов (36.4%) размер микроколоний остался на исходном уровне, тогда как у остальных 7 изолятов размер колоний стал сопоставим с контрольным. Количество микроколоний/ колоний в опытных вариантах практически не отличалось от их числа в контрольных вариантах.

Чтобы оценить термостабильность выделяемой дрожжами *Malassezia* противогрибковой субстанции в отдельной серии опытов выросшие газон клетки *Malassezia* смывали с агара, а сам агар кипятили и вновь заливали в чашки Петри. На застывший агар засекали культуры *C. albicans*. Все клетки в этих опытах вырастали с той же скоростью и в том же количестве, что и контрольные.

На основании полученных данных можно сделать вывод о наличии у дрожжей *Malassezia термолабильных фунгистатических (не фунгицидных)* метаболитов, активных по отношению к дрожжам *C. albicans*.

ФАКТОРЫ ПЕРСИСТЕНЦИИ ДРОЖЖЕПОДОБНЫХ ГРИБОВ РОДА CANDIDA

**Валышев А. В., Перунова Н. Б., Валышева И. В.,
Карташова О. Л., Бухарин О. В.**

*Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза ОНЦ УрО РАН
Оренбург*

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* являются ведущими причинными факторами в развитии заболеваний грибковой этиологии в инфекционной и неинфекционной клинике, приводя к развитию тяжелых и, как правило, длительно текущих патологических процессов. Однако механизмы переживания грибов в биотопах тела человека остаются во многом не ясными.

Целью настоящего исследования явилось определение факторов персистенции дрожжеподобных грибов рода *Candida*.

Материалом для данной работы послужили штаммы грибов рода *Candida*, выделенные из фекалий пациентов при обследовании на дисбиоз кишечника. Для выделения грибов использовали агаровые среды *BIGGY* (*Becton Dickinson Microbiology Systems*, США) и Кандида (НПО «Питательные среды», Махачкала). Идентификацию культур проводили общепринятыми методами, ассимиляцию источников углерода определяли с использованием тест-системы *API 20 C AUX* (*bioMerieux*, Франция). Антилизозимную активность (АЛА) определяли фотометрическим методом, антикомплементарную активность (АКА) — кинетическим методом [Бухарин О. В., 1999]. Для тестирования антилактоферриновой активности (АЛФА) использовали иммуноферментный анализ.

Все изученные штаммы обладали антилизозимной активностью. Уровень АЛА у представителей видов *C. lusitaniae*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* и *C. parapsilosis* составил соответственно 0, 69±0, 28, 0, 68±0, 07, 0, 53±0, 36, 0, 36±0, 13 и 0, 15±0, 09 мкг/мл*ОП. Способность к инаktivации белков системы комплемента была обнаружена у всех культур *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. krusei* и *C. parapsilosis* и 78, 3% штаммов *C. albicans*. Максимальные значения АКА были выявлены у культур *C. albicans*, *C. krusei* и *C. lusitaniae* — соответственно 3, 97±0, 74*10⁶, 2, 35±1, 47*10⁶ и 1, 26*10⁶ анти-ЛЕК. Антилактоферриновая активность была обнаружена у 90% штаммов, среднее значение АЛФА составило 3, 83±0, 61 нг/мл.

Таким образом, грибы рода *Candida* обладают способностью инаktivировать лизоцим, лактоферрин, белки системы комплемента. Наличие факторов персистенции у грибов данного рода способствует их длительному переживанию в биотопах организма человека, возникновению и хронизации инфекционно-воспалительных процессов.

ИНАКТИВАЦИЯ ФАКТОРОВ ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ГРИБАМИ *RHODOTORULA MUCILAGINOSA*

Вальшев А. В., Перунова Н. Б., Вальшева И. В.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза ОНЦ УрО РАН
Оренбург

Грибы рода *Rhodotorula* широко распространены в окружающей среде [Fell J. W. et al., 1984]. Некоторые виды встречаются в кишечнике здоровых людей и пациентов [Khatib R. et al., 2001]. В последние годы отмечено возрастание частоты выделения грибов данного рода при различных патологических состояниях, особенно у пациентов с иммунодефицитами. Так, описаны случаи фунгемии [Jimenez-Mejias M. E. et al., 1992; Lui A. Y. et al., 1998; Papadogeorgakis H. et al., 1999; Kiraz N. et al., 2000; Samonis G. et al., 2001; Chung J. W. et al., 2002], менингита [Pore R. S., Chen J., 1976; Gyaurgieva O. H. et al., 1996], эндофтальмита [Mercur A. B., Hodge W. G., 2002], послеоперационного вентрикулита [Donald F. E. et al., 1988] и перитонита (связанного с постоянным перитонеальным диализом в амбулаторных условиях) [Eisenberg E. S. et al., 1983; Wong V. et al., 1988; Pennington J. C. 3rd et al., 1995; de Zoysa J. R. et al., 2001], обусловленных *R. mucilaginosa* (*R. rubra*). Культуры *R. glutinis* были выделены при менингите [Lanzafame M. et al., 2001], фунгемии [Colombo A. et al., 1997], перитоните [Asim M. et al., 1999], кератите [Guerra R. et al., 1992; Casolari C. et al., 1992], водянке маточной трубы [Gogate A. et al., 1987]. Грибы вида *R. minuta* явились причиной фунгемии [Goldani L. Z. et al., 1995], эндофтальмита [Pinna A. et al., 2001], инфекции после артропластики тазобедренного сустава [Cutrona A. F. et al., 2002].

Целью настоящего исследования явилось определение способности грибов вида *Rhodotorula mucilaginosa* к инаktivации некоторых факторов естественной резистентности человека.

Материалом для данной работы послужили шесть штаммов *R. mucilaginosa*, выделенных из фекалий пациентов с дисбиотическими состояниями. Идентификацию штаммов проводили общепринятыми методами, ассимиляцию источников углерода определяли с использованием тест-системы API 20 C AUX (bioMerieux, Франция). Антилизотимную (АЛА) и «антиинтерфероновую» (АИА) активности определяли чашечным методом (принцип отсроченного антагонизма), антикомплементарную активность (АКА) — кинетическим методом [Бухарин О. В., 1999]. У одного штамма с помощью иммуоферментного анализа была определена антилактоферриновая активность. Продукцию липаз (эстераз) оценивали на агаре с Твином 80 [Slifkin M., 2000].

Все изученные штаммы обладали антилизотимной активностью. Уровень АЛА находился в диапазоне 3–5 мкг/мл (среднее значение 4, 17 ± 0 , 32 мкг/мл). Шесть культур инаktivировали белки системы комплемента; средний уровень АКА составил $0, 53 \pm 0, 16 \cdot 10^6$ анти-ЛЕК. Три штамма инаktivировали бактерицидный компонент препарата человеческого лейкоцитарного интерферона, один штамм обладал антилактоферриновой активностью. Липолитическая активность была обнаружена у всех культур *R. mucilaginosa*.

Полученные результаты свидетельствуют, что штаммы грибов данного вида обладают значительным набором факторов персистенции, позволяющих длительно переживать в биотопах организма человека в условиях антимикробного прессинга со стороны хозяина.

ПРОТИВОГРИБКОВОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛАКТОФЕРРИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Вальшев А. В., Вальшева И. В., Бухарин О. В.

*Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза ОНЦ УрО РАН
Оренбург*

Лактоферрин (Лф) — одноцепочечный негемовый железосвязывающий гликопротеин с молекулярной массой около 80 кДа — является одним из ведущих факторов естественной резистентности организма человека и животных. Данный белок обнаружен во вторичных гранулах полиморфноядерных нейтрофилов, а также в различных секретах — слюне, слезной жидкости, секретах носовой полости и пищеварительных желез желудочно-кишечного тракта, сперме, шеечной слизи, молозиве, молоке [Griffiths E., 1987]. Функции Лф чрезвычайно разнообразны: он играет значительную роль в метаболизме железа; проявляет антибактериальную, противовирусную и антипаразитарную активность; оказывает противовоспалительное и противоопухолевое действие; является иммуномодулятором; обладает ферментативными свойствами (в качестве рибонуклеазы и протеазы) [Brock J. H., 2002].

Одним из механизмов колонизационной резистентности биотопов хозяина является противогрибковое действие Лф и его производных. Являясь хелатором железа, Лф оказывает фунгистатическое действие на *Candida albicans* и *Rhodotorula rubra* [Andersson Y. et al., 2000]. Как коровий Лф, так и Лф человека оказывают фунгицидное действие на грибы рода *Candida*. Инкубация грибов с Лф (20 мкг/мл) при 37°C в течение 45–150 мин инактивирует *Candida sp.* Фунгицидное действие коровьего Лф варьирует в зависимости от вида: *C. tropicalis* > *C. krusei* > *C. albicans* > *C. guilliermondii* > *C. parapsilosis* > *C. glabrata* (в порядке убывания; последний вид наиболее устойчив); отмечаются также внутривидовые различия по чувствительности грибов к данному белку [Xu Y. Y. et al., 1999]. Клетки *C. krusei* более чувствительны к Лф человека (примерно в 1, 4 раза), чем *C. albicans* [Samaranayake Y. H. et al., 1997].

На противогрибковое действие Лф оказывают влияние различные факторы. Фунгицидное действие в отношении *C. albicans* и *C. krusei* Лф человека проявляется только в ненасыщенном железом состоянии, в форме аполактоферрина (апо-Лф); противогрибковый эффект зависит от дозы, температуры и времени экспозиции с Лф [Soukka T. et al., 1992; Nikawa H. et al., 1993]. Летальный эффект более выражен при *pH* 7, 0, чем при *pH* 5, 5; максимальное подавление при нейтральных значениях *pH* достигается в течение 25 мин, когда инкубацию с Лф проводят в среде с 0, 05 мМ *KCl* при 37°C.

Наличие *D*-глюкозы (1 мМ) не влияет на кандидацидное действие апо-Лф, но как фосфатные, так и бикарбонатные ионы (в физиологических для слюны концентрациях) полностью блокируют противогрибковое действие [Soukka T. et al., 1992]. Предварительная инкубация штаммов *C. albicans* и *C. krusei* на среде с добавлением сахарозы изменяет чувствительность культур к апо-Лф: чувствительные к апо-Лф изоляты как *C. albicans*, так и *C. krusei* демонстрируют значительно более высокую устойчивость к апо-Лф, но такая преинкубация не оказывает влияние на устойчивые к апо-Лф изоляты *C. albicans* [Nikawa H. et al., 1995]. Предварительная инкубация *C. albicans* с противогрибковыми препаратами (нистатином, амфотерицином В, клотримазолом, миконазолом и 5-фторцитозином) в субингибиторных концентрациях (1:4 и 1:16 МПК) повышает устойчивость к опосредованному апо-Лф киллингу, тогда как преинкубация *Candida* в туникамидине (агенте, который подавляет синтез маннопротеинов клеточной стенки грибов) усиливает противогрибковое действие апо-Лф [Nikawa H. et al., 1994].

Более выраженной по сравнению с Лф противогрибковой активностью обладают его производные — лактоферрицины, полученные при ограниченном кислотном протеолизе нативных белков пепсином [Tomita M. et al., 1994]. В частности, показано, что пептид *FKCRRWQWRM* из коровьего Лф подавляет размножение грибов *Candida*, не оказывая существенного влияния на поглощение ионов железа клетками грибов. Минимальная подавляющая концентрация данного пептида в отношении двух штаммов *C. albicans* (17, 3±2, 2 мкМ и 17, 5±2, 4 мкМ) сопоставима с МПК₁₀₀ миконазола (13, 0±1, 7 мкМ и 13, 1±1, 6 мкМ). Подавление роста клеток грибов дополнительно усиливается комбинацией пептида с амфотерицином В и миконазолом. Кроме того, данный пептид стимулирует киллинговый эффект полиморфноядерных нейтрофилов, повышая продукцию супероксида, активность протеинкиназы и *p38 MAPK*, и экспрессию *p47phox* [Ueta E. et al., 2001].

При исследовании противогрибкового действия фрагментов Лф человека было установлено, что наиболее выраженной активностью в отношении устойчивых к флуконазолу *C. albicans* обладает первый катионный домен (1-11, *GRRRRSVQWCA*) *N*-конца Лф, причем кандидацидное действие определяется вторым и третьим аминокислотными остатками (аргинины) [Lupetti A. et al., 2000]. Дальнейшие исследования показали, что *N*-концевой пептид Лф (1-11) индуцирует продукцию реакционноспособных метаболитов кислорода (РМК) и АТФ, снижает на 20% уровень внутренних тиолов, в частности глутатиона. Уменьшение защитного эффекта внутренних тиолов от повреждающего действия РМК и внеклеточное высвобождение АТФ, приводящее к образованию пор, объясняют механизм противогрибкового действия катионного домена *N*-конца Лф человека [Lupetti A. et al., 2000, 2002].

Лактоферрин оказывает влияние не только на *Candida sp.*, но и на другие грибы. Так, высокие концентрации Лф (3, 5-5 мг/мл) подавляют размножение *Blastomyces dermatitidis* [Giles S., Czuprynski C., 2002]. Лактоферрины коровы и человека, а также лактоферрицин В оказывают противогрибковое действие *in vitro* на грибы рода *Trichophyton*. Кроме того, пероральный прием Лф пациентами с трихофитией, и введение Лф в корм морским свин-

кам с экспериментальным микозом (*tinea corporis* и *tinea pedis*), вызванным *Trichophyton mentagrophytes*, значительно снижают дерматологические проявления заболевания [Wakabayashi H. et al., 2000; Yamauchi K et al., 2000].

Подавление роста *C. albicans* под действием нейтрофилов мышей или человека значительно усиливается в присутствии физиологических концентраций Лф. Антимикробный белок кальпротектин в комбинации с Лф оказывает выраженное подавляющее действие на рост *C. albicans* [Okutomi T. et al., 1997, 1998].

Лактоферрин и его производные усиливают противогрибковое действие многих антимикотиков (амфотерицина В, 5-фторцитозина, клотримазола, кетоконазола, итраконазола и флуконазола), заметно снижая их минимальную подавляющую концентрацию и замедляя развитие устойчивости к препаратам [Wakabayashi H. et al., 1998; Kuipers M. E. et al., 1999, 2002].

Предложены первые лекарственные формы, содержащие Лф. Так, изготовлены мукоадгезивные таблетки на основе алгината натрия, содержащие 250 мг Лф. Фосфатный буфер поддерживает pH слюны в полости рта в диапазоне от 6, 5 до 7, 5. Эффективная терапевтическая концентрация Лф в слюне в отношении *C. albicans* и *C. glabrata* поддерживается по меньшей мере в течение 2 ч [Kuipers M. E. et al., 2002].

Таким образом, лактоферрин и его производные являются важными факторами защиты организма хозяина от патогенных грибов, способствуя созданию и поддержанию колонизационной резистентности. Разработка и внедрение в медицинскую практику препаратов на основе лактоферрина и лактоферрицинов является перспективным направлением лекарственной терапии микозов.

МАР-КИАЗНЫЙ МОДУЛЬ И МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ К ОСМОСТРЕССУ

Зароченцева И. А., Богомолова Е. В., Панина Л. К.

Санкт-Петербургский Государственный Университет,
Физиологический институт имени А. А. Ухтомского, кафедра биофизики.
Санкт-Петербург

Микромицеты, относящиеся к группе так называемых «черных дрожжей», обладают высокой морфологической пластичностью, и процессы, связанные с определенными изменениями условий среды, сопровождаются у них вариациями формы клеток, структуры и стратегии роста колонии. Изменения морфологии клеток и интенсивности роста при стрессе, смоделированном в лабораторных условиях, могут быть использованы как показатели измененной активности консервативных эукариотических сигнальных путей, таких как МАР-киназный, сАМР-зависимый, фосфатидилинозитидный модули. В качестве фонового стрессирующего фактора могут быть использованы нестандартные показатели осмотического давления. Наряду с

температурой и некоторыми другими параметрами, осмотическое давление является универсальным раздражителем для клеток всех типов организмов, независимо от пищевых потребностей, местообитания, строения. Очевидно, микромицеты должны обладать достаточно развитыми и оперативными системами защиты от осмостресса в естественных условиях, так как многие «экстремальные» виды освоили субстраты (камень, строительные конструкции, организм теплокровных животных, т. д.), характеризующиеся в том числе повышенными концентрациями осмолитов во внешней среде. Известно, что у эукариот ключевым элементом в передаче разнообразных сигналов от клеточной поверхности к ядру является высококонсервативный MAP-киназный сигнальный модуль. У микромицетов ответ на осмостресс также включает активацию MAPK-каскада. Вероятно, что MAP-модуль является центральным звеном, однако целостная картина всех этапов ответа пока отсутствует. In vitro на фоне смоделированного осмостресса возможно применение химических (фармакологических) агентов (сАМР, глюкоза, гормоны) с известным принципом действия, связывающих или, напротив, активирующих те или иные компоненты внутриклеточных сигнальных каскадов. Наблюдение за фенотипическими эффектами таких воздействий позволяет уточнить информацию о внутриклеточных механизмах адаптации к стрессу у микромицетов.

В работе обсуждаются результаты первого этапа экспериментального исследования вовлеченности MAPK-каскада в ответ на осмостресс у черных дрожжей из рода *Phaeococcomyces*. Теоретическую базу эксперимента составляют в основном данные по *Saccharomyces cerevisiae*, *Shizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*.

АДГЕЗИВНЫЕ РЕАКЦИИ CANDIDA ALBICANS В УСЛОВИЯХ КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ

Заславская М. И., Махрова Т. В., Салина Е. В., Маянский А. Н.

*Нижегородская государственная медицинская академия
Нижний Новгород*

Адгезия принадлежит к числу важнейших реакций, реализуемых кандидами на ранних стадиях развития инфекционного процесса. В настоящее время адгезия рассматривается как многофакторный процесс, который детерминируется не только комплексом специфических и неспецифических взаимодействий между микробными клетками и эпителиоцитами, но и зависит от реактивности колонизируемой ткани.

В настоящей работе проанализированы количественные и качественные показатели адгезии *Candida albicans* в системе с буккальными эпителиоцитами, обладающими различным уровнем энергетического метаболизма.

Использовали штамм *C. albicans* № 601, обладающий выраженными адгезивными реакциями. Буккальные эпителиоциты здоровых доноров (10^6 кл/мл) инкубировали в равных объемах (0, 5 мл) с 24-часовой живой культурой *C. albicans* (10^7 кл/мл) в забуференном физиологическом растворе (30 мин), в режимах, обеспечивающих различный уровень метаболической активности эпителиоцитов (37°C ; 4°C). В ряде экспериментов взвесь буккальных эпителиоцитов предварительно была обработана *NaF* (20 мМ/мл) с целью блокады гликолиза.

Подсчитывали среднее количество кандид в пересчете на один эпителиоцит (учитывали 100 клеток). Для анализа прочности адгезивных контактов, эпителиоциты с прикрепившимися кандидами наслаивали на фикоλλ-верографин с плотностью 1, 077 г/см³ и центрифугировали (1000g, 15 мин). Из отмытого клеточного осадка (прошедшие сквозь градиент эпителиоциты) делали мазки. Определяли процент прочноадгезированных кандид, оставшихся на эпителиоцитах после центрифугирования через фикоλλ-верографин.

При 4°C наблюдалось снижение адгезии кандид на буккальных эпителиоцитах во всех сериях экспериментов в $2, 0 \pm 0, 3$ раза по сравнению с выраженностью адгезивных реакций при 37°C . Качественные показатели адгезивных реакций в системе при снижении уровня метаболической активности (4°C) достоверно не отличались от контроля (37°C): $60, 8 \pm 18, 4$ и $64, 3 \pm 8, 4\%$ прочноадгезированных кандид соответственно.

Блокада гликолиза влияла на адгезивный потенциал буккальных эпителиоцитов, что проявлялось в снижении адгезии кандид в системе во всех сериях эксперимента в среднем в $2, 5 \pm 0, 7$ раза.

Полученные данные позволяют говорить о том, что эпителиальная адгезия *C. albicans* является сложным феноменом, который включает энергетическинезависимые и энергетическизависимые компоненты. Зависимость от метаболической перестройки эпителиоцитов затрагивает лишь количественные показатели адгезивной реакции (число кандидозных клеток, фиксируемых на эпителиоцитах), но не влияет на прочность состоявшихся адгезивных контактов.

АНАЛИЗ ВЫСЕВАЕМОСТИ ГРИБОВ РОДА CANDIDA ИЗ РАЗЛИЧНОГО КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Чеснокова М. Г., Соловьева Т. Д., Карпова О. И.

Омская государственная медицинская академия

Бактериологическая лаборатория МСЧ №10

Омск

Актуальность проведенных исследований определяется недостаточным изучением роли дрожжеподобных грибов рода *Candida* в патологии, до определенного момента являющегося условно-патогенным.

Целью нашего исследования было проведение бактериологического анализа высеваемости дрожжеподобных грибов рода *Candida* из клинического материала у больных с различной патологией.

Обследовано 2088 больных с различной патологией, находившихся на стационарном лечении в отделениях МСЧ № 10 г. Омска в 2001 году. Осуществлялся микробиологический анализ различного патологического материала (мочи, ран, слизи носоглотки, мокроты, крови, спинномозговой жидкости, желчи, испражнений, отделяемого глаз и ушей), который исследовали по общепринятой методике (приказ МЗ СССР № 535).

Результаты бактериологического исследования свидетельствуют о том, что наиболее часто дрожжеподобные грибы рода *Candida* высевались из мокроты (из 57 больных - в 21,1% случаев). При этом в 15,8% встречался *C. albicans*, в 3,5% случаев - *C. pseudotropicalis*, в 1,8% случаев - *C. tropicalis*.

При проведении бактериологического анализа крови на стерильность из 273 проб в 1 случае выделялся *C. pseudotropicalis*. При прямой бактериоскопии из 54 проб дрожжевые клетки с почкованием обнаружены в 3 случаях. Из желчи - и спинномозговой жидкости выделяли только вид *C. albicans* (соответственно в 8,3 и 12,5% от числа проб). Микробиологическое исследование отделяемого глаз показало, что из 3 проб высевали *C. pseudotropicalis* в 1 случае, из 22 проб отделяемого ушей был выделен в 1 случае *C. albicans*. При исследовании слизи носоглотки выделялся *C. albicans* в 3,7% случаев. Бактериологический анализ мочи показал, что из 884 проб отмечался рост *C. albicans* и *C. pseudotropicalis* в 0,45% случаев. Изучение раневого отделяемого показало, что в 3 случаях выделялись *C. crusei*, *C. albicans*, *C. stellatoidea* (массивный рост).

При проведении микробиологического анализа испражнений на дисбактериоз выделены в 8,8% случаев *C. albicans* и в 1 случае - *C. tropicalis* в концентрации более 10^5 , в двух образцах отмечался рост *Geotrichium candidum* (более 10^5) и *Aspergillus niger* (10^3).

Таким образом, проведение анализа высеваемости дрожжеподобных грибов рода *Candida* из клинического материала у больных с различной патологией показало, что наблюдалось наиболее интенсивное и массивное выделение дрожжеподобных грибов рода *Candida* из мокроты больных с неспецифическими заболеваниями легких.