

УСПЕХИ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Под общей научной редакцией академика РАЕН
Ю.В. Сергеева

Том V

**МАТЕРИАЛЫ ТРЕТЬЕГО ВСЕРОССИЙСКОГО КОНГРЕССА
ПО МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ**

Москва
Национальная Академия Микологии
2005

ББК 28.591
УДК 58-616.5
У78

Редакционная коллегия:

Сергеев Ю. В. (главный редактор)
Лещенко В. М. (ответственный секретарь)
Бибикова М. А.
Дьяков Ю. Т.
Левитин М. М.
Кравченко Л. М.
Мусселиус С. Г.
Озерская С. М.
Панин А. Н.
Саркисов К. А.
Сергеев А. Ю.
Тутельян В. А.
Феофилова Е. П.

У78 Успехи медицинской микологии. — Т. 5. — М.: Национальная академия микологии, 2005. — 336 с.

Пятый том периодического сборника «Успехи медицинской микологии» включает работы, посвященные современному состоянию генетики и геномики грибов, российским достижениям и дальнейшим перспективам в генодиагностике микозов и молекулярно-генетических исследований в медицинской микологии.

Представлены новые данные о природе и патогенных свойствах грибов, имеющих значение для медицины. Особая глава посвящена микозологии и содержанию болезнетворных грибов в современном окружении человека. С этим тесно связаны проблемы микогенной аллергии и иммунопатологии, связанной с грибами, а также микотоксикологии. Описаны новые методы диагностики и лечения микотоксикозов и отравлений грибами.

Грибные биотехнологии сегодня открывают эпоху новых лекарственных препаратов и биологически активных веществ в медицине. Наряду с этим растет опыт медицинского использования культивируемых грибов, фунготерапии.

Завершает том раздел, содержащий результаты ведущегося поиска перспективных антимикотиков и новых методов лечения микозов, а также новые данные по чувствительности и резистентности к современным противогрибковым препаратам. Издание составлено на основе материалов Третьего Всероссийского конгресса по медицинской микологии.

ББК 28.591
УДК 58-616.5
У78

Издано в Российской Федерации в рамках программы
Национальной академии микологии

© Национальная академия микологии, 2005
© Медицина для всех, оформление, 2005

ПРЕДИСЛОВИЕ

Третий Всероссийский конгресс по медицинской микологии – закономерное и вместе с тем знаковое событие, характеризующее развитие этой новой отрасли медицины в нашей стране. Совершенствование медицинской микологической службы возможно, прежде всего, за счет внедрения результатов новых исследований в практику здравоохранения, повышения уровня знаний врачей всех специальностей в области медицинской микологии. Эти задачи поставлены перед новым Всероссийским конгрессом, на их реализацию направлено настоящее издание.

В современной России сохраняются многие приоритеты медицинской микологии, относящиеся как к изучению природы болезнетворных грибов, так и вызываемой ими патологии – микозов, микотоксикозов и микогенной аллергии.

Ведутся исследования молекулярной генетики и геносистематики грибов, имеющих значение для медицины. Впервые в мире отечественными учеными-микологами и генетиками в тесном сотрудничестве с клиницистами созданы технологии для прямой диагностики основных возбудителей контагиозных микозов в клиническом материале. Новые молекулярные методы внедряются в генодиагностику особо опасных микозов и микотоксикологию.

Продолжаются исследования патогенности и токсигенности грибов, их значения как причинных факторов аллергии и иммунопатологии, роли в современном окружении человека – от общего распространения в природных условиях различных регионов России, на промышленных объектах и в жилищах до специфических условий обитаемых космических объектов. Болезнетворное влияние токсинов микроскопических грибов по-прежнему находится в фокусе внимания российских микотоксикологов, совершенствующих и предлагающих новые методы диагностики и предотвращения этих заболеваний. В целом обобщен опыт изучения отравлений видами грибов, распространенными в России и соседних странах.

В грибной биотехнологии достигнуты важные успехи, обещающие прорыв во многих областях медицины и фармации за счет поступления новых лекарственных препаратов и биологически активных веществ на основе грибов. Взаимодействие врачей и биотехнологов в этом направлении поможет внедрить эти соединения в практику уже в ближайшее время. Традиционное использование съедобных грибов в медицинских целях получило развитие в новой отрасли, близкой к медицине – фунготерапии.

Не останавливается поиск перспективных противогрибковых препаратов и новых методов воздействия на болезнетворные грибы и лечения

грибковых заболеваний. Самостоятельно и в рамках международных проектов в России продолжается изучение и мониторинг чувствительности и устойчивости основных возбудителей микозов к антимикотикам, находящимся в современном клиническом обращении.

В клинической области развитие отечественной медицинской микологии заметно как в традиционных для нее направлениях: дерматологии, онкогематологии, педиатрии, так и в специальной клинике (офтальмология, оториноларингология), на фоне особых патологий – ВИЧ-инфекции и СПИД. Накоплен и во многом обобщен клинический опыт, формируются доказательные стандарты клинической и лабораторной диагностики и терапии.

Наиболее массовые грибковые заболевания человека, поражающие миллионы людей в нашей стране и за ее пределами, являются объектом изучения клиницистов и врачей лабораторной диагностики, биомедицинских исследователей. Полученные эпидемиологические данные позволили не только охарактеризовать картину заболеваемости и ее динамику, но и предложить принципиально новые методы профилактики контагиозных микозов, недоступные за рубежом: массовые лечебно-профилактические кампании и национальные санитарно-просветительные проекты на основе высоких технологий.

Прогресс в терапии грибковых инфекций человека стал особенно заметен с поступлением в клиническое обращение противогрибковых препаратов новых поколений – сначала пероральных антимикотиков, затем липидных форм полиеновых антибиотиков и, наконец, препаратов новых классов, действующих на уникальные для грибов мишени. В то же время, внедрение новых препаратов в практику врачей столкнулось с разными проблемами – от соответствия разных лекарственных препаратов и их форм до сравнительной оценки их эффективности и безопасности, фармакоэкономических аспектов. Эти вопросы неоднократно изучались и обсуждались врачами разных специальностей, оставаясь актуальными до настоящего времени. Соглашение по рациональным стандартам диагностики и терапии разных форм микозов может быть достигнуто только в рамках общенационального форума по медицинской микологии. Для этого необходим открытый обмен мнениями, всестороннее обсуждение полученных результатов исследований и клинического опыта, публикация всех новых материалов, посвященных внедрению новых терапевтических средств. Эти возможности предоставлены всем на страницах данного сборника и на заседаниях Конгресса.

Настоящее издание продолжает серию публикаций отечественных и зарубежных исследователей, включенных в ранее вышедшие тома сборника «Успехи медицинской микологии». Составленное на основе трудов Третьего Всероссийского Конгресса по Медицинской Микологии, оно отражает современные достижения медицинской микологии в России и мире.

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

Сергеев Ю. В.

Глава 1.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА В МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ. ГЕНОМЫ ГРИБОВ И ДОСТИЖЕНИЯ В ГЕНОДИАГНОСТИКЕ ГРИБКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНОМОВ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ СЕГОДНЯ

Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В.

Московская медицинская академия имени И. М. Сеченова

Национальная академия микологии

Москва

Геномные исследования и геномика грибов, имеющих значение для медицины достигли значительных успехов в последнее десятилетие. В небольшом пока списке выделенных геномов микроорганизмов заметны и многие грибные, в том числе известных видов патогенных или токсигенных грибов.

В настоящее время осуществлены проекты полного или частично секвенирования геномов главных возбудителей оппортунистических микозов человека: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* и *Cryptococcus neoformans*, диморфных агентов эндемических микозов *Histoplasma capsulatum* и *Coccidioides immitis* и других СПИД-ассоциированных инфекций (*Pneumocystis*), токсигенных грибов (*Fusarium graminearum*). Начаты новые проекты по изучению геномов других важных возбудителей, как родственных видов микроорганизмов с уже выделенными генетическими последовательностями (*Candida*, *Aspergillus*), так и представителей отдельных родов. Создана так называемая инициатива по изучению грибных геномов (FGI), сформированная вокруг американского центра генетических исследований (Интернет: <http://www-genome.wi.mit.edu/>). В рамках данного международного проекта осуществляется изучение геномов разных грибов и поиск новых и перспективных объектов для изучения. К концу 2003 г. общий список изучаемых и потенциальных объектов насчитывал 44 вида грибов. В проекте FGI поставлена цель фокусировки исследователей на основных, с точки зрения организаторов, видах, имеющих значение для медицины. После 4 видов, признанных главными (*C. albicans*, *A. fumigatus*, *H. capsulatum* и *C. immitis*) в первом из составленных списков потенциальных объектов изучения присутствовали также и другие известные возбудители микозов, как *Rhizopus oryzae*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus flavus* и *A. terreus* а во втором списке — и почти все основные патогенные (*Sporothrix schenckii*, *Penicillium marneffei*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Exophiala dermatitidis* и др.) и токсигенные (*Penicillium spp.*, *Fusarium spp.*, *Stachybotrys chartarum*) грибы. Геномы *Coccidioides immitis/posadasii* (штамм KS, размер генома 29 Mb) и *Rhizopus oryzae* (штамм RA99-880, размер генома 35 Mb), находятся в стадии секвенирования. Геномы *C. albicans*, *A. fumigatus* и *C. neoformans* были секвенированы и изучены разными коллективами.

Проект секвенирования генома *C. albicans* был начат в 1996 г. в Стэнфордском геномном техническом центре (США). Для получения дробных последовательностей всего генома был использован штамм

SC5314. В 1998 г. было получено 1,5-кратное покрытие гаплоидного генома (16 Mb), впоследствии секвенирование достигло 10,4-кратного покрытия, которое используется в текущих сборках. Полученные последовательности несут номер версии сборки и собственный номер. Всего было собрано 1213 последовательностей с размером более 2 kb, самая крупная из них — 282 kb, общим размером 17,4 Mb (6 сборка). Это превышает размер гаплоидного генома из-за отдельных сборок гетерозиготных зон. Трансляция последовательностей выявила наличие 9168 OPR, кодирующих белки из 100 аминокислот и более.

Митохондриальная ДНК не вошла в общее число собранных последовательностей. Проблемы сборки заключались в диплоидной природе *C. albicans*, что приводило к высокой степени фрагментации. К настоящему времени эти проблемы в целом решены. Последняя 19 сборка, представляет усовершенствованную реконструкцию диплоидного генома *C. albicans*.

Информация и базы данных последовательностей в настоящее время находятся на сервере проекта (адрес в Интернет: <http://www.sequence-stanford.edu/goup/candida>).

Проекты изучения генома *Aspergillus spp.* были начаты разными исследовательскими коллективами и организациями из ряда европейских стран и США в 2000–2001 г. Для исследований был использован клинический штамм Af293. После разработки общей стратегии секвенирования, включавшей использование искусственных бактериальных хромосом (BAC) и дробное секвенирование генома, центры в Великобритании (институт Сангера) и США (Институт геномных исследований) приступили к реализации проекта, предусматривавшего создание BAC-библиотек, создания физической карты и секвенирования 10 связанных BAC-клонов, а затем — WGS-секвенирования.

К настоящему времени секвенирование генома *A. fumigatus* в целом завершено, однако доступны для аннотации и используются материалы, рассматриваемые как предварительные. Удалось получить 10-кратное покрытие генома *A. fumigatus*. Общий размер последовательностей, полученных совместными усилиями двух центров, составил 28,6 Mb. Сюда входит 9744 генов, в том числе около 4300 функциональных. Кодирующая часть секвенированного генома *A. fumigatus* составляет 49,1%, средняя длина гена — 1,4 Kb. Плотность генов оценена как 1 на каждые 3 kb выделенных последовательностей. Более 75% генов имеет интроны, в среднем по 2,7 с размером 122. Данные доступны в Интернет по адресу: <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1>. Общий размер генома *A. fumigatus* оценивался также как 32 или 35 Mb.

Для анализа результатов секвенирования, аннотации и дальнейшего изучения генома *A. fumigatus* и других видов (*A. nidulans*) создана система CADRE (центральный репозиторий данных по *Aspergillus*). В настоящее время пройдено тестирование данной системы на основе имеющихся результатов секвенирования *A. fumigatus*, полученных англ-

лийскими исследователями, собравшими 922 кб последовательностей к концу 2003 г. на основе 16 ВАС-клонов. Всего в данной сборке предполагается наличие 341 генов.

Многие гены *A. fumigatus* были аннотированы ранее, еще до завершения основных работ по секвенированию всего генома, данные содержатся в нескольких общедоступных базах данных. Перечень всех аннотированных к началу 2001 г. генов *A. fumigatus* соответственно их функциям доступен в Интернет на сайте, посвященном *Aspergillus* по адресу: <http://www.aspergillus.man.ac.uk>.

В различной степени реализации находятся проекты изучения других видов *Aspergillus*, в частности — *A. flavus* (США). Секвенирование этого генома (штамм NRRL3357) будет вестись до 6-кратного покрытия. Секвенируются или уже получены геномы *A. nidulans* (разные проекты, размер генома около 31 Мб), а также *A. niger* (один из проектов завершен, размер генома 34,5 Мб или 14000 ОРС), *A. parasiticus* (США), *A. terreus* и *A. oryzae* (США). Завершение текущих геномных проектов разных видов *Aspergillus* и их аннотация позволят охарактеризовать и сопоставить гены, имеющие значение в патогенезе обусловленных аспергиллами заболеваний. Как и в случае с разными *Candida spp.*, исследователи надеются оценить степень консервации различных генов (например, сопоставляя *A. fumigatus*, *A. niger* и *A. nidulans*) и кодируемых ими функций, в частности — образования различных метаболитов.

Для изучения *C. neoformans* были начаты разные геномные проекты. Американские исследовательские коллективы начали секвенирование геномов трех штаммов *C. neoformans*: серотипа А (штамм Н99) и D (штаммы JEC21 и В3501), а канадские — секвенирование австралийского штамма *C. neoformans var. gattii* (серотип В, штамм WM276).

Проект секвенирования генома *C. neoformans*, штамм JEC21, проводится Институтом геномных исследований США (TIGR) с целью дополнить аналогичный проект Стэнфордского института и обеспечить дополнительное 4-х кратное покрытие генома. К настоящему времени в данном проекте достигнуто 10,5-кратное покрытие, имеющиеся разрывы последовательностей постепенно удаляются. Собраны последовательности для 3 завершенных хромосом (2, 7 и 9). В задачи данного проекта также входит интеграция всех доступных данных секвенирования и автоматическая аннотация генома *C. neoformans* по мере поступления данных, уже создана физическая карта. Информация о проекте и данные доступны в Интернет по адресу: <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/cna1>. Полная реализация проекта, по заявлению разработчиков, предоставит исследователям первый открытый геном базидиомицетов, который мог бы послужить моделью для изучения и других организмов.

Проект секвенирования генома *C. neoformans* Стэнфордского центра геномных технологий был начат в 2000 г. и к середине 2001 г. было завершено WGS-секвенирование, обеспечившее 7-кратное пок-

рытие. Для секвенирования были использован штамм В-3501А. Затем усилия исследователей были объединены с разработчиками из TIGR, вместе достигшими 12–13 кратного покрытия. В последних сборках постепенно ликвидируются существовавшие разрывы полученных последовательностей. Полученные материалы группируются, чтобы отразить распределение по 14 хромосомам *C. neoformans*. Информация доступна в Интернет по адресу: <http://www-sequence.stanford.edu/group/C.neoformans/>.

Секвенирование генома *C. neoformans var. grubii* (серотип А), штамм Н99, организовано американским центром геномных технологий Университета Дюка. В разных центрах получены плазмидные и ВАС-последовательности, обеспечившие 10-кратное покрытие генома, размер которого оценивается в 19,5 Мб. В настоящее время проводятся работы по ликвидации остающихся разрывов последовательностей.

Постгеномные исследования предусматривают изучение функции продуктов выделенных генов из уже доступных целиком геномов. Для этого необходим анализ генома, аннотация и последовательное или целевое изучение его составляющих. В будущем это позволит разработку новых, более специфических методов генодиагностики, направленных на выявление генов, связанных с вирулентностью и экспрессируемых в ходе инфекции, что, в свою очередь, может послужить для разработки перспективных методов диагностики, лечения и профилактики микозов.

НАПРАВЛЕНИЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ПОСТГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В.

*Московская медицинская академия имени И. М. Сеченова
Национальная академия микологии
Москва*

Сегодня, когда в печати и сетевых источниках публикуются все новые данные по геномам возбудителей микозов, исследователи приближаются к открытиям отдельных факторов их вирулентности. Текущее состояние крупных генетических, а вернее геномных исследований, можно назвать именно введением в генетику грибов, имеющих значение для медицины, мостом к генетическим исследованиям ближайшего будущего. В настоящее время существует уже достаточно большое число молекулярных методов для манипуляций с генами многих

болезнетворных грибов. Они успешно использовались и используются во многих генетических исследованиях догеномной эпохи. Разные методы генетической трансформации, направленные на внедрение нового генетического материала, были созданы для *C. albicans* в 1986 г., и позднее были разработаны для разных *Candida spp.*, *C. neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* и ряда других возбудителей. Необходимость выделения генов для их идентификации сохраняется и после получения целых геномов. В частности, функции ряда генов *C. albicans* могут быть проверены с помощью *S. cerevisiae*, с помощью подобных методик были клонированы некоторые детерминанты филаментации и адгезии дрожжей. В настоящее время созданы эффективные методы удаления генов *C. albicans*, преодолевшие проблемы, связанные с диплоидностью данного организма. С целью изучения экспрессии на уровне генома применяют микромассивы ДНК, в частности для *C. albicans* и *H. capsulatum*. Для разных видов патогенных и условно-патогенных грибов используются разные системы репортеров и регуляторов экспрессии генов.

Исследования патогенеза и вирулентности ряда условно-патогенных грибов на основе получаемых геномов ведутся уже сегодня, хотя доступны и в перспективе будут доступны геномы только их отдельных штаммов. Общая тактика текущих исследований может быть охарактеризована как, во-первых, выделение и оценка генов, не обнаруженных у родственных непатогенных грибов, и, во-вторых, изучение тех генов, которые экспрессируются только во время инфекции. Прицельно разрушая те или иные гены, можно оценить важность кодируемых ими предполагаемых факторов патогенности, например литических ферментов. Возможно также определение транскрипционного профиля и экспрессии ряда генов *in vivo*, в ходе экспериментальной инфекции или взаимодействия с некоторыми клетками макроорганизма (например, макрофагами). Для выбора действительных генетических детерминант патогенности из нескольких возможных используют разные штаммы-мутанты, полученные с помощью вставочного мутагенеза и рекомбинантных ДНК, вводя их в организм лабораторных животных. После этого оценивают, какие именно мутанты выжили, т.е. с наличием каких именно генов можно ассоциировать способность вызывать инфекцию, или как отличается вирулентность штаммов разных мутантов. Важным является исключение из списка потенциальных генов вирулентности «домашних» генов и кодирующих жизненно необходимые метаболические процессы. Для изучения вирулентности грибов представляют интерес как гены, продукты которых непосредственно взаимодействуют с тканями макроорганизма, так и регуляторы генов, экспрессируемых во время инфекции.

До эпохи молекулярно-генетических исследований были описаны многие факторы патогенности, например, литические ферменты разных грибов, адгезины *C. albicans* или капсула *C. neoformans*. Генетические

исследования позволили оценить значение некоторых из уже доказанных или предположенных факторов патогенности, найти их генетические детерминанты, а в ряде случаев — изучить регуляцию их экспрессии в ходе инфекции. Направления исследований по принципам «от признака к гену» проводились в догеномную эпоху и продолжают в настоящее время, переходя на геномный уровень. Так, сегодня известны гены, кодирующие секретируемые аспартил-протеиназы *C. albicans* (SAP), известны и хромосомы, на которых они располагаются.

Направления исследований «от гена к признаку» позволяют выделить новые факторы патогенности, если экспрессия новых, проверяемых или только искомым, генов обнаруживается в экспериментальной модели инфекции. Данный подход, в частности, был применен для поиска генов, кодирующих факторы, позволяющие выживать внутри макрофагов возбудителю гистоплазмоза — эндемического респираторного СПИД-ассоциированного микоза, одной из классических оппортунистических инфекций с внутриклеточной персистенцией возбудителя. Метод полимеразной цепной реакции с использованием обратной транскриптазы был использован для поиска генов *Histoplasma capsulatum*, экспрессирующихся при взаимодействии с макрофагами. Были найдены несколько м-РНК с повышенной и пониженной экспрессией, и только для одной из последовательностей были найдены соответствия в геномах других организмов и установлен продукт ее трансляции.

Обобщая накопленный опыт молекулярно-генетических исследований патогенности возбудителей грибковых инфекций, можно констатировать, что для некоторых из ранее известных факторов патогенности были найдены кодирующие их гены, и в отдельных случаях удалось подтвердить или опровергнуть значение участие данных факторов в патогенезе микозов на генетическом уровне. Было выделено несколько новых генов, экспрессия которых отмечается в ходе инфекции или приводит к большей вирулентности гриба-возбудителя; охарактеризованы их продукты. По мере завершения новых геномных проектов число таких генов и, соответственно, число потенциальных факторов патогенности будет увеличиваться. В то же время, даже располагая сведениями о многих доказанных факторах патогенности, трудно составить картину патогенеза и общего «поведения» возбудителей в ходе инфекции. При этом следует делать поправки на наличие разных форм и стадий инфекции, вызванных теми же возбудителями, разницу в изучаемых штаммах грибов и отличия между моделями инфекции — разными лабораторными животными и условиями макроорганизма человека. Независимо от полученных и имеющих быть полученными данных останется в силе наше представление о патогенезе грибковых заболеваний — заведомо многофакторном.

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ БИОМАССЫ ЛИТОБИОНТНЫХ ГРИБОВ

¹Быков В.Ю., ²Богомолова Е.В.

¹ Санкт-Петербургский государственный университет

² Ботанический институт имени В.Л. Комарова РАН
Санкт-Петербурге

Литобионтные грибы представляют собой специфическую экологическую группу обитателей каменистых субстратов как природного, так и антропогенного происхождения. С таксономической точки зрения литобионтные грибы достаточно разнородны, однако большинство видов относятся к группе так называемых черных дрожжей, многие из которых являются оппортунистическими патогенами человека.

Морфология литобионтов, особенно в естественных условиях обитания, достаточно однотипна, а спороношение в культуре часто не достигается. Следовательно, для идентификации таких грибов возникает необходимость привлечения современных подходов, в частности, применение молекулярно-биологических методов. Нами был проведен подбор метода экстракции ДНК, подходящего для большинства основных представителей группы литобионтов.

Работа проводилась на штаммах литобионтных микромицетов, изолированных в разные годы с мрамора и известняка и хранящихся в коллекции лаборатории общей биофизики НИИ Физиологии имени А.А. Ухтомского СПбГУ. Данные виды составили тест-набор культур для проведения экстракции ДНК из грибной биомассы.

Штаммы литобионтных грибов, использованных в работе

Штамм	Место и дата сбора	Субстрат
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Белое море, 2003	мрамор
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Белое море, 2003	мрамор
<i>Coniosporium sp.</i>	Турция, 2001	известняк
<i>Phaeococcomyces chersonesos</i>	Херсонес, Крым, 1995	мрамор
<i>Phialophora verrucosa</i>	Род Айленд, США, 2000	известняк
<i>Ulocladium botrytis</i>	Херсонес, Крым, 1998	мрамор
<i>Ulocladium chartarum</i>	Херсонес, Крым, 1998	мрамор
<i>Ulocladium consortiale</i>	Херсонес, Крым, 1998	мрамор

Выбранные для работы штаммы культивировали на плотной среде Сабуро при температуре 20-25° С в течение 10 дней, затем биомассу аккуратно снимали с поверхности среды и далее проводили ее обработку по соответствующему протоколу.

Для сравнения были взяты 3 метода, известных по данным литературы и имеющих применение для различных групп грибов: 1) протокол с использованием буфера ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид (СТАВ-cetyltrimethylammonium bromide) (De Hoog, Horre, 2002); 2) ускоренный метод экстракции ДНК (rapid mini-preparation) (Liu et al., 2000); 3) метод, применяемый в генетике для работы с дрожжами (с применением зимолиазы, Laboratory of Jasper Rine at the University of California, Berkeley, USA, <http://www.bioprotocol.com/protocolstools>).

Качество и количество полученной ДНК проверялось при помощи гель-электрофореза и при последующем проведении ПЦР. Было установлено, что метод №3 не дает достаточной степени очистки ДНК, в результате чего в экстракте остаются ингибиторы ПЦР; при проведении ускоренного протокола количество ДНК может оказаться недостаточным, и также возможно присутствие ингибиторов ПЦР.

Таким образом, метод №1 можно считать наиболее надежно работающим на биомассе литобионтов и рекомендовать его для применения в молекулярно-биологических исследованиях данной группы грибов.

Литература

- De Hoog G. S., Horre R. Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory // *Mycoses*. 2002. Vol. 45. P. 259 – 276.
- Liu D., Coloe S., Baird R., J. Pedersen. Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR // *J. Clin. Microbiol.* 2000. Vol. 38(1). P. 471.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* И ТРИХОТЕЦЕНОВЫХ ТОКСИНОВ

Гагкаяева Т.Ю.¹, Левитин М.М.¹, Уй-Маттила Т.²

¹ Всероссийский НИИ защиты растений
Санкт-Петербург–Пушкин

² Lab. of Plant Physiology and Molecular Biology, Univ. of Turku
Финляндия

Идентификация видов *Fusarium*, основанная на морфологических характеристиках конидий, конидиогенных клеток и характере роста колоний чрезвычайно сложна, требует высокой квалификации и достаточных навыков, поскольку культуры грибов нестабильны и таксо-

номические признаки не всегда четко выражены (Билай, 1977, Booth, 1971, Gerlach, Nirenberg, 1982).

Поиски альтернативных методов быстрой и точной идентификации патогенов, изучение разнообразия на видовом и внутривидовом уровне ведутся во всем мире. В последние годы нашли широкое применение методы, основанные на использовании фрагментов ДНК в качестве молекулярно-генетических маркеров. Большое количество видоспецифичных праймеров основано на сиквенсе рибосомальной ДНК (rDNA). Маркированные части (nuclear small subunit) 18S, 5.8S и 28S рибосомальной ДНК высоко консервативны. Это позволяет изолировать ITS (internal transcribed spacer) и IGS (intergenic spacer) последовательности, которые располагаются между кодируемыми регионами, амплифицировать с помощью ПЦР и выявлять нуклеотидные последовательности уникальные для гриба (Schilling et al., 1996, Williams et al., 2002)

Молекулярно-генетическая идентификация особенно важна в тех случаях, когда затруднена традиционная морфологическая идентификация или возникают спорные ситуации. Кроме того, возможно выявление новых видов грибов, имеющих морфологически сходные характеристики с уже известными видами. Так, например, вид *F. langsethiae*, морфологически сходный с *F. poae*, четко выявляется с использованием специфических молекулярно-генетических маркеров (Torp, Langseth, 1999, Torp, Nirenberg, 2004, Wilson et al., 2004, Yli-Mattila et al., 2004).

С использованием молекулярно-генетических методов показана возможность выявления продуцирующих и не продуцирующих трихотеценовых токсинов у видов и штаммов грибов (Nicholson et al., 1998, Bakan et al., 2002). Молекулярная диагностика видов продуцирующих токсины ведется по сиквенсу Tri5 гена расположенного на 5' конце 28S региона рибосомальной ДНК (rDNA) и контролирующего первый этап синтеза трихотеценовых токсинов (Nicholson et al., 1998, Bakan et al., 2002, Knoll et al., 2002, Mirosha et al., 2003). Сравнительный анализ кластеров генов DON и НИВ- продуцирующих изолятов гриба *F. graminearum* выявил гены Tri7 и Tri13, которые активно функционируют у НИВ-продуцирующих изолятов и не функционируют, вследствие мутации, у DON - продуцирующих изолятов (Lee et al., 2001, 2002, Brown et al., 2004, Kim et al., 2003). Публикации последних лет показывают возможность оценки популяций гриба по частоте встречаемости DON и/или НИВ типов изолятов, используя метод ПЦР (Waalwijk et al., 2003, Jennings et al., 2004).

Кроме определения видов грибов и их токсинов в чистой культуре ведутся исследования по выявлению грибов и микотоксинов непосредственно в растительном материале (Nicholson et al., 1998, Williams et al., 2002). В наших исследованиях, в суммарном ДНК выделенном из зерна, ДНК гриба *F. avenaceum* выявлялась с использованием видоспецифичного праймера JIAf/g, если контаминация зерна ячменя была выше 1%, а яровой пшеницы выше 3%. ДНК гриба *F. graminearum* иденти-

фицировалась с использованием молекулярно-генетического праймера Fg11f/g при 3-5% зараженности зерна, а ДНК гриба *F. culmorum* с использованием праймера 175f/430g при 1-5% зараженности зерна (Yli-Mattila et al., 2004).

Дальнейшее развитие метод ПЦР несомненно получит в области количественного определения ДНК. Количественная ПЦР (ПЦР в реальном времени, real-time PCR) позволяет оценить накопление продуктов амплификации непосредственно в процессе проведения амплификации. Поскольку кинетика накопления продуктов амплификации напрямую зависит от числа копий исследуемой ДНК матрицы, то это дает возможность оценить исходное количественное содержание анализируемого объекта. Значительная корреляция была показана нашими экспериментами между количеством ДНК *F. graminearum* и количеством DON в образцах зерна яровой пшеницы и овса из России и Финляндии. Корреляция была выше, чем при морфологической идентификацией грибов *F. graminearum*/*F. culmorum* и уровнем DON. Количественные измерения ДНК патогенов могут быть использованы для прогноза развития фузариоза колоса, для оценки эффективности применяемых фунгицидов, для выявления контаминации растений и продуктов их переработки грибами и их метаболитами (Dooman et al., 1999, Edwards et al., 2001, Knoll et al., 2002, Stoyan et al., 2003, Reischer et al., 2004,).

Список литературы

1. Билай В.И. Фузариозы. Киев. 1977, 1 - 444.
2. Bakan B., Giraud-Delville C., Pinson L., Richard-Molard D., Fournier E., Brygoo Y. Identification by PCR of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol // Applied and Environmental Microbiology, 2002, 5472- 5479.
3. Booth C. The genus *Fusarium*. England. 1971, 1-237.
4. Brown D. W., Dyer R. B., McCormick S. P., Kendra D. F., Plattner R. D. Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster // Fungal Genetics and Biology, 2004, 41, 454-462.
5. Doohan F. M., Weston G., Rezanoor H. N., Parry D. W., Nicholson P. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of *tri5* gene by *Fusarium* species in vitro and in planta // Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65, 9, 3850- 3854.
6. Edwards S. G., Pirgozliev S. R., Hare M. C., Jenkinson P. Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against *Fusarium* head blight of winter wheat // Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67, 1575 – 1580.
7. Gerlach W., Nirenberg H. I. The genus *Fusarium* - a pictorial atlas // Mitt. Biol. Bundesanst Land-Forstw. Berlin-Dahlem, 1982, 209, 406.
8. Jennings P., Coates M. E., Walsh K., Turner J. A., Nicholson P. Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum*

- um isolates from wheat crops in England and Wales // Plant Pathology, 2004, 53, 5, 643-652.
9. Kim H.-S., Lee Th., Dawlatana M., Yun S.-H., Lee Y.-W. Polymorphism of trichothecene biosynthesis genes in deoxynivalenol - and nivalenol -producing Fusarium graminearum isolates // Mycol. Res., 2003, 107, 2, 190-197.
 10. Knoll S., Mulfinger S., Niessen L., Vogel R. F. Rapid preparation of Fusarium DNA from cereals for diagnostic PCR using sonification and an extraction kit // Plant Pathology, 2002, 51, 6, 728-734.
 11. Lee Th., Han Y.-K., Kim K.-H., Yun S.-H., Lee Y.-W. Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol - producing chemotypes of Gibberella zeae // Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68, 5, 2148-2154.
 12. Lee Th., Oh D.-W., Kim H.-S., Lee J., Kim Y.-H., Yun S.-H., Lee Y.-W. Identification of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of Gibberella zeae by using PCR // Applied and Environmental Microbiology, 2001, 2966-2972.
 13. Mirosha Ch.J., Xie W., Filho E. R. Chemistry and detection of Fusarium Mycotoxins. In book: Fusarium head blight of wheat and barley. Ed. by K. J. Leonard and W. R. Bushnell. APD Press. 2003, 144- 164.
 14. Nicholson P., Carter J. P., Chandler E., Simpson S. Pathogenicity and genetic diversity in Fusarium graminearum and relationship to nivalenol and deoxynivalenol. In book of abstracts: 7th European Seminar on Fusarium-Mycotoxins, taxonomy and pathogenicity. Poznan, Poland, September 2002. Poznan, 2002, 18.
 15. Nicholson P., Simpson D. R., Weston G., Rezanoon H. N., Less A. K., Parry D. W., Joyce D. Detection and quantification of Fusarium culmorum and Fusarium graminearum in cereals using PCR assays. Physiological and molecular Plant Pathology, 1998, 53, 17-37.
 16. Niessen M. L., Vogel R. F. Group specific PCR- detection of potential trichothecene-producing Fusarium species in pure cultures and cereal samples // Syst. Appl. Microbiol., 1998, 21, 618- 631.
 17. Reischer G. H., Lemmens M., Farnleiner A., Adler A., Mach R. L. Quantification of Fusarium graminearum in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan Probe // J. of microbiological methods, 2004, 59, 141-146.
 18. Schilling A. G., Moller E. M., Geiger H. H. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of Fusarium culmorum, F. graminearum and F. avenaceum // Phytopathology, 1996, 86, 515-522.
 19. Stoyan R. P., Edwards S. G., Hare M. C., Jenkinson P. Strategies for the control of Fusarium head blight in cereals // Plant Pathology, 2003, 44, 207-238.
 20. Torp M., Langseth W. Production of T-2 toxin by a Fusarium resembling Fusarium poae// Mycopathologia, 1999,147, 89-96.
 21. Torp M., Nirenberg H. I. Fusarium langsethiae sp. nov.on cereals in Europe// International J. of food microbiology, 2004, 95, 238-246.
 22. Waalwijk C., Kastelein P., de Vries I., Kerenyi Z., van der Lee T., Hesselink T., Kohl J., Kema G. Major changes in Fusarium spp. in the Netherlands // European J. of Plant Pathology, 2003, 109, 743-754.

23. Williams K. J., Dennis J. I., Smyl C., Wallwork H. The application of species –specific assays based on the polymerase chain reaction to analyse Fusarium crown rot of durum wheat // Australas. Plant Pathol., 2002, 31, 119-127.
 24. Wilson A., Simpson D., Chandler E., Jennings P., Nicholson P. Development of PCR as assays for the detection and differentiation of Fusarium sporotrichioides and Fusarium langsethiae//FEMS Microbiology Letter, 2004, 233, 69-76.
 25. Yli-Mattila T., Paavainen-Hahtala S., Parikka P., Konstantinova P., Gagkaeva T. Yu. Molecular and morphological diversity of Fusarium species in Finland and north-western Russia // European J. Plant Pathology, 2004, 110, 573-585.
- Yli-Mattila T., Mach R., Alekhina I. A., Bulat S. A., Koskinen S., Kullnig-Gradinger C. M., Kubicek C. P., Klemsdal S. S. Phylogenetic relationship of Fusarium langsethiae to Fusarium poae and F. sporotrichioides as inferred by IGS, ITS, -tubulin sicuence and UP-PCR hybridization analysis// International J. of food microbiology, 2004, 95, 267-285.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЦР И ТРАДИЦИОННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ КОКЦИДИОИДОМИКОЗА НА РАННЕЙ СТАДИИ ЗАРАЖЕНИЯ

*Гришина М.А., Ткаченко Г.А., Савченко С.С.,
Становая О.В., Антонов В.А., Лесовой В.С.,
Замараев В.С., Липницкий А.В.*

*Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт
Волгоград*

Кокцидиоидомикоз, который относят к особо опасным глубоким микозам, имеет ограниченный ареал распространения – юго-западная часть США, Мексика и другие страны Центральной и Южной Америки. Возбудитель этого заболевания – *Coccidioides immitis* – диморфный гриб. Заражение в естественных условиях происходит путём ингаляции артроспор с частицами пыли. В организме человека *C. immitis* чаще всего вызывает развитие хронического заболевания легких, но в 0,5% случаев происходит диссеминированное распространение инфекции с фатальным исходом. Опасности заражения подвергаются люди, посещающие эндемичные территории и пациенты при пересадке органов от больного кокцидиоидомикозом. Иммунодефицитное состояние макроорганизма увеличивает риск возникновения заболевания.

Отсутствии специфических симптомов заболевания и определённые недостатки традиционных методов исследования определяют сложность экспресс-диагностики кокцидиоидомикоза. При культуральном методе необходимо подтверждение диморфности гриба, что занима-

ет длительный срок, а серологические тесты для выявления антигенов гриба не эффективны, ввиду низкой чувствительности и недостаточной специфичности.

Учитывая, что *C. immitis* входит в перечень потенциальных агентов биотерроризма, крайне актуальна разработка высоко чувствительных и специфичных методов выявления кокцидиоидного гриба на ранних сроках заболевания.

Целью настоящей работы являлся сравнительный анализ эффективности серологического (РПГА), культурального методов и ПЦР при исследовании цельной крови экспериментально заражённых животных *C. immitis* на разных сроках после инфицирования.

Экспериментальной моделью являлись белые мыши. Заражение проводили внутрибрюшинно взвесью артроспор в дозах 102, 103, 104 КОЕ по 3 животных на каждую дозу. Кровь для исследования забиралась на 3, 5, 7, 11 сутки после заражения. При использовании культурального метода кровь высевали на скошенный агар Сабуро и инкубировали при $t -28^{\circ}\text{C}$ в течение 30 суток. Для РПГА из крови получали сыворотку, инаktivировали ее добавлением раствора мертиолята натрия (до конечной концентрации 0,01%) и прогреванием при 56°C в течение 30 минут, после чего сыворотку адсорбировали 50% эритроцитами барана. Для постановки РПГА использовали эритроцитарный иммуноглобулиновый противоккокцидиоидный диагностикум. При проведении ПЦР в кровь для предотвращения свёртывания добавляли 6% раствор ЭДТА (1/20), а для обеззараживания – раствор мертиолята натрия до конечной концентрации 0,01%.

ДНК выделяли из 200 мкл цельной крови гуанидин-фенол-хлороформной депротеинизацией с последующей очисткой методом нуклеосорбции. Олигонуклеотидные праймеры синтезированы в НПФ «ДНК-технология» (Москва). Амплификацию проводили в объеме 25 мкл в микроцентрифужных пробирках (500 мкл) на мультициклере «Терцик» (НПФ «ДНК-технология», Москва) с использованием «горячего старта». Реакционная смесь содержала: исследуемую ДНК, специфические олигонуклеотидные праймеры, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, буферный раствор и фермент Таq-полимеразу. На поверхность смеси наслаивали 30 мкл минерального масла. Анализ продуктов ПЦР осуществляли методом гель-электрофореза в 1,5 % агарозном геле с окраской фрагментов ДНК этидиумом бромидом и визуализацией в УФ-свете. Результаты оценивали по наличию или отсутствию фрагментов ДНК необходимого размера. Специфичность полосы амплифицированной ДНК подтверждалась ее положением по отношению к контрольным маркерным фрагментам.

Для идентификации *C. immitis* были подобраны праймеры CimMBP1s – CimMBP2as на основе нуклеотидных последовательностей гена MBP-1 (macrophage binding protein), представленных в базе данных GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). До начала экспе-

риментов проведенный анализ праймеров с помощью компьютерной программы BLAST не выявил гомологии с секвенированными нуклеотидными последовательностями близкородственных возбудителей особо опасных микозов и гетерологичных микроорганизмов, присутствующих в базах данных (EMBL, Genbank, DDBJ). Оптимизированы параметры ПЦР, обеспечивающие чувствительность реакции в концентрации 102 – 103 м.к./мл.

При определении специфичности праймеров в качестве гетерологичных микроорганизмов использовали 2 штамма *Blastomyces dermatitidis* и по 1 штамму *Histoplasma capsulatum*, *Histoplasma farciminosum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides cerebriiformis*, предоставленные коллекционным центром Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. С ДНК гетерологичных микроорганизмов синтез специфических ампликонов не регистрировали.

При проведении ПЦР во все сроки наблюдения реакция с применением праймеров CimMBP1s – CimMBP2as была положительна во всех пробах крови при дозах заражения 103 и 104 КОЕ, т.е. выявление ДНК *C. immitis* составило 100%. При дозе заражения 102 КОЕ – доля положительных реакций составила 66%.

Культуральный метод выявил возбудитель кокцидиоидомикоза только в одной пробе крови на 7 сутки после заражения в дозе 104 КОЕ, что составило 2,8 % от всех исследованных проб. Это подтверждает общепринятые данные о кратковременности периода фунгемии при кокцидиоидомикозе.

Серологический метод диагностики, направленный на выявление антигена *C. immitis* (РНГА) при заражении малыми дозами оказался не информативен. Положительные результаты были получены только на 11 день после заражения во всех группах животных. Вероятно, это связано с пределом чувствительности реакции, которая для эритроцитарного иммуноглобулинового противоккокцидиоидного диагностикума составляет 1×10^4 КОЕ/мл.

Полученные данные свидетельствуют о диагностической эффективности используемых в реакции амплификации праймеров CimMBP1s – CimMBP2as при исследовании цельной крови экспериментальных животных на ранних сроках заражения. Культуральный и серологический (РНГА) методы диагностики оказались мало пригодными на данном периоде развития инфекции.

Таким образом, полимеразную цепную реакцию можно использовать в качестве диагностического теста для постановки диагноза острого кокцидиоидомикоза ещё до развития клинических симптомов заболевания, что позволит в перспективе применить его как дополнение к традиционной схеме диагностики кокцидиоидомикоза.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ *KLUYVEROMYCES LACTIS*

Сухотина Н.Н., Наумова Е.С., Наумов Г.И.

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
Москва

В последние годы появились сведения о наличии среди дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* медицинских изолятов и возможной их патогенности. Показано, что по многим молекулярным маркерам клинические изоляты дрожжей *S. cerevisiae* похожи на пекарские штаммы и, вероятно, происходят от них (Hennequin et al., 2001; de Llanos et al., 2004). Среди молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis* также встречаются медицинские изоляты. Вид *Kl. lactis* имеет сложный состав и включает наряду с культурными молочными, усваивающими лактозу (*Lac+*), дрожжами *Kl. lactis var. lactis* и дикие штаммы *Lac-*. В частности, в Европе встречаются дикие *Lac-* дрожжи популяции "*krassilnikovii*".

С помощью рестриктазного анализа межгенного спейсера IGS2 рибосомальной ДНК, молекулярного кариотипирования и ПЦР-анализа с микросателлитным праймером (GTG)₅ мы провели сравнительное изучение 35 штаммов дрожжей *Kl. lactis* различного происхождения. Изученные дрожжи включали штаммы, изолированные из различных молочных продуктов, почвы, сокотечений деревьев и госпитальные штаммы.

Все штаммы имели практически идентичные молекулярные кариотипы с пятью хромосомными ДНК размером от 1000 до 2800 т.п.н. Рестриктазный анализ района IGS2 рДНК выявил два разных *AluI*-профиля. В первую группу вошли 27 штаммов *Kl. lactis var. lactis*, изолированных как из молочных продуктов, так и из клинических источников. Эти штаммы имели рестриктазные профили с четырьмя фрагментами размером около 650, 250, 200 и 100 п.н. Дикие европейские изоляты популяции "*krassilnikovii*" сформировали вторую группу (8 штаммов), которая характеризуется тремя фрагментами размером около 650, 450 и 100 п.н.

Был проведен ПЦР-анализ дрожжей с праймером (GTG)₅. Этот микросателлитный маркер имеет множественную локализацию в дрожжевом геноме, что позволяет сравнивать большое количество полиморфных локусов. Размеры фрагментов амплифицированной ДНК варьировали у разных штаммов от 400 до 2000 п.н. По сходству ПЦР-профилей с микросателлитным праймером (GTG)₅ все штаммы *Kl. lactis* были разбиты на четыре группы. Одну группу сформировали дикие штаммы "*krassilnikovii*". Остальные три группы представлены молочными дрожжами *Kl. lactis var. lactis*. Госпитальные штаммы попали во все последние три группы.

Таким образом, молекулярные данные свидетельствуют о близком родстве молочных и госпитальных штаммов. Ранее гибридологическим анализом установлено, что дикие европейские дрожжи "*krassilnikovii*" являются прародителями культурных молочных дрожжей *Kl. lactis var. lactis* (Naumov and Naumova, 2002). Эти дрожжи изолированы экологически, первые из природных мест обитания, не содержащих лактозу, а вторые из молочных продуктов. Учитывая, что медицинские изоляты способны сбраживать лактозу, они, очевидно, происходят от молочных дрожжей.

МЕТОДЫ ГЕНОСИСТЕМАТИКИ В РЕШЕНИИ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАДАЧ МИКОЛОГИИ

Шнырева А.В.

Кафедра микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова
Москва

Задачи геносистематики состоят в подборе и применении молекулярных маркеров (признаков) для установления/подтверждения филогенетических связей между таксонами разных уровней. Наряду с традиционными морфологическими критериями и при соответствующей статистической поддержке они позволяют более полно и точно определить пути эволюции и степень родства между группами организмов. Последовательности ДНК с полезной и значимой филогенетической информацией могут выступать участки генов, которые выполняют одну и ту же функцию во всех таксонах, эволюционируют приблизительно с одинаковой скоростью и представлены в геноме единичными копиями или ведут себя как однокопийные участки. К таким последовательностям, например, можно отнести гены рибосомальных РНК (рРНК) ядерных и митохондриальных геномов, гены цитохромоксидазы, факторы рибосомной элонгации белка. Собственно филогенетический анализ, основанный на мутациях в этих генах, позволяет определить степень дивергенции (расхождения) организмов от общего предка.

Большинство филогенетических анализов в царстве грибов сделано на основе кластера рибосомальных генов. В кластере помимо структурных генов 5.8S, 18S и 28S рРНК имеются транскрибируемые и нетранскрибируемые спейсерные участки (ITS, NTS, ETS), эволюция которых происходит с различной скоростью. Поэтому данные последовательности можно использовать при разделении таксонов различного уровня. Структурные гены более консервативны, поэтому их последовательности можно использовать для разграничения видов на уровне порядков. Межгенные спейсерные участки более вариабельны, поэтому они хороши для разграничения видов и родов. При этом практически не-

возможно подобрать какую-нибудь определенную генную последовательность, которая позволила бы установить все таксономические и эволюционные связи организма.

Итак, наиболее часто используемыми в анализе организмов надродового уровня выступают последовательности ядерных рРНК генов. Для разграничения видов и родов лучше подходят гены ферментов и структурных белков, представленные единичными копиями в геномах, анализ которых стал доступным благодаря ПЦР-методам. Чтобы увеличить разрешающую способность метода, амплифицированные рДНК-последовательности, например, подвергают рестрикционному анализу и секвенированию. К настоящему времени отсекуены гены 18S рРНК для многих видов грибов, на основе которых можно составить картину эволюционных связей в царстве грибов. Филогенетические деревья на основе 5.8S, 28S и ITS рРНК последовательностей были сконструированы для родов и видов *Fusarium*. При этом более информативными оказались последовательности 28S рРНК. Использование данных секвенирования рДНК последовательностей помогают установить связи между анаморфами и телеоморфами для видов грибов, которые в природе размножаются преимущественно бесполом способом, а половые структуры наблюдаются крайне редко. Интерес представляет высоковариабельная межгенная спейсерная область IGS, которая разделяет единицы транскрипции рРНК генов; эта область у большинства грибов содержит ген низкомолекулярной 5S рРНК и разнообразные факторы регуляции транскрипции. Сравнение отсекуенных IGS доменов позволяет установить генетические связи между грибными популяциями и индивидуумами, как например, для *Laccaria bicolor* (Martin et al., 1999).

Сравнение вариабельных участков гена большой субъединицы рДНК (LSU rDNA) позволило охарактеризовать родственные связи между 47 видами в пределах рода *Sordaria* монофилетического происхождения (Hopple, Vilgalys, 1999). В многочисленных исследованиях было показано, что последовательность ядерного гена LSU rDNA приемлема для установления филогенетических связей среди базидиомицетов как на уровне родов, так и семейств (Moncalvo et al., 2002). Можно утверждать, что геносистематика на основе рДНК последовательностей стала стандартным методом грибной таксономии.

К числу эволюционно значимым ферментам можно отнести гены ДНК полимераз, обратных транскриптаз, транспозаз, монооксигеназ, гены типов спаривания и др.. В последнее время успешно были использованы последовательности топоизомераз для видовой и внутривидовой идентификации патогена человека *Aspergillus flavus*, видов рода *Candida*.

Молекулярные маркеры приобретают особое значение при разграничении видов грибов, размножающихся исключительно клонально (бесполом способом) в природных популяциях, когда нужно определить границы видов, а установить репродуктивные барьеры невозмож-

но. В этом случае относительно консервативные последовательности генов рДНК вряд ли окажутся полезными, и на помощь могут прийти более вариабельные участки ДНК, например, разнообразные повторяющиеся последовательности, изучаемые с помощью ПЦР фингепринтинга. При этом для более точной реконструкции деревьев на уровне видов необходимо расширять набор используемых полиморфных ДНК признаков. Интересным примером использования RAPD ПЦР фингепринтинга является анализ вегетативных клонов базидиального гриба *Armillaria bulbosa*, в результате чего было показано, что один клон (генет) может занимать площадь до 37 акров в лесах штата Мичиган. У другого базидиомицета *Pleurotus pulmonarius* распространение генетически сходных вегетативных клонов ограничено лишь отдельным субстратом (собственные исследования).

RAPD ПЦР был использован нами для выявления резидентной микобиоты на орбитальном комплексе “Мир” – штаммов грибов видов *Penicillium*, существующих длительные сроки.

Подводя итог, следует заметить, что необходим индивидуальный подход в выборе ДНК признаков для каждого конкретного случая.

РОССИЙСКИЙ ОПЫТ И ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕНОДИАГНОСТИКИ ГЛАВНЫХ ФОРМ ДЕРМАТОФИТИИ

Сергеев А.Ю., Щербо С.Н., Богуш П.Г.,
Лещенко В.М., Сергеев Ю.В., Мокина Е.В.

Национальная академия микологии
НПФ «Гентех»
Москва

Опыт мировой дерматологической практики показывает, что эффективность традиционных методов диагностики микозов кожи и ногтей – микроскопии патологического материала и выделении культуры возбудителя – достигла своего предела и не является оптимальной. Это особенно важно ввиду чрезвычайной распространенности дерматофитии – единственной действительно контагиозной грибковой инфекции, поражающей миллионы граждан России.

В этом отношении значительный интерес представляет разработка прямых зондов для определения генетического материала дерматофитов непосредственно в патологическом материале. Особые перспективы представляет обнаружение генетических маркеров *T. rubrum*, как обуславливающего подавляющее большинство случаев дерматофитии ногтей в России.

В 2004 г. в России были разработаны первые генетические зонды для прямой диагностики дерматофитии кожи, волос и ногтей. Данный проект был инициирован Национальной академией микологии сначала для изучения возможности применения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в выявлении *Trichophyton rubrum* в клинических образцах. Затем был создан аналогичный метод для *Trichophyton mentagrophytes*. Предварительный анализ показал, что создание видоспецифичных генетических маркеров для дерматофитов в принципе возможно, несмотря на то, что эффективного опыта прямой генетической диагностики дерматофитии в клинических образцах за рубежом до сих пор не имеется. В исследованиях зарубежных авторов, использовавших молекулярные методики, последние были применены либо к идентификации выделенных видов в культуре, либо к чисто исследовательским задачам (изучение биоразнообразия дерматофитов и молекулярно-генетические методы совершенствования таксономии). Для практических целей предлагались либо трудоемкие многоступенчатые алгоритмы, либо общие для грибов метки.

В настоящем исследовании был проанализирован именно клинический материал от больных онихомикозами, собранный в нескольких дерматологических и микологических центрах г. Москвы. Культуры дерматофитов были выделены и предоставлены лабораториями Городского микологического центра и ЦКБ МЦ УДП РФ. Изученные образцы были получены от больных с клиническим диагнозом онихомикоза, причем для каждого было выполнено исследование под световым микроскопом (с КОН просветлением), посев на среду Сабуро с дальнейшей идентификацией. Генетический материал в полученных образцах определяли методом ПЦР. Аналогичные исследования выполнялись для образцов материала, полученных от лиц без онихомикоза.

Методом ПЦР были проверены культуры дерматофитов следующих видов: *Trichophyton rubrum* (1), *Microsporum canis* (2), *Epidermophyton floccosum* (3), *Trichophyton violaceum* (4), *Trichophyton tonsurans* (5), *Trichophyton mentagrophytes* var. *gypseum* (6), *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* (7).

Подтвержденная видоспецифичность полученных меток позволила приступить к первичному тестированию чувствительности и специфичности в клинических условиях. С этой целью были обследованы 44 пациента, из них 23 образца представляли собой ногтевые пластинки с клинической картиной дерматофитии и 21 образец – здоровые ногтевые пластинки (без клинического диагноза и с отрицательным результатом лабораторного исследования).

Изучаемые образцы направлялись в НПФ «Гентех» с условной маркировкой без указания диагноза и результатов микроскопии и культурального исследования (слепой метод).

Из 21 образца из ногтевых пластинок здоровых лиц все показали отрицательные результаты при микроскопии исследовании и посеве. В

ПЦР-анализе 20 образцов данной из группы были отрицательными и 1 образец (проба № 8) показал слабо-положительный результат. Из 23 образцов с клинической картиной дерматофитии 17 показали положительные результаты на *T. rubrum* всеми тремя методами исследования, 3 образца (№№ 7, 27, 30) были положительны в ПЦР-анализе и при посеве на среду Сабуро и отрицательны в прямой микроскопии. У 3 образцов из данной группы, имевших клиническую картину онихомикозов, *T. rubrum* не был выявлен ни одним из методов, но в культуре был выделен *T. mentagrophytes*.

По результатам проведенного исследования, чувствительность изученного метода ПЦР-диагностики дерматофитного онихомикоза составила 94,4%, а специфичность – 95,2%. Общая расчетная точность диагностической методики составила 94,8%. Это существенно превышает отдельную и совокупную чувствительность микроскопии и культивирования. Таким образом, в России впервые разработан прямой ПЦР метод для определения генетического материала главного возбудителя онихомикоза *T. rubrum*. В настоящее время Национальная академия микологии продолжает исследование по внедрению нового метода в клиническую практику. В настоящее время завершается многоцентровое исследование, одной из задач которого будет сопоставление результатов микроскопии, культивирования возбудителей и новых методов генодиагностики в клинических условиях.

Успех в разработке методов ПЦР-диагностики дерматофитии должен стать важным звеном в победе над контагиозными грибковыми инфекциями в России и является свидетельством ее глобального приоритета в этом направлении.

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ПРЯМОЙ ГЕНОДИАГНОСТИКИ МИКРОСПОРИИ В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Сергеев А.Ю., Богуш П.Г., Щербо С.Н.,
Литвинова Н.А., Лещенко В.М., Сергеев Ю.В.

Национальная академия микологии
Городской микологический центр
Клинический кожно-венерологический диспансер №1
НПО «Гентех»
Москва

Первые успехи генодиагностики диагностики дерматофитии дали возможность разработки нового диагностического теста для другой массовой контагиозной инфекции – микроспории. В настоящее время *Microsporum canis* обеспечивает до 90% всех зоонозных форм дерматофитии и *tinea capitis* в России, Восточной и Центральной Европе,

преобладая у городского населения. Существовавшие до настоящего времени методы диагностики – микроскопия патологического материала (чешуйки кожи, волосы) и культивирование *M. canis* – в целом зарекомендовали себя более высокой чувствительностью, чем при онихомикозе, однако данные показатели нельзя признать оптимальными. Кроме того, традиционные методы диагностики связаны со значительными временными и материальными затратами, которые ограничивают их массовое применение.

Для разработки перспективных методов генодиагностики микроsporии в рамках программы Национальной академии микологии было произведено настоящее исследование. На текущем этапе была оценена диагностическая эффективность набора реагентов «МиканАм», созданного впервые и применяемого с помощью метода ПЦР для обследования пациентов с диагнозом микроsporия.

Методы: В настоящей работе была обследована группа пациентов, обратившихся в КВД № 1 г. Москвы. На основании клинических данных в исследование были отобраны пациенты ($n = 21$) с диагнозом микроsporия и другими заболеваниями кожи. Материалом для исследования служили образцы соскобов эпидермиса с волосистой части головы, эпидермиса гладкой кожи и волос. Все полученные образцы были исследованы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением набора реагентов «МиканАм» НПФ «Гентех» (г. Москва) и одновременно – традиционным методом культивирования на среде Сабуро с целью выделения и идентификации *M. canis* по совокупности морфо-физиологических характеристик. Чувствительность набора реагентов «МиканАм» в настоящее время составляет 102 копий на мл исследуемого раствора.

Результаты: В ходе исследования было установлено, что из 100% образцов ($n = 21$), включенных в исследование в 57,2% случаев ($n = 12$) методом ПЦР и в 61,9% случаев ($n = 13$) микологическим методом был обнаружен вид *M. canis*, а в 42,9% ($n = 9$) и 38,1% ($n = 8$) случаев соответственно отрицательный результат. Разница полученных результатов может объясняться не верным забором материала для ПЦР-диагностики. Клиническая чувствительность метода составила 95% (совпадение результатов двух методов у 20 пациентов).

Выводы: Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что набор реагентов «МиканАм» может применяться при обследовании пациентов с предварительным диагнозом микроsporия. В настоящее время накапливается материал, позволяющий сопоставить чувствительность и специфичность метода по сравнению с традиционными средствами диагностики.

Молекулярно-генетические методы могут эффективно применяться в диагностике *M. canis*, как в целях клинической диагностики, а также для контроля излеченности, проведения массовых скрининговых обследований и изучения контаминированных возбудителем факторов передачи.

Глава 2.

НОВЫЕ ДАННЫЕ О ПРИРОДЕ И ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВАХ ГРИБОВ, ИМЕЮЩИХ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

СПЕКТРЫ ЭПР ТЕМНООКРАШЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ В ИЗМЕНЯЮЩЕЙСЯ СРЕДЕ

Богомолова Е.В., Панина Л.К., Пролетарский А.Ю.,
Сухаржевский С.М., Цуканова В.Т.
Санкт-Петербургский государственный университет
Санкт-Петербург

Меланиногенез – одна из основных адаптивных неспецифических реакций микромицетов, обеспечивающих устойчивость грибных клеток в состоянии стресса. Исследование различных аспектов меланиногенеза представляется весьма актуальным, так как меланинсодержащие виды часто встречаются в экологических группах грибов, играющих негативную роль в жизнедеятельности человека (патогены человека, фитопатогены, биодеструкторы и др.) и могут иметь общие механизмы адаптации к среде обитания. Несомненного внимания в этой связи заслуживают гипотеза и факты, свидетельствующие о меланинах как факторе вирулентности у грибов патогенов человека (Polak, 1989; Brakhage et al., 1999). Так, в работе (Brakhage et al., 1999) показано, что неокрашенные мутанты более чувствительны к окислению *in vitro* и более подвержены разрушению человеческими моноцитами, чем меланинсодержащие штаммы, что вероятно и является причиной устойчивого развития последних в организме. Исследования последних лет показали, что существует ген, ответственный за меланиногенез, обозначенный *pksP* (*polyketide synthase involved in pigment biosynthesis*).

Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) грибной биомассы темноокрашенных микромицетов, принадлежащих разным таксономическим группам (30 штаммов, включая *Hormonema dematioides*, *Alternaria alternata*, *Exophiala jeanselmei*, *Phaeotheca sp.*, *Phoma glomerata* и др.), а также синтетический аналог меланина производства фирмы Sigma, полученный окислением тирозина пероксидом водорода были исследованы в X- и Q-диапазонах. Мы показали, что спектр изолированного DHN-меланина представляет собой отдельный хорошо разрешенный сигнал со структурой (вероятно, из-за анизотропии g-фактора), характерной для веществ акцепторного типа со значениями g-фактора, изменяющемся в пределах 2,0036–2,0042 с полушириной Δ порядка 4–7 Э. Спектр синтетического меланина представляет собой синглет с g-фактором равным 2.0037.

При измерении спектров ЭПР в Q-диапазоне ($\gamma = 8$ мм), отличающемся большей разрешающей способностью, в сухой биомассе исследованных штаммов удалось впервые обнаружить сложную линию спектра (Diakumaku et al., 1995; Панина и др. 1997). По форме спектра в Q-диапазоне можно заключить, что спектр является суперпозицией

сигналов, и состоит по крайней мере из двух линий, которые предположительно соответствуют двум разным ПЦ, обнаруженным во всех исследованных штаммах грибов. Число парамагнитных центров того и другого типа варьирует в любой грибной культуре.

На примере меланинсодержащих грибов *Phialophora sp.*, были проведены сравнительные исследования спектров ЭПР сухой биомассы клеток, выращенных на питательных средах разного состава: Чапека-Докса, Сабуро, овсяном агаре. Визуально биомасса имела разную окраску от черной до светло-серой. Пробы массой 1,5–2 мг растирались в агатовой ступке. Исследования проводились на спектрометре ЭПР РЭ-1308 при комнатной температуре.

Были изучены кривые насыщения сигнала ЭПР грибной массы в зависимости от уровня СВЧ-мощности. Методом линейных анаморфоз показано, что насыщение сигнала ЭПР происходит по двум механизмам. На кривых насыщения выбраны условия измерения спектров ЭПР грибов *Phialophora sp.* ($P_{\text{свч}} = 0.5$ мВт) для вычисления значений g-фактора. Спектр представляет собой анизотропную линию, характерную для парамагнитного центра с аксиальной симметрией и значениями g-факторов: $g_{\parallel} = 2.0039$ и $g_{\perp} = 2.0025$. Наличие одного сигнала, но двух механизмов насыщения может свидетельствовать о существовании двух физически одинаковых парамагнитных центров, характеризующихся различным обменом энергии с ближайшим окружением. Сравнение спектров ЭПР различных проб показало, что они характеризуются различным соотношением количества центров, в пробах одного и того же вида грибов *Phialophora sp.*, выращенных на разных питательных средах.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что за пигментацию отвечает лишь один парамагнитный центр, формирование которого индивидуально для отдельного вида грибов, а также зависит от среды культивирования.

Литература

1. Панина Л.К., Бадалян А., Богомолова Е.В., Волленциен У., Горбушина А. А., Крумбайн В., Сухаржевский С.М. Спектры ЭПР темноокрашенных микромицетов, изолированных с мрамора // Микол. и фитопат. 1997. Т.31. в.1. С.46-51.
2. Brakhage A., Langfelder K., Jahn B., Schmidt A., Wanner G. Melanin biosynthesis and virulence of *Aspergillus fumigatus* // Proc. Res. Conf. Human fungal pathogens: fungal dimorphism and disease. Granada., 1999. P. 17.
3. Diakumaku E., Gorbushina A., Krumbein W. E., Panina L. K., Soucharjevski S. Black fungi in marble and limestones – an aesthetic, chemical and physical problem for the conservation of monuments. // Sci. Tot. Environment. 1995. Vol. 167. P. 295-304.
4. Polak A. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi // Mycoses. 1989. Vol. 33(5). P. 215-223.

АКТИВНОСТЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *CRYPTOCOCCUS* *NEOFORMANS*

Васильева Н.В., Богомолова Т.С.,
Чилина Г.А., Михайлова М.А., Выборнова И.В.

НИИ медицинской микологии имени П.Н. Кашкина СПбМАПО
Санкт-Петербург

Криптококкоз – угрожающая жизни грибковая инфекция, поражающая преимущественно лиц с дефектами иммунной системы. Подавляющее число случаев криптококкоза обусловлено видом *Cryptococcus neoformans*, распространенным по всему миру. К факторам, определяющим патогенность *C. neoformans*, относят способность образовывать полисахаридную капсулу и расти при 37°C, тип спаривания, а также ряд внеклеточных ферментов, продуцируемых этим грибом. Имеются доказательства того, что уреазы криптококка способствуют преодолению гематоэнцефалического барьера при диссеминации возбудителя из первичного очага в легких через кровоток в мозг больного. Показано, что фенолоксидаза *C. neoformans* участвует в размножении гриба в ткани мозга. Фосфолипаза криптококка, воздействуя на мембраны фаголизосом, благоприятствует выживанию гриба в фагоцитах.

Целью работы было изучить активность уреазы, фенолоксидазы и фосфолипазы у штаммов *C. neoformans*, выделенных от больных криптококкозом в России в период с 1990 по 2004 год.

В исследование были включены 28 штаммов *C. neoformans* с различной вирулентностью (средние летальные дозы для белых мышей при внутривенном введении варьировали от 103 до 107 клеток гриба на мышь).

Методы. Уреазную активность штаммов определяли на агаре Христенсена с мочевиной. Критерием оценки активности уреазы служила степень окрашивания среды в малиновый цвет после трех суток выращивания гриба при 28°C. Фенолоксидазную активность изолятов криптококка определяли на агаре с L-дигидроксифенилаланином. Об активности фенолоксидазы судили по интенсивности образования коричневого пигмента (меланина) при культивировании гриба в течение трех суток при 28°C. Фосфолипазную активность штаммов *C. neoformans* изучали на агаре с яичным желтком. Определяли соотношение диаметра зоны помутнения среды к диаметру колонии гриба после трех суток выращивания при 37°C (Pz).

Результаты. Все изученные штаммы *C. neoformans* проявили уреазную активность, причем у 30% штаммов уровень активности уреазы был снижен по сравнению с остальными изолятами. По фенолоксидазной активности штаммы криптококка можно было разделить на три группы: 1) штаммы с низкой фенолоксидазной активностью; 2) штам-

мы со средним уровнем активности фенолоксидазы; 3) штаммы с высокой активностью фенолоксидазы.

Фосфолипазная активность изолятов криптококка широко варьировала от полного отсутствия зоны помутнения желточного агара вокруг колонии гриба (шт. 719) до значений Pz 0,3-0,4 у некоторых штаммов. Показательно, что шт. 719, характеризующийся низкой вирулентностью для лабораторных животных, обладал также и низкой фенолоксидазной активностью, и пониженной активностью уреазы.

Выводы. Клинические изоляты *C. neoformans* различаются по уровню активности ферментов, определяющих вирулентность возбудителя, что, вероятно, может влиять на течение и исход заболевания у больных криптококкозом.

МЕХАНИЗМ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК К РЯДУ ФУНГИЦИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ, ВЫЗВАННОЙ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

Громозова Е. Н., Войчук С.И.

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины
Киев, Украина

На сегодняшний день существует ряд объяснений явления резистентности микроорганизмов к антибиотикам [Fluit et al., 2001; Xu et al., 2000]. Однако механизмы появления резистентности во многом остаются невыясненными. Всё это определяет актуальность исследования причин возрастания устойчивости микроорганизмов к антибиотикам и разработку новых альтернативных путей борьбы с микозами. Одним из решений проблемы может оказаться способность электромагнитных излучений микроволнового и радиочастотного диапазонов воздействовать на биологические системы. Учитывая широкий спектр действия электромагнитных излучений (ЭМИ), они могут оказаться как причиной возникновения резистентности, так и способом борьбы с резистентными видами микроорганизмов.

Ранее нами была показана связь чувствительности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Shizosaccharomyces pombe* и *Candida utilis* к фунгицидным антибиотикам полиеновой и азольной групп с характером солнечной активности (одним из важных показателей которой является природное ЭМИ) и проявление антибиотикорезистентности под воздействием антропогенного электромагнитного излучения радиочастотного диапазона.

Среди наиболее вероятных причин возникновения резистентности дрожжей к исследованным антибиотикам в результате облучения радио-

частотным ЭМИ может быть изменение свойств внешней мембраны клеток дрожжей. Снижение проницаемости цитоплазматической мембраны для антибиотических веществ — один из механизмов возникновения резистентности микроорганизмов. Как показали наши исследования, ЭМИ уменьшает проницаемость ЦПМ и таким образом выступает конкурентом по эффектам действия ряда антибиотиков. В то же время, учитывая механизм действия полиеновых антибиотиков, можно предположить, что ключевое значение в этом случае могут иметь структуры, окружающие мембрану. Согласно данным литературы, роль клеточной стенки в проявлении различной чувствительности грибов к антибиотикам изучена недостаточно [Álvarez Álvarez et al., 1998; Zhang et al., 2002].

Методом атомно-силовой микроскопии исследовано изменение структуры и вязкоупругие свойства клеточной поверхности дрожжей *S. cerevisiae* под действием антибиотика нистатина, а также при воздействии радиочастотного электромагнитного излучения (40,68 МГц, 30 Вт). Отмечено изменение вязко-упругих свойств на поверхности клетки в результате действия ЭМИ.

Применение метода выявления биополимеров углеводной природы (метод лектинов, меченых коллоидным золотом) при помощи электронной микроскопии показало, что действие ЭМИ приводит к изменению структуры полисахаридного комплекса на поверхности клеток, что также может быть одной из причин возникающей резистентности клеток по отношению к фунгицидным антибиотикам.

Таким образом, исходя из полученных данных, мы можем предположить важную роль клеточной стенки и, в частности, ее полисахаридной компоненты в чувствительности дрожжей к антибиотикам. Эффекты воздействия радиочастотного ЭМИ на систему “микроорганизмы-антибиотики” могут быть применены в качестве нового подхода к повышению эффективности антимикробных препаратов и созданию принципиально новых методов лечения ряда инфекций.

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА МОРФОЛОГИЮ КЛЕТОК МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Зароченцева И.А., Фарутина И., Панина Л.К.
Санкт-Петербургский государственный университет,
Биолого-почвенный факультет
Санкт-Петербург

В работе исследуется влияние подавляющих синтез микротрубочек агентов, в частности, противоопухолевого препарата — растительного алкалоида винбластин, на процессы апикального роста и формообразования клеток микроскопических грибов. Использовался как винб-

ластин (сульфат), так и сходный по химическому составу и действию винкрисдин. Суспензию, содержащую споры мицелиального микромицета *Ulocladium botrytis*, инокулировали в кольца Ван Тигема на стандартную среду Чапека-Докса с сахарозой, половина колец содержала дополнительно винбластин в концентрации 0,1 М. Кольца содержались при низкой температуре 0-2° С.

Фотоснимки для анализа сделаны при помощи цветной цифровой камеры LEICA DC 300F (Leica, Germany), установленной на световом микроскопе WPI H605T (WPI, USA). Компьютерный анализ оцифрованных изображений проводился при помощи программных средств Adobe Photoshop 6.0, Matrox Inspector 2.2 (Канада), ВидеоТест 4.0 (СПб, Россия). Число используемых при программной статистической обработке морфологических параметров (таких, как площадь, периметр, максимальный диаметр клетки, удлиненность, наличие или отсутствие спор и aberrantных клеток) может быть задано любым.

Через 1-5 суток наблюдали прорастание спор, затем начальные ветвления мицелия. Контрольная культура содержала равномерно вытянутые цилиндрические клетки со стандартными морфологическими характеристиками. Экспериментальная культура на среде с добавлением винбластин отличалась от контроля и содержала относительно короткие, утолщенные клетки неправильной формы. Изменение морфологии мицелия *U. botrytis* при добавлении винбластин в питательную среду, вероятно, свидетельствует о непосредственном участии тубулиновых микротрубочек в процессах апикального роста у этого микроскопического гриба. Планируется дальнейшее изучение влияния фармакологических агентов, в том числе взаимодействующих с актиновыми компонентами цитоскелета, на процессы цитокинеза и апикального роста как мицелиальных, так и диморфных видов микромицетов.

СКАНИРУЮЩЕЕ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НОГТЕВЫХ ПЛАСТИНОК ПАЛЬЦЕВ НОГ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ОНИХОМИКОЗАХ

Каменных П.В.
Поликлиника медицинского центра управления делами
Президента Российской Федерации
Москва

Электронно-микроскопическое исследование ногтевой пластинки при онихомикозах свидетельствует о различных формах структурных повреждений ногтей при этих грибковых инфекциях. Можно выделить

некоторые характерные морфологические повреждения, свойственные для различных клинических форм онихомикозов. Однако ряд общих черт морфологического повреждения ногтей прослеживается в той или иной мере во всех исследованных случаях, свидетельствуя о значительном разрушении кератинового субстрата ногтевой пластины в результате деятельности дерматофитов.

При различных формах онихомикоза наружная поверхность ногтевой пластины теряет структурную целостность. Исчезает продольная исчерченность. Поверхностный рисунок становится невыраженным – размытым. Выявляются поперечные угловатые трещины размером от 0,5 мм до 1 мм с неровными краями.

Одним из наиболее часто прослеживаемых структурных повреждений являются разнообразные по форме и размеру полости, являющиеся одним из патогенетических факторов, дающих возможность грибковой инфекции находить нишу для роста и размножения. Очень часто полости располагаются под сохранившимся, но уже истончённым поверхностным слоем в виде линзы, отделяющей поверхностную часть от ниже расположенной гиперкеротических масс, напоминающих «капусту». В ряде случаев полости представляют собой воронку, расположенную в середине кератиновой массы, образованную изменёнными структурную ориентацию роговыми чешуйками.

Одной из возможных ниш, способствующих инвазивному росту грибов за счёт перфорирующих гиф или быстрому росту в мицеляльной фазе, являются запустевшие сосуды, возможно обусловленные предшествующей травмой.

Тотальный дистрофический онихомикоз характеризуется обширной зоной поражения. Повреждённые участки ногтевой пластинки представляют крупнозернистую или комковатую дезориентированную кератиновую массу. Размеры этих образований очень разнообразные и обычно составляют 10–50 мм.

При этом степень гиперкератоза, в определённой мере, свидетельствует об активности инфекционного процесса и, в значительной степени, отражает тяжесть морфологического повреждения ногтей.

При рассмотрении процесса доставки лекарственных средств в область поражённого ногтя и выбора тех или иных подходов и схем лекарственной терапии, целесообразно учитывать биомедицинские особенности данного органа, включающего три образования, отличающихся по морфофункциональным характеристикам: твёрдый кератин ногтя, жизнеспособные клеточные слои матрикса и ногтевого ложа, основные барьерные свойства которых связаны с клеточными мембранами и дерму, представленную многомерной матрицей волокнистых структур, заключённых в основное аморфное вещество. Указанная биологическая специфика ногтей отражается на параметрах диффузионных процессов лекарственных средств и характеризует этот орган как

многослойную систему, структурные особенности которой необходимо учитывать при назначении схемы и длительности терапии.

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДЕРМАТОФИТОВ НА ОСНОВЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Маноян М.Г., Овчинников Р.С., Панин А.Н.

*Всероссийский Государственный Центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов (ФГУ ВГНКИ)
Москва*

Несмотря на активное развитие молекулярных методов идентификации грибов, в РФ важнейшим инструментом в лабораторной практике остается их фенотипическая характеристика. Хотя этот подход имеет существенные недостатки, в целом морфологические и физиологические критерии видовой идентификации согласуются с данными, получаемыми при использовании молекулярных техник (Y. Gräser et al., 1999).

В повседневной практике видовая идентификация дерматофитов осуществляется как правило на основании изучения морфологических признаков культуры. Однако некоторые виды не обладают четкими выраженными видоспецифическими морфологическими признаками, или же они могут быть одинаковы у нескольких видов (спиралевидные гифы и сигаровидные макроконидии у *Microsporium persicolor* и *Trichophyton mentagrophytes*). В сомнительных случаях используют диагностические физиологические тесты – определение уреазной активности, тест перфорации волос *in vitro*, рост на рисовых зернах, рост при 37°C, определяют специфические питательные потребности (S. de Hoog et al., 2000, I. Weitzman, 1996). Тем не менее и этих диагностических критериев бывает недостаточно.

В данной работе стояла задача провести видовую идентификацию 10 культур дерматофитов, изолированных от больных дерматофитозом лошадей, и подобрать дополнительные физиологические тесты, которые могут быть информативными для определения вида гриба в сомнительных случаях.

Морфологические свойства и скорость роста изучали при культивировании на сусло-агаре, агаре Сабуро и агаре Чапека. Для изучения физиологических свойств применяли стандартные тесты на уреазную активность, тест перфорации волос, а также определяли дополнительные показатели – казеиназную активность, активность амилазы, ДНКазы, желатиназы, пероксидазы, утилизацию цитрата, молокосвертывающую активность.

Результаты исследований. Изучение морфологических свойств позволило определить видовую принадлежность только двух изолятов (1 и 2). Они образовывали быстрорастущие бежевые порошистые колонии, при микроскопии обнаруживались многочисленные макроконидии – толстостенные, веретеновидные с закругленными кончиками, 3-5 клеточные. Эти характерные морфологические признаки позволили идентифицировать изоляты, как *M. gypseum*. Ферментативные свойства этих культур были одинаковыми – они продуцировали казеиназу, ДНКазу, уреазу, перфорируют волос, но не утилизируют цитрат.

Для остальных 8 изолятов изучение морфологических свойств оказалось недостаточным для определения видовой принадлежности. В связи с этим были проведены стандартные идентификационные тесты. Установлено, что все изоляты обладают урезанной активностью и перфорируют волос *in vitro*. Этих данных также было недостаточно для окончательной видовой идентификации, что вызывало необходимость проведения дополнительных физиологических тестов.

Основываясь на комплексе полученных морфологических, цитоморфологических и физиологических характеристик, изоляты дерматофитов были распределены на несколько биотипов, что позволило завершить видовую идентификацию.

Изоляты *T. mentagrophytes* (№№ 3, 4, 5) морфологически характеризовались быстрорастущими белыми пушистыми колониями, росли на среде Чапека, образовывали редкие сигаровидные макроконидии. Эти изоляты слабо расщепляли казеин, обладали ДНКазой, слабо утилизируют цитрат.

Изоляты, идентифицированные как *T. equinum* (*syn. T. tonsurans*) морфологически существенно отличались между собой. Изоляты 6, 7, 8 образовывали белые бархатистые колонии с желто-коричневым реверсом и умеренной скоростью роста. Изолят 9 характеризовался бархатистыми кремово-розовыми колониями с красно-коричневым реверсом. Первые 3 изолята проявили казеиназную, ДНКазную активности, утилизируют цитрат. В то же время изолят 9 проявил слабую казеиназу и ДНКазу, и не утилизирует цитрат. Общим для всех 4-х изолятов *T. equinum* было то, что они не проявили роста на среде Чапека. Это можно объяснить специфическим питательными потребностями, присущими данному виду.

Изолят 10 представлял отдельный биотип. Он образовывал белокермовые бархатистые быстрорастущие колонии. Микроскопически никаких видоспецифических признаков обнаружить не удалось. По ферментному профилю изолят был близок к *T. equinum* – он обладал казеиназой, ДНКазой, и утилизирует цитрат. Но в отличие от других изолятов *T. equinum*, он хорошо рос на агаре Чапека и не образовывал 2-х клеточных конидий, характерных для культур *T. equinum*. Совокупность морфологических и физиологических признаков позволила отнести этот изолят к *T. mentagrophytes*.

При изучении желатиназной активности было обнаружено, что этот признак варьирует у изолятов одного вида. Более интенсивная желатиназная активность отмечена у свежeweделенных изолятов. Культуры, длительное время пересевавшиеся на питательных средах, гидролизировали желатин значительно слабее. Другие дополнительные физиологические тесты не позволили в данном случае выявить отличий между изолятами. Все они образовывали, пероксидазу, пептонизировали молоко, и не образовывали амилазу.

Заключение. В результате исследования была уточнена видовая принадлежность изолятов дерматофитов, выделенных от лошадей. Среди них *M. gypseum* – 2 изолята, *T. mentagrophytes* – 4 изолята, *T. equinum* (*syn. T. tonsurans*) – 4 изолята. Все они были охарактеризованы по комплексу морфологических и физиологических признаков, выявлены видоспецифические особенности дерматофитов – возбудителей дерматофитозов лошадей.

Изолятам вида *M. gypseum* присуща высокая скорость роста, выраженная активность казеиназы, ДНКазы, и неспособность утилизировать цитрат. Изоляты *T. mentagrophytes* характеризуются слабой казеиназной активностью, выраженной активностью ДНКазы, слабой утилизацией цитрата. Для *T. equinum* (*syn. T. tonsurans*) характерно отсутствие роста на среде Чапека, присуща казеиназная, ДНКазная активность и способность утилизировать цитрат.

Примененные в данном исследовании физиологические тесты могут быть использованы в качестве дополнительных критериев для видовой идентификации дерматофитов в сомнительных случаях.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗОЛЯТОВ *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

Овчинников Р.С., Маноян М.Г., Панин А.Н.

Всероссийский Государственный Центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов (ФГУ ВГНКИ)
Москва

Варианты (биотипы), составляющие популяцию вида дерматофита в естественных условиях, могут существенно отличаться между собой. Эти отличия касаются морфологических, физиологических характеристик, а также чувствительности к антифунгальным препаратам, что имеет значение для клинической практики.

В настоящей работе в сравнительном аспекте были изучены 5 изолятов *T. mentagrophytes*, выделенные от животных различных видов: от песка (изолят № 1), от собаки (№ 2), от белых лабораторных мышей (№ 3 и 4), и от морской свинки (изолят № 5). Изучались морфологические, цитоморфологические свойства, уреазная активность, способность к перфорации волоса *in vitro*, и чувствительность к антифунгальным препаратам — амфотерицину В, нистатину, клотримазолу, флуконазолу, кетоконазолу, тербинафину.

По морфологии колоний изоляты были представлены двумя типами. Изоляты первого типа образовывали белые бархатисто-пушистые колонии с желто-коричневым реверсом («антропофильный» вариант — *T. mentagrophytes var. interdigitale*). Такая морфология отмечена у изолятов №№1, 2, 4, 5. Изолят второго типа (№3) образовывал порошисто-мучнистые колонии кремового цвета, с красно-коричневым реверсом («зоофильный» вариант — *T. mentagrophytes var. mentagrophytes*). При микроскопии у всех изолятов обнаруживали округлые и грушевидные микроконидии, редкие многоклеточные макроконидии сигаровидной формы. Спирально извитые гифы встречались у антропофильных вариантов довольно редко, и гораздо чаще — у зоофильного варианта.

При изучении уреазной активности все изоляты проявили положительный результат. В тесте перфорации волос все изоляты также проявили положительный результат, но характер деструкции волос отличался. Изоляты, относящиеся к «антропофильному» варианту (1, 2, 4, 5) вызывали эрозию волоса, а «зоофильный» вариант № 3 наряду с эрозией образовывал в волосе характерные углубления (перфорации).

При изучении чувствительности к антифунгальным препаратам установлено, что все культуры были устойчивы к амфотерицину В, нистатину, чувствительны к тербинафину и клотримазолу. Чувствительность к кетоконазолу проявили изоляты 3, 4, 5 (выделенные от грызунов), а изоляты 1 и 2 (выделенные от псовых) были устойчивы к этому препарату. К флуконазолу были чувствительны только два изолята — №3 и 4 (оба изолированы от белых мышей).

Проведенные исследования позволили выявить как морфологические, так и физиологические отличия между изолятами *T. mentagrophytes*, выделенными из различных источников. Характерно, что все изоляты были выделены от животных, но только один относился к порошисто-мучнистому «зоофильному» варианту *T. mentagrophytes var. mentagrophytes*. Остальные были представлены «антропофильными» вариантами.

Установлено, что разные биотипы, составляющие популяцию *T. mentagrophytes*, отличаются по спектру чувствительности к антифунгальным препаратам. Только два изолята из пяти проявили чувствительность к флуконазолу, и три изолята — к кетоконазолу. Полученные данные позволяют предположить существование взаимосвязи между источником происхождения (видом животного-хозяина) и спектром чувствительности дерматофита к антифунгальным препаратам.

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО КРАСНОГО СВЕТА НА ДРОЖЖИ ПРИ ДЕЙСТВИИ UVA-ИЗЛУЧЕНИЯ И ВИДИМОГО СВЕТА

Пиняскина Е.В.

Прикаспийский институт биологических ресурсов
Дагестанского научного центра РАН
Махачкала

Излучение Солнца носит непрерывный характер и простирается далеко в рентгеновскую область спектра. Однако в атмосфере коротковолновая компонента вызывает диссоциацию молекул кислорода с образованием озона (максимальная концентрация на высоте 28–30 км). Слой озона экранирует поверхность Земли и нижележащие слои атмосферы, поглощая все излучение с длиной волны короче 295 нм. В последние годы деятельность человека влечет за собой прогрессирующее разрушение озонового экрана, что может привести к увеличению в приземном слое атмосферы интенсивности коротковолнового УФ-излучения со всеми вытекающими отсюда последствиями для земной жизни и здоровья человека.

Возникновение при воздействии УФ-излучения молекулярных повреждений ДНК, не устраняемых (или устраняемых не полностью) репаративными системами клетки, а также фотодеструкция белков и биомембран обуславливают развитие довольно многочисленных биологических эффектов.

Среди известных защитных механизмов, уменьшающих повреждающие эффекты УФ-излучения, важную роль играют процессы фотоиндуцированной защиты и репарации клеток, различаясь по феноменологии и механизмам действия, эти процессы сходны в том, что направлены на устранение либо предотвращение образования пиримидиновых димеров в ДНК. активным в инициации этих процессов является свет видимого и/или ДУФ-диапазонов спектра.

Ранее нами было показано, что устойчивость клеток к УФ-облучению (290–320 нм) можно повысить воздействием длинноволнового света с максимумом эффективности в красной области при 680 нм. По изученным закономерностям обнаруженный эффект принципиально отличается от известных процессов фотоиндуцированной защиты и репарации клеток. Это позволило констатировать наличие у дрожжей неизвестного ранее фотоиндуцибельного защитного механизма, обеспечивающего защиту клеток от СУФ-излучения, которое связано преимущественно с образованием пиримидиновых димеров и 6,4- аддуктов в ДНК.

Задача следующего этапа работы состояла в исследовании роли фотоиндуцибельной защитной системы в повышении устойчивости дрож-

жевых клеток к инактивирующему действию ДУФ-света. В этом случае указанные выше фотопродукты не вносят вклад в фотоинактивацию клеток и основными летальными повреждениями являются одноцепочечные разрывы ДНК, которые образуются с участием эндогенных фотосенсибилизаторов и активированных форм кислорода, т.е. по фотодинамическому механизму.

В этой серии экспериментов, используя ранее найденные режимы облучения, которые были оптимальны при фотоиндуцированном повышении выживаемости СУФ-облученных клеток, мы выявили эффект фотовосстановления ДУФ-инактивированных клеток. Установлено, что повышение уровня выживаемости таких клеток наблюдается при воздействии света всех использованных ранее длин волн в диапазоне 600-730 нм, причем максимальный эффект фотореактивации проявлялся при облучении клеток красным светом 680 нм. Также было показано, что на эффективность фотореактивации (FR_{680}) (как и при FR_{680} в случае действия СУФ-излучения) не влияет понижение температуры до 4°C во время облучения монохроматическим светом.

Полученные результаты дают основание считать, что в фотовосстановлении клеток при летальном действии ДУФ-излучения участвует та же фотозащитная система, что и при действии СУФ-излучения. Это в свою очередь свидетельствует о том, что данная система направлена на устранение не только пиримидиновых димеров (как ферментативная фотореактивация), но и других фотоповреждений, образующихся в ДНК, в том числе путем фотосенсибилизации (например, одноцепочечные разрывы).

Известно, что СУФ- и ДУФ-индуцированные повреждения могут ликвидироваться системами репарации ДНК, из которых основными являются «темновые», (т.е. не нуждающиеся в свете) эксцизионная и пострепликативная.

Они менее специфичны, чем фотореактивация, и наряду с димерами способны устранять и другие повреждения структуры ДНК, однако механизм их работы сложнее и включает несколько последовательных стадий, контролируемых разными ферментами.

Нам представлялось целесообразным проверить, не связано ли действие обнаруженной нами фотоиндуцибельной защитной системы с фотоиндуцированной активацией этих репарационных систем.

Для решения поставленного вопроса мы исследовали способность к FR_{680} мутантных штаммов дрожжей (*S. cerevisiae*), дефицитных по эксцизионной (*rad 3-2*) и пострепликативной (*rad 50-1*) репарации ДНК. Предварительно было показано, что такие клетки более чувствительны к СУФ (*rad 3-2*) и ДУФ (*rad 50-1*) по сравнению с диким штаммом. Опыты по фотореактивации проводились по следующей схеме: клетки дикого штамма и мутантов *rad 3-2* или *rad 50-1* облучали фиксированной дозой СУФ (2.4 кДж/м²) или ДУФ (18 кДж/м²), после чего их подвергали воздействию монохроматического света 680 нм. Как следует из

полученных данных, фотореактивация мутантных штаммов наблюдается, причем ее эффективность примерно такая же, как и у дикого штамма. Эти данные могут указывать на то, что устранение СУФ-, ДУФ-индуцированных повреждений ДНК в процессе FR_{680} осуществляется без участия эксцизионной и пострепликативной репарации. Очевидно, действие фотоиндуцибельной защитной системы включает какой-то другой механизм ликвидации таких повреждений.

Установление того факта, что действие фотоиндуцибельной защитной системы не специфично в отношении природы повреждений ДНК, привело к постановке вопроса о возможном участии этой системы в устранении фотоповреждений не только в генетическом аппарате, но и в других клеточных структурах.

Эффект фотореактивации при облучении клеток видимым светом при фотодинамической инактивации дрожжевых клеток большими дозами видимого света (400-600 нм) основной мишенью является не ДНК, а плазматическая мембрана.

До последнего времени считалось, что эти повреждения нефотореактивируемы и связаны, очевидно, с деструкцией мембранных компонентов (фотолизом мембранных белков и липидов).

Проведенные нами эксперименты с использованием описанных выше оптимальных при FR_{680} режимов облучения показали, что инактивированные видимым светом клетки можно восстановить при воздействии на них монохроматическим светом в области 400-730 нм с максимальной эффективностью реактивации при 680 нм. Принципиально важно, что типичная дозовая кривая фотореактивации в этом случае имеет такой же вид, как и аналогичные дозовые кривые при фотореактивации клеток, инактивированных ДУФ-светом. Следовательно, в фотовосстановлении жизнеспособности дрожжевых клеток, инактивированных видимым светом, участвует та же фотоиндуцибельная система, что и при летальном действии УФ-излучений. Иными словами, данная защитная система активна не только в устранении различных повреждений ДНК, но и в случае фотодинамической деструкции плазматических мембран.

Таким образом, очевидно, что во всех рассмотренных случаях обнаруженная нами фотоиндуцибельная защитная система действует по общему первичному механизму, запускаемому единым клеточным фоторецептором.

Обнаружение эффектов фотовосстановления при инактивирующих воздействиях ДУФ- и видимого света является первым указанием на возможность фоторепарации повреждений, образующихся по фотодинамическому механизму в генетическом аппарате и мембранных структурах клетки с участием эндогенных фотосенсибилизаторов.

Установлен общий характер закономерностей проявления обнаруженных эффектов, что свидетельствует о функционировании в дрожжевых клетках единой фотоиндуцированной защитной системы, не специфичной в отношении природы летальных фотоповреждений.

С использованием спектрофлуориметрического и абсорбционного анализа изолированных клеточных фракций впервые для дрожжевых клеток показано наличие длинноволнового поглощения с максимумом в красной области при 670 нм, принадлежащее неидентифицированному хромофору, локализованному в плазматических мембранах. Близкое совпадение зарегистрированного максимума с главным максимумом в спектре действия фотовосстановления клеток позволяет рассматривать этот хромофор в качестве кандидата на роль первичного фоторецептора обнаруженной фотоиндуцибельной защитной системы.

Данные о ее высокой квантовой чувствительности, а также триггерном характере действия указывают на существование весьма эффективных механизмов биохимического усиления, которые инициируются первичным фоторецептором и способны обеспечить устойчивость клеток при инактивирующем действии оптического излучения различных длин волн экологического диапазона.

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛАТЕРАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ОБОЛОЧЕК И СЕПТАЛЬНОГО ПОРОВОГО АППАРАТА КЛЕТОК ВЕГЕТАТИВНОГО МИЦЕЛИЯ ASPERGILLUS VERSICOLOR (VUILL.) TIRABOSCHI

*Степанова А.А., Сеницкая И.А., Авдеенко Ю.Л.
НИИ медицинской микологии имени Кашкина П.Н. СПбМАПО
Санкт-Петербург*

Для зрелых клеток гиф воздушного мицелия *A. versicolor* (описание штамма см. А.А. Степанова, И.А. Сеницкая «Электронно-микроскопическое изучение клеток вегетативного мицелия *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi») характерны тонкие 0,03 (0,02-0,04) мкм, однослойные, фибриллярные клеточные оболочки умеренной электронной плотности, покрытые тонким 0,01 (0,01-0,015) мкм темным гомогенным слоем.

Клетки гиф погруженного мицелия имели в 10 раз более толстые клеточные оболочки, состояли из микрофибрилл, проявляющих высокий контраст. Они несли снаружи хорошо развитый, фибриллярный слой, состоящий из толстых, темных, сильно извитых фибрилл, придающих поверхности оболочки «лохматый вид». По толщине этот слой равен толщине клеточной оболочки. Утолщение клеточных оболочек гиф погруженного мицелия можно связать с необходимостью механического поддержания конидиогенного аппарата. Хорошо развитый наружный фибриллярный слой, представляющий собой выделяемые

грибом внеклеточные метаболиты, является дополнительным морфологическим доказательством большей активности гиф субстратного мицелия, по сравнению с аналогичными воздушного.

У *A. versicolor* клетки мицелия у отграничены друг от друга однослойными клиновидными септами. Толщина септ вблизи латеральной клеточной стенки в среднем равна 0,11 (0,08-0,14), а в средней части – 0,07 (0,05-0,09) мкм. В центральной части септ имелась сквозная пора диаметром 0,08 (0,07-0,10) мкм. Из компонентов поперового аппарата септ выявлены только тельца Воронина (ТВ). Последние имели форму сферических дисков диаметром 0,12 (0,08-0,15) мкм, гомогенное содержимое умеренной электронной плотности и контрастную ограничивающую мембрану. Число ТВ на продольных срезах клеток мицелия варьировало от одного до четырех. Чаще всего вблизи септ насчитывалось четыре ТВ, располагающиеся симметрично по два с каждой стороны септы и на расстоянии 0,40-0,45 мкм друг от друга. Крайне редко встречались септальные поры, содержимое которых было закрыто одним ТВ, либо вблизи которых они не выявлялись. Через отверстие открытых септальных пор происходит обмен гиалоплазмой, мелкими пузырьками и свободными рибосомами смежных клеток гиф мицелия.

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОК ВЕГЕТАТИВНОГО МИЦЕЛИЯ ASPERGILLUS VERSICOLOR (VUILL.) TIRABOSCHI

*Степанова А.А., Сеницкая И.А.
НИИ медицинской микологии имени Кашкина П.Н. СПбМАПО
Санкт-Петербург*

Приводятся данные цитологического изучения зрелых клеток гиф (ЗКГ) воздушного и субстратного мицелия *A. versicolor*, выделенного от пациента 2.06.2004 г. (штамм РКПГФ 1241/797) больного отомикозом. Культуру гриба выращивали на среде Чапека в термостате при 27°C и фиксировали глутаральдегидом-осмием через 2, 3, 5, 10 и 15 дней после посева.

Для всех типов ЗКГ воздушного и субстратного мицелия характерно наличие двух интерфазных ядер округлой (1,43 мкм) или эллипсоидной (0,8x2,14 мкм) формы, характеризующихся наличием слабо извилистого контура, одного крупного (0,47 мкм) ядрышка, небольшого числа мелких плотных глыбок конденсированного хроматина и гранул полифосфатов.

В ЗКГ воздушного мицелия отмечались редкие митохондрии, компоненты эндомембранной системы и запасные вещества. ЗКГ субстратного мицелия также были бедны компонентами эндомембранной системы и насыщены митохондриями, формирующими митохондриальный ретикулум, о чем свидетельствовало присутствие длинных (до 5,5 мкм) профилей этих органелл. В ЗКГ субстратного мицелия доминировали запасные вещества. По их типу и сочетанию можно выделить пять основных типов ЗКГ субстратного мицелия: 1) с крупными липидными включениями, заполняющими весь объем клетки; 2) липидными включениями разнообразного (0,4-0,8 мкм) диаметра и розетками гликогена (0,02-0,04 мкм); 3) липидными включениями, розетками гликогена и темными крупными белковыми глобулами диаметра (0,30-0,70 мкм) в вакуолях; 4) розетками гликогена и белковыми глобулами в вакуолях; 5) мелкими (0,01-0,02 мкм) гранулами полифосфатов в ядрах, вакуолях, гиалоплазме и митохондриальном ретикулуме. Синтез запасных веществ в ЗКГ субстратного мицелия достигал максимума в период перехода колонии гриба к спороношению, что отмечалось нами и для штаммов двух других видов аспергиллов — *A. niger* и *A. fumigatus*.

Таким образом, выявлены четкие различия в ультраструктуре ЗКГ воздушного и субстратного мицелия у патогенного штамма *A. versicolor*, выращенного на среде Чапека. Наличие в ЗКГ субстратного мицелия митохондриального ретикулума и богатство запасными веществами являются показателями высокого уровня их метаболизма, по сравнению с таковыми воздушного. Судя по набору аккумулируемых запасных веществ, ЗКГ субстратного мицелия характеризуются наличием липидного и смешанного типов метаболизма.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ LENTINULA EDODES И TRICHODERMA SPP.

Шульга Е.В.

Национальный аграрный университет Украины
Киев, Украина

Несмотря на то, что промышленное производство грибов в мире за последние 35 лет возросло более чем в 21 раз (с 350 тыс. тонн в 1965 г. до 7,5 млн. тонн в 2000 году) на серьезную промышленную основу поставлено производство троих видов грибов: шампиньона, шии-таке и вешенки. При этом наблюдаются значительные изменения соотношения их объемов культивирования. На данное время шии-таке (*Lentinula*

edodes (Berk.) Pegl.) занимает второе место после шампиньона двуспорового по объемам производства съедобных грибов в мире.

Высший базидиомицет является ценным съедобным грибом с уникальными лекарственными свойствами. Употребление этих грибов в пищу существенно снижает риск заболевания атеросклерозом за счет их способности снижать уровень холестерина в крови, замедляет развитие, а то и полностью вызывает регрессию злокачественных опухолей, регулирует иммунную систему, препятствует химическим отравлениям.

Веками этот гриб выращивали в Азиатских странах, в основном в Китае и Японии (более 1 млн. в год). Сегодня, стремительно растущий рынок свежих шии-таке за пределами Азии требует локализации производства данного экзотического гриба во многих новых регионах мира. Адаптация традиционных методов культивирования и развитие новых часто наталкивается на ряд факторов, которые сдерживают производство данного деликатеса. Так, конечная цель каждого грибовода — получить максимально высокий урожай грибов отличного качества зависит не только от правильного приготовления субстрата и поддержания соответствующего микроклимата в процессе выращивания, но также заключается и в том, чтобы не допустить появления, развитие и распространение заболеваний, которые могут нанести значительный ущерб производству плодовых тел съедобных грибов.

Особенно часто на субстратах для выращивания шии-таке встречается зеленая плесень, вызываемая несколькими видами микромицетов из рода *Trichoderma* (Pers) Fr. Эти патогены выделяют вещества (антимикотики), тормозящие рост мицелия культивируемых грибов, а отдельные агрессивные штаммы триходермы проявляют выраженные микопаразитические свойства, развиваясь на мицелии и плодовых телах и вызывая большие потери урожая. Степень потери урожая часто зависит от вида плесени, от типа взаимодействия между шии-таке и его антагонистами, потому целью нашей работы было изучение взаимного роста в чистых культурах мицелию базидиального гриба *L. edodes* и грибов из рода *Trichoderma* с дальнейшим определением степени их агрессивности.

Изучение антагонистической активности изолятов триходермы по отношению к штаммам шии-таке проводили на сусло-агаре методом встречных культур. Принимая во внимание, тот факт, что конкурентные грибы растут быстрее, нежели мицелий *L. edodes*, каждый базидиомицет культивировался на протяжении 5-ти дней при температуре 25°C и только потом инокулировался *Trichoderma* spp. Расстояние между инокулями составляло 4см (Savoie, 1999).

В данном исследовании использовалось 23 изолята грибов из рода *Trichoderma*, которые были собраны из поврежденных мест опилочного субстрата для культивирования шии-таке. На противодействие изолятам триходермы были выставлены шесть штаммов *L. edodes*, предостав-

ленные институтом ботаники имени М.Г. Холодного НАНУ и Селекционно-генетическим институтом УААН.

Результаты исследований показали, что при совместном произрастании изолятов триходермы и шии-таке, первые начинали проявлять антагонистическое действие. При этом антагонистическая активность *Trichoderma spp.* была различной как между собой, так и по отношению к разным штаммам *L. edodes*. Под влиянием большинства исследуемых изолятов триходермы полностью ингибировался рост восприимчивых штаммов шии-таке, таких как 1627 IBK, 1628 IBK. После встречи колоний грибов мицелий данных штаммов *L. edodes* прекращал свой рост, в то время как грибы рода *Trichoderma* интенсивно нарастали на него и через некоторое время (4-5 дней с дня инокуляции патогена) он полностью покрывался мицелиально-конидиальной пленкой антагониста без какого-либо сопротивления – шии-таке не образовывали ни мицелиальных валиков, ни коричневых линий, которые могли бы служить защитным механизмом. При этом наблюдалось явно выраженные отличия в скорости нарастания разных изолятов *Trichoderma spp.*

У грибов рода *Trichoderma* были выявлены макроморфологические изменения гифальной системы – после пересечения линии соприкосновения двух колоний мицелий изолятов антагонистов становился более мощным и плотным, прослеживался концентрический зональный характер нарастания триходермы на шиитакке с чередованием светлых мицелиальных и зеленых плотных конидиальных зон, расположенных параллельно друг к другу.

Основываясь на наблюдения за 414 парными культурами (138x3 повторности каждая) нами были выделены три основные типы антагонистического взаимодействия (IT 1-3) согласно уровню активности или агрессивности культур *Trichoderma spp.* по отношению к разным штаммам *L. edodes*.

(IT 1) Высокая антагонистическая активность (активный антагонизм, микопаразитизм) – характеризуется сильным угнетением роста колонии шии-таке сразу же после контакту с культурой патогена до полного его нарастания в течение 4-5 суток. Такое антагонистическое действие в конце приводит к лизису мицелия хозяина. Наиболее чувствительными штаммами шии-таке оказались 1627 IBK и 1628 IBK, с которыми 90% всех штаммов *Trichoderma spp.* выявили данный тип взаимодействия.

(IT 2) Средняя антагонистическая активность (пассивный антагонизм) характеризуется ограниченным ростом шии-таке с образованием красновато-коричневой зоны ингибирования (в среднем 6 мм) между двумя колониями, а также небольших уплотнений мицелия *L. edodes*, которые служат защитным механизмом, сдерживающим рост антагониста.

(IT 3) Низкая антагонистическая активность. В первые дни взаимодействия между грибами наблюдается приостановление роста шии-таке по сравнению с контрольным вариантом. Но уже через 3-4 дня

на границе контакта грибов обозначились достаточно отчетливые мицелиальные валики *L. edodes*, состоящие из скопления неподвижных плотных воздушных гиф (барраж), которые дали начало уплотненным ветвящимся тязам, распространяющимся по поверхности мицелия триходермы. Таким образом, мицелий шии-таке существенно ограничивал рост некоторых изолятов *Trichoderma spp.* Эта способность чаще всего наблюдалась при взаимодействии из штаммами “Адмирал” и “Риф”.

Данные результаты четко отражают, что потери урожая во время промышленного выращивания шии-таке зависят как от использования производственных штаммов шии-таке так и от индивидуальных свойств штаммов *Trichoderma spp.*, даже, несмотря на то, что последние могут принадлежать до одних и тех же видов. Антагонистическое взаимодействие между исследуемыми базидиомицетами осуществляется через метаболиты, выделяемые ими в питательную среду. Вероятно, по мере накопления их в субстрате увеличивается антагонизм между культурами грибов. Явная антагонистическая активность прослеживается при нарастании *Trichoderma spp.* на *L. edodes*, что приводит к лизису мицелия базидиомицета, и он полностью прекращает свою жизнедеятельность. Исследуемые изоляты триходермы характеризовались неодинаковым антагонистическим эффектом на штаммы шии-таке. В свою очередь исследуемые штаммы шиитакке проявляют различную устойчивость к одним и тем же изолятам триходермы. Поэтому при подборе производственных штаммов/сортов шии-таке необходимо учитывать их конкурентоспособность из имеющимися видами/штаммами грибов роду *Trichoderma*.

ХАРАКТЕР АДГЕЗИВНОЙ СПОСОБНОСТИ ПРИРОДНЫХ И КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* К БУККАЛЬНОМУ ЭПИТЕЛИЮ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА

Бурмistroва А.Л., Хомич Ю.С., Чернов Ю.И.¹,
Самышкина Н.Е., Поспелова А.В., Бахарева Л.И., Заврина О.А.

Челябинский государственный университет
Челябинск

¹ МГУ факультет почвоведения
Москва

Грибы рода *Candida* широко распространены природе и относятся к уникальному микроорганизму, демонстрирующему широкий диапазон адаптационных возможностей, позволяющих ему:

1) быть уверенным комменсалом различных анатомических мест тела человека, каждое из которых характеризуется собственным сайтом – специфическим профилем, описываемым рядом параметров: микробиота, физико-химические и физиологические составляющие и т.д.;

2) выступать в качестве “успешного” оппортуниста этих же анатомических мест.

Возникает вопрос, каковы причины и вклад грибов рода *Candida* при переключении от “безобидного” сосуществования до агрессии?

Один из параметров, характеризующих трансформацию биологических свойств грибов рода *Candida* при смене условий существования (внешняя среда/человек), является способность к адгезии на эпителиоциты человека.

В данном исследовании мы сравнили адгезивную способность природных и клинических изолятов грибов рода *Candida* в системе “*Candida* sp. – буккальные эпителиоциты” in vitro.

Материалы и методы.

Было изучено:

- 1) 12 изолятов грибов рода *Candida*, выделенных из ротовой полости;
- 2) 22 изолята грибов рода *Candida*, выделенных из влагалища;
- 3) 10 природных изолятов грибов рода *Candida*, выделенных из корма рыб, имаго комаров, ЖКТ кивсяка и почвы, которые были любезно предоставлены кафедрой биологии почв факультета почвоведения МГУ.

Все культуры оценивали по адгезивной способности к буккальным эпителиоцитам человека in vitro. Считали показатель адгезии – общее число адгезированных дрожжей на 100 эпителиальных клеток (контроль).

Для анализа прочности адгезивных контактов эпителиоциты с прикрепленными кандидами наслаивали на фиколл – верографин (плотность 1,077 мкг/см³) и центрифугировали при 1000 об/мин 15 минут. Затем из отмытого клеточного осадка (прошедшие сквозь градиент эпителиоциты) делали мазок и считали показатель прочности адгезии (опыт).

Процент прочноадгезированных кандид определяли по формуле: $X \text{ опыт} / X \text{ контроль} \times 100\%$,

где X контроль – среднее количество адгезированных кандид в пересчете на 1 эпителиоцит до центрифугирования через фиколл-верографин; X опыт – количество адгезированных кандид в пересчете на 1 эпителиоцит после центрифугирования через фиколл-верографин.

Результаты.

1. Вагинальные и оральные культуры грибов рода *Candida* продемонстрировали одинаковый средний показатель адгезии (7,7 и 7,1), в два раза превышающий показатель адгезии природных штаммов (3,8).

2. Оральные, вагинальные и природные изоляты характеризовались сходным показателем прочности адгезии (2,8; 2,3 и 1,7 соответственно), хотя процент прочноадгезированных кандид по отношению ко всем адгезированным клеткам был выше среди природных штаммов (47,8 %), по сравнению с вагинальными (31,3 %) и оральными (34,1 %) изолятами.

Вывод.

На основании полученных данных можно сказать, что природные изоляты грибов рода *Candida* обладают высокой адаптивной способностью, что проявляется в более высокой эффективности адгезии (прочности связи с эпителием), в сравнении с клиническими изолятами, при условии сниженного (в 2 раза) количества клеток, проявляющих способность к адгезии.

КИЛЛЕРНАЯ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA ALBICANS*

Арзуманян В.Г., Ожован И.М.

НИИ Вакцин и сывороток имени Мечникова И.И. РАМН
Москва

Наиболее широко известными и хорошо изученными из списка клинически значимых грибов являются дрожжи *Candida albicans*. У здоровых людей эти микроорганизмы заселяют слизистые оболочки, однако, у иммунокомпрометированных носителей их можно обнаружить на коже (атопический дерматит, экзема, псориаз, ВИЧ и др.) [Арзуманян В.Г., 2002]. Известно, что, аналогично многим родам дрожжей, *Candida spp.* экскретируют антагонистические вещества белковой природы – микоцины – активные против некоторых других родов дрожжей [Prilinskirk G., Young T. W., 1975]. Однако отсутствуют данные о наличии такой активности по отношению к облигатным симбионтам человека – дрожжам рода *Malassezia*, которые населяют кожные покровы большинства здоровых взрослых людей. Антагонистическая активность *Malassezia spp.* изучена нами ранее и представлена в виде двух активных начал – белкового и липидного [Арзуманян В.Г. с соавт., 2003]. Целью настоящего исследования явилось изучение спектра действия киллерных токсинов *C. albicans* в отношении других родов дрожжей, встречающихся в клинической практике, а также взаимного влияния *C. albicans* и *M. furfur*.

Все штаммы дрожжей: *Rhodotorula spp.* (2 изолята), *Cryptococcus spp.* (2), *Trichosporon spp.* (2), *Geotrichum spp.* (2), *C. albicans* (11), *Malassezia*

furfur (1), *M. globosa* (1), *M. sympodialis* (8) взяты из коллекции ГУ НИИВС имени Мечникова. Оценку антагонистической активности проводили, как описано ранее – количественным методом отсроченного антагонизма на «перевернутом» агаре и путем обработки клеток концентратом культуральной жидкости (КЖ) *S. albicans* [Арзуманян В. Г. с соавт., 2003].

В результате экспериментов на «перевернутом» агаре удалось выяснить следующее: средние показатели чувствительности к метаболитам *S. albicans* убывали в ряду *Cryptococcus* – *Trichosporon* – *Malassezia* – *Rhodotorula* – *Geotrichum*. Эти опыты выявили также наиболее антагонистически активный штамм *S. albicans* № 927, к которому были чувствительны 61,1% всех изученных культур. Метаболитами данного штамма обрабатывали клетки трех видов *Malassezia*, и оказалось, что после 24-часовой инкубации с КЖ численность живых клеток по сравнению с контролем снижалась на 29,8% у *M. sympodialis* NN, на 30,8% – у *M. furfur* N 607 и на 36,2% – у *M. globosa* NY. Термообработка КЖ путем автоклавирования при 0,5 ат в течение 30 мин приводила к полной потере киллерной активности. Кроме того, субстанция обладала выраженным дозо-зависимым действием.

Взаимное влияние наиболее антагонистически активных штаммов *S. albicans* № 927 и *M. furfur* N 607 оценивали в опытах на агаризованной среде Диксона и синтетической среде [Арзуманян В.Г., 1999], нанесенной по обе стороны капроновой сетки, натянутой между пластиковыми кольцами. На одну сторону агара засеивали *S. albicans*, на другую через несколько минут – *M. furfur*. Количество вносимого материала рассчитывали таким образом, чтобы получить порядка 100 колоний. Аналогично засеивали контрольные чашки. Все образцы инкубировали при 32°C в течение нескольких суток, каждый день оценивая численность и размеры колоний. На обеих средах результат оказался одинаковым: культура *S. albicans* вырастала на первые сутки, всего на 6-8 часов опережая *M. furfur*. По обилию колоний ни та, ни другая культура не отличалась от контрольной, однако, размеры колоний у обоих штаммов были значительно меньше в опытных вариантах. Так на 7 сутки средний диаметр колоний в контролях составлял 1,5-2 мм, тогда как в опытных чашках – 0,3-0,5 мм.

Таким образом, киллерная субстанция дрожжей *S. albicans* представлена термолabileм веществом, которое активно по отношению ко многим клинически значимым родам дрожжей. Кроме того, при одновременном заселении экотопа дрожжами *S. albicans* и *M. furfur* они испытывают взаимное фунгистатическое воздействие.

К ХАРАКТЕРИСТИКЕ ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ДЕРМАТОФИТОВ

Евсенко М.С., Сергеев А.Ю.
Национальная академия микологии
Москва

Одной из основных характеристик всех представителей дерматофитов является кератинолитическая активность: способность разлагать кератин животных и/или человека. Кератиназы дерматофитов относятся к так называемым щелочным сериновым протеиназам. Они функционируют в щелочных или близких к нейтральным условиям (pH = 8). В частности, у *T. rubrum* имеется два фермента-протеиназы с высоким сродством к кератину и массами 71 и 93 kDa.

Активность кератиназ и вообще протеолитических ферментов считается основой патогенных свойств дерматофитов. Сами кератиназы способны разлагать не только кератин, но и другие животные белки, в том числе коллаген и эластин. С вирулентностью дерматофитов и интенсивностью воспалительной реакции ассоциируется эластазная активность. Так, зернистая разновидность *T. mentagrophytes* вызывает более яркую воспалительную реакцию и отличается высокой эластазной активностью от бархатистой разновидности. Помимо кератиназ ферментов, важную роль в патогенезе дерматофитии играют ферменты, проявляющие активность в кислой среде, близкой к среде кожи человека. По данным Ародаса и McKerrrow (1989), в логарифмической фазе роста дерматофитной колонии в кератинизированной ткани преобладает активность протеиназ без выраженного сродства к кератину.

Активность кератиназ неодинакова у разных дерматофитов. Наиболее высокой активностью отличается *T. mentagrophytes*, весьма умеренной – *T. rubrum*. В то же время именно *T. rubrum* – преобладающий возбудитель дерматофитии. Это может означать, что в патогенезе дерматофитии участвуют и другие, не менее важные факторы. Способности разлагать разные типы кератина в целом соответствует локализация дерматофитной инфекции. Так, *E. floccosum* – вид с невысокой кератинолитической активностью – никогда не поражает волосы.

В этом отношении представляет значительный интерес поиск и анализ экспрессии генов, ответственных за образование разных кератиназ в ходе инфекции.

Внедрение колонии возбудителя в эпидермис, обеспечивается как кератинолитической активностью, так и ростом гиф. Как плесневые грибы, дерматофиты имеют специализированный аппарат для направленного роста гифы. Он направлен в точки наименьшего сопротивления, как правило, в стыки между смежными клетками. В месте продвижения, т.е. отрастания новой гифы, грибовая клетка концентрирует везикулы с ферментами, синтезирующими вещество будущей

мембраны и клеточной стенки, а также протеиназами. Пенетрирующие гифы дерматофитов традиционно считают особыми органами-перфораторами. До сих пор неясно, чья роль в инвазивном процессе важнее — кератиназ или давления направленного роста.

Глубина продвижения грибковой колонии в эпидермисе ограничена. При инфекциях кожи дерматофиты редко проникают глубже зернистого слоя, где их встречают естественные и специфические факторы защиты. Таким образом, дерматофитная инфекция охватывает только неживые, ороговевшие ткани.

Имеющиеся данные о факторах защиты макроорганизма при дерматофитии подвергают сомнению точку зрения некоторых авторов о том, что при данной инфекции происходит лимфогематогенное распространение возбудителя или его залегание в неороговевающих тканях, омываемых кровью. Глубокие формы дерматофитии описаны у больных с выраженным дефицитом одного или нескольких факторов резистентности.

Известно, что инфекция, вызываемая *T. rubrum*, сопровождается значительно менее интенсивной воспалительной реакцией, чем при микроспории (например, от *M. canis*). Кроме того, дерматофитии с выраженной воспалительной реакцией (например, от *T. verrucosum*) часто приводят к последующей невосприимчивости к данному возбудителю. Это отчасти можно объяснить тем, что антигены зоофильных видов более чужды организму человека, а антропофильных — наоборот, приспособлены для паразитирования. Однако были описаны феномены иммуномодуляции гликопротеином (маннаном) *T. rubrum*. Маннанные компоненты *T. rubrum*, связываясь с моноцитами, угнетают функции лимфоцитов и замедленную гиперчувствительность. Описано также угнетающее действие *T. mentagrophytes var. interdigitale* на фагоцитоз.

Вместе с тем, бытующие представления о дерматофитии как непосредственном следствии иммунодефицита или соответствующей предрасположенности следует признать не имеющими достаточных оснований — как в силу широкой распространенности инфекции, так и в силу фрагментарности данных, подтверждающих те или иные изменения иммунореактивности.

Глава 3.

МИКОЭКОЛОГИЯ. БОЛЕЗНЕТВОРНЫЕ ГРИБЫ И СОВРЕМЕННОЕ ОКРУЖЕНИЕ ЧЕЛОВЕКА

МИКОЗЫ И МИКОГЕННАЯ АЛЛЕРГИЯ КАК АНТРОПОГЕННО-ОЧАГОВЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Антонов В.Б.

НИИ медицинской микологии имени П.Н. Кашкина СПб МАПО
Санкт-Петербург

В мире сохраняется тенденция к росту количества микотических заболеваний, вызываемых условно патогенными микромицетами. Широкое применение антибактериальных антибиотиков, цитостатиков и стероидных гормонов, развитие хирургии, реаниматологии, неонатологии дает возможность спасать больных, ранее обреченных на гибель, но это же приводит к увеличению числа лиц с ущербным иммунитетом. Кандидоз, аспергиллёз кожи, слизистых оболочек и внутренних органов все чаще осложняют течение болезней не только у отдельных больных, но и у целых групп, объединенных общим заболеванием, однотипностью лечения и местом проживания или лечения. Количество микозов в лечебных учреждениях увеличивается на 5-10% в год и каждые 10 лет удваивается. Некоторые производственные условия становятся базой массовых вспышек грибковых заболеваний. Неблагоустроенный быт в современных мегаполисах создает условия для формирования групп больных микогенной аллергией с поражением в первую очередь органов дыхания.

Анализ эпидемического процесса массовых вспышек микозов демонстрирует поливариантность формирования антропогенных очагов грибковых заболеваний.

В родильном доме участились заболевания детей первых дней жизни генерализованным кандидозом со смертельными исходами. Из 34 заболевших умерли 14 младенцев. Возбудителем инфекции оказался *Candida krusei*, выделенный из органов умерших новорожденных, а также с рук персонала, инструментов и предметов ухода за больными. Вывод: массовая вспышка генерализованного кандидоза со смертельными исходами явилась результатом грубого нарушения санитарных норм ухода за новорожденными. Закрытие родильного дома, ремонт и обработка помещений антисептическими средствами, занятия с врачами и вспомогательным медицинским персоналом по диагностике, лечению и профилактике грибковых заболеваний позволили предотвратить повторение массовых вспышек кандидоза.

В гематологическом отделении многопрофильной больницы умерли шесть больных гемобластомами после проведения им курса полихимиотерапии, осложнившейся острой пневмонией. Из органов седьмого умершего выделен *Aspergillus fumigatus*. Ретроспективно тот же возбудитель был выделен из тканей ранее умерших больных. В воздухе палат обнаружено повышенное количество спор этого же гриба. Причиной

вспышки аспергиллеза были споры *A. fumigatus*, занесенные в палаты потоками воздуха с поверхности гигантских колоний плесневых грибов, выросших на конденсате в каналах приточно-вытяжной вентиляции. Ремонт и дезинфекция вентиляционной системы, дезинфекция палат предотвратили дальнейшие вспышки аспергиллеза у больных.

Среди технического персонала Атомной электростанции были большие трудовые потери, связанные с массовым заболеванием микозами стоп с онихомикозом, осложненными бактериальной инфекцией. Микологическое обследование моечного помещения, в котором все сотрудники предприятия по окончании работы принимали душ, показало высокую обсемененность дерматомицетами душевых кабин, а также стен, ковриков, скамеек раздевалок. Лечение больных, санитарная обработка помещений, занятия с персоналом по производственной гигиене позволили прервать вспышку микозов стоп и не допустить ее рецидивов.

Анализ приведенных и других вариантов массовых заболеваний микозами и микогенной аллергией, которые предполагается представить в докладе, дают возможность сформулировать концепцию о микозах как об антропогенно-очаговых заболеваниях с характерным для них строго очерченным эпидемическим процессом. Его постоянными чертами являются формирование групп высокого риска микозов в результате концентрации потенциальных больных на общей территории и создание условий для трансформации сапротрофной формы существования микромицет в паразитарную на живом макроорганизме. Требуют дальнейшего изучения особенности эпидемического процесса при эндогенной и экзогенной микотических инфекциях.

Для активизации факторов агрессии у дрожжевых грибов ведущее значение имеет снижение иммунитета у больных, а в развитии патологического процесса – сочетание иммунодефицита и формирование «госпитальных» штаммов возбудителя. Инфекционный процесс, вызываемый мицелиальными грибами, возникает в условиях повышенной концентрации спор грибов в воздухе, превышающей некоторый еще не установленный для разных потенциальных возбудителей порог толерантности, свойственный человеку. Повышение контаминации спорами грибов воздуха не свойственно природной среде, оно возникает, как правило, в антропогенных условиях (жилые, производственные помещения, больницы, пенитенциарная система). Исключение составляют так называемые эндемические микозы (гистоплазмоз и некоторые другие), не имеющие значения для России и стран СНГ.

Групповая сенсibilизация человека к антигенам (АГ) микромицет реализуется в бытовых или производственных условиях при температурно-влажностных режимах, благоприятных для образования гигантских колоний мицелиальных грибов, являющихся стабильным источником АГ. Обычная мишень сенсibilизации в этих случаях – органы дыхания, а очаги групповых вспышек – квартиры, библиотеки, офисы, оборудованные кондиционерами. В отличие от больниц, предраспола-

гающих к инфекционным микозам, в перечисленных условиях микогенными аллергиями заболевают лица с интактной иммунной системой. Массовая сенсibilизация населения возможна при загрязнении воздуха городских и поселковых поселений выбросами во внешнюю среду продуктов микробиологического производства. В восьмидесятые годы XX века наблюдалось несколько вспышек экологически обусловленной бронхиальной астмы среди жителей ряда городов России, непосредственно не связанных с производством, но проживающих в районах загрязнения среды продукцией биохимических заводов, производящих кормовые добавки для сельскохозяйственных животных с использованием в качестве продуцента продукта *Candida maltosa*.

Ликвидация источника возбудителя в больничных условиях приводит к купированию вспышки больничных микозов, своевременный ремонт квартир и производственных помещений препятствует массовым заболеваниям в этих условиях, совершенствование технологии микробиологического производства позволяет избежать массовой сенсibilизации населения районов расположения биохимических заводов.

Признание концепции антропогенно-очаговых микозов и микогенной аллергии, представление о поливариантности механизмов эпидемиологического процесса при них позволит не только прерывать массовые и групповые микотические заболевания, но и успешно предупреждать их.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НЕФТЕПРОДУКТОВ НА НАКОПЛЕНИЕ ОПОРТУНИСТИЧЕСКИХ МИКРОМИЦЕТОВ В ПОЧВЕ С ПОМОЩЬЮ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

Водопьянов В.В., Киреева Н.А.

*Уфимский государственный авиационный технический университет
Башкирский государственный университет
Уфа*

Одной из актуальных задач медицинской микологии является оценка накопления оппортунистических микромицетов при техногенном загрязнении и выявления их роли в возникновении микозов, микогенной аллергии и микотоксикозов. Для понимания процессов, происходящих в почве, и для оценки результатов загрязнения поллютантами почвы проводилось математическое моделирование динамики прорастания грибных спор. При построении модели исходили из следующих предположений: практически прорастание грибных спор происходит в короткий период и рост лимитирован во времени.

В естественных условиях, когда в почве имеется определенный пул грибных спор, внесение поллютантов изменяет условия их суще-

ствования. В качестве математической модели рассматривается следующее уравнение:

$$\frac{dS}{dt} = \begin{cases} \frac{nT^n S^2}{k_1 S_m t^{n+1}}, & 0 < t \leq t_0 \\ \frac{nT^n (S - S_0)^2}{(k_2 - k_1) S_m (t - t_0)^{n+1}}, & t > t_0 \end{cases}.$$

Здесь S_m — обозначает максимальное количество грибов, которое может прорасти в исследуемом объеме почвы при наличии всех необходимых условий роста, t_0 — момент внесения поллютанта в почву, S_0 — численность спор в почве в момент t_0 , k_1 , k_2 — коэффициенты, характеризующие экологические условия до и после загрязнения, T — момент времени, в который численность спор достигает половины kS_m . Степень n — определяется в зависимости от промежутка времени, в котором происходит рост грибов, чем короче этот промежуток, тем больше необходимо брать n . В случае, когда внесения поллютанта происходит в момент практически установившейся численности спор в почве, решение уравнения имеет вид:

$$S(t) = \begin{cases} \frac{k_1 S_m t^n}{T^n + t^n}, & 0 < t \leq t_0 \\ S_0 + \frac{(k_2 - k_1) S_m (t - t_0)^n}{T^n + (t - t_0)^n}, & t > t_0 \end{cases}.$$

В предположении, что в условиях эксперимента используется одна и та же почва, выбирается один и тот же момент подсчета грибных спор, можно считать, что внешние воздействия среды влияют лишь на коэффициент k_2 . Последнее означает, что наиболее содержательным для оценки влияния внешних факторов среды является вычисление отношений количества проросших грибных спор в моделируемых условиях к контрольному варианту.

Построенная модель адекватно описывает протекающие в нефтезагрязненной почве процессы роста микромицетов. Проведенные эксперименты и их моделирование с использованием приведенной математической модели показало, что коэффициент k_2 в случае описания общей численности грибных спор линейным образом растет в зависимости от дозы загрязнения (коэффициент детерминации 0,87). В случае же патогенных микромицетов рост коэффициента k_2 носит экспоненциальный характер.

Таким образом, методами математического моделирования показано существенное увеличение группы патогенных микромицетов в комплексе микроскопических грибов в почвах, загрязненных нефтью.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ОПОРТУНИСТИЧЕСКИХ ГРИБОВ В МИКРОБИОТЕ БИОПОВРЕЖДЕНИЙ ПОЛИМЕРОВ КОСМИЧЕСКОЙ ТЕХНИКИ

Геворкян С.А.¹, Кураков А.В.²,
Новикова Н.Д.³, Гогинян В.Б.¹

¹ Республиканский Центр Депонирования микробов НАН Армении
Абовян, Армения

² Кафедра Биологии Почв, Факультет Почвоведения, МГУ имени
Ломоносова

³ ГНЦ РФ – Институт Медико-Биологических Проблем РАН
Москва

Опыт более чем 40-летней истории обитаемых космических полетов с очевидностью показал исключительную важность обеспечения их санитарно-гигиенической и эпидемиологической безопасности. Широкое распространение плесневых грибов в природе, их постоянное присутствие в ближайшем окружении и среде обитания человека обуславливают особое значение исследований о возможности присутствия и развития в микробиоте космических материалов и технике токсиногенных и оппортунистических форм грибов.

В настоящей работе представлены результаты микробиологических анализов 20 биоповрежденных образцов полимерных материалов из Орбитального комплекса (ОК) «Мир» и Международной космической станции (МКС). При этом ставилась задача методом накопительных культур выявить даже те микроорганизмы, в том числе экстремофильные формы, которые присутствуют на обследуемых образцах в единичном количестве. В этих целях использован градиентный термостат (Temperature Gradient Incubator, Toyo Kagaku Sangyo Co., Japan), обеспечивающий инкубирование микроорганизмов в диапазоне температур от 5 до 70°, в режиме постоянного перемешивания. Высевы из накопительных культур производились при инкубации не менее 15-20 дней.

Выбор питательных сред и условий культивирования обеспечивал выделение разнообразных групп микроорганизмов (неспорозные и спорозные бактерии, микромицеты, дрожжи, актиномицеты и хемолитотрофные бактерии), а также их экстремофильных форм, а именно: ацидофилов, развивающихся при pH 2-4, алкалофилов с оптимумом роста при pH 9 и более, галофилов, развивающихся при концентрации NaCl 15% и выше, психрофилов, растущих при 5-10°C, факультативных (45-55°C) и облигатных (56°C и выше) термофилов.

В результате микробиологических исследований выделено 205 штаммов микроорганизмов, включая 124 культуры плесневых грибов, потенциальных деградантов полимерных материалов.

Применение метода накопительных культур позволило получить ряд штаммов грибов, и, охарактеризовать типичные и доминантные формы микромицетов на биоповрежденных полимерных материалах и оборудовании. На основании интегрированной оценки морфо-физиологических свойств эти штаммы идентифицированы как *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *A. versicolor*, *Cladosporium macrocarpum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. melinii*, *Ulocladium botrytis*, *Phoma eupyrena*.

Анализ данных позволил определить перечень микромицетов, проявляющих способность к резидентному заселению конструкционных материалов интерьера и оборудования обитаемых отсеков станций, а также характеризующихся, в том числе по многочисленным литературным данным, условно патогенными свойствами оппортунистических грибов. Результаты исследований свидетельствуют об экспансии подобных видов грибов, среди которых по частоте распространения являются *Penicillium aurantiogriseum*, *P. melinii*, *Aspergillus versicolor*, *A. fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*.

Отобраны наиболее агрессивные по биоповреждающим свойствам к полимерным материалам и потенциально опасные для человека штаммы грибов и изучены их морфо-физиологические и биохимические особенности. Наиболее характерными представителями этой группы из грибных биодеградантов являются следующие культуры.

Penicillium aurantiogriseum, штамм 12057 (рис. 1), выделен из фрагмента оборудования ОК «Мир». Широко распространенный вид, характеризуется диапазоном температурного роста 4-40°, оптимум 26°. Часто встречается на полимерных материалах в различных экологических условиях, особенно в производственных помещениях. Штамм обладает высокой ферментативной активностью и хорошо адаптируется на полимерах разных классов.

Aspergillus versicolor, шт. 12042 (рис. 2), выделен из фрагмента оборудования ОК «Мир». Широко распространенный вид, однако, по сравнению с другими представителями рода *Aspergillus*, чаще встречается в регионах с холодным климатом. Растет в диапазоне температур 4-40°, оптимум 22-25°. Конидии прорастают при температуре 12-37°, и минимальном водном потенциале –290 баров. Рост возможен в растворах 30% NaCl и 40% сахарозы. На стекле споры прорастают при водном потенциале в <-200 баров (aw=0,85), активный рост мицелля на стекле возможен вплоть до <-150 баров (aw=0,90). Формирует микроколонии с конидиальными структурами и конидиями в течение

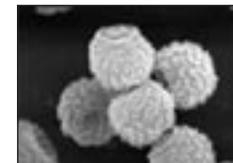


Рис. 1. *Penicillium aurantiogriseum* 12042 (споры, микрофотография, увеличение x18000)

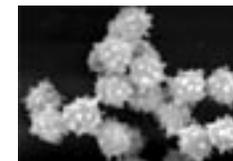


Рис. 2. *Aspergillus versicolor* 12042 (споры, микрофотография, увеличение x10000)

нескольких дней при относительной влажности $a_w=0,9-1,0$ и олиготрофных условиях. Штамм толерантен к изменениям pH, способен к росту в атмосфере N_2 и повышенных концентрациях CO_2 . Биодегрант с широким спектром колонизации на синтетических полимерах.

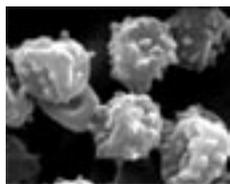


Рис. 3. *Aspergillus fumigatus* 12036 (споры, микрофотография, увеличение $\times 18000$)

в присутствии биотина и тиамин. Наиболее подвержены поражению кремнийсодержащие полимеры, полиуретаны, техническая резина, поливинилхлорид.

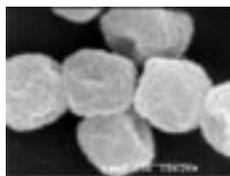


Рис. 4. *Penicillium chrysogenum* 12039 (споры, микрофотография, увеличение $\times 18000$)

характеризуется обрастанием комплексных полимерных материалов (прорезиненная ткань, фтлопласты, полиимиды и др.).

Процессы биоповреждения и биоразрушения инициируют развитие микробных очагов потенциальных инфекций. Полимерные материалы с микробными поражениями могут быть источниками подобных осложнений, что повышает актуальность разработки биоустойчивых материалов. На основе проведенных работ в Республиканском Центре Депонирования микробов НАН Армении создана Коллекция культур грибных биодегрантов полимерных материалов с Базой данных.

Работа проведена в рамках Проекта МНТЦ #А-092.2

ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЗАЩИТЫ МАТЕРИАЛОВ ОТ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

Гончарова И.А., Мицкевич А.Г., Ровбель Н.М.
Институт микробиологии НАНБ
Минск, Беларусь

В последние десятилетия аллергические болезни превратились в глобальную медико-социальную проблему и были введены в список болезней цивилизации. Отмечается постоянный рост числа аллергических заболеваний среди городского населения, проводящего значительную часть времени в закрытых помещениях. К числу наиболее сильных аллергенов относят споры микроскопических мицелиальных грибов, которые часто называют плесенью. Плесень может появиться в квартире почти на любой поверхности, которая сохраняет излишнее количество влаги — на кирпичах, штукатурке, линолеуме, обоях.

Находящиеся в воздухе грибные споры являются не только экзогенными аллергенами, но и могут быть причиной развития микозов. В процессе жизнедеятельности грибы синтезируют ряд летучих органических соединений, которые не только придают характерный неприятный запах, но и оказывают негативное влияние на здоровье людей, способствуя развитию ряда заболеваний, в том числе онкологических.

Для эффективной борьбы с плесневением рекомендуется целая система мероприятий, включающая наряду с устранением источника сырости применение химических средств защиты — фунгицидов (антисептиков). Для обеспечения длительного защитного эффекта антисептики добавляют в лакокрасочные материалы, которые при высыхании образуют покрытия с фунгицидными свойствами.

Оценка эффективности защиты материалов от грибного поражения всегда представляла значительные трудности, вызываемые сложностью вопроса и многообразием условий применения фунгицидных препаратов. В настоящее время существует целый ряд методов для испытания фунгицидной активности. Одни из них используются для определения отдельных свойств. Это относительно быстрые лабораторные методы. Другие — для определения суммарных показателей — защищающей способности. Они включают как лабораторные методы, так и длительные методы испытаний в природных условиях (натурные методы) и предназначены для выяснения границ применимости фунгицидов и сроков службы защищенных ими материалов и изделий.

Большинство методов имеют серьезные недостатки и не отвечают современным требованиям. Это приводит к неадекватности оценки при учете результатов испытаний одних и тех же материалов. Использование в качестве тест-организмов штаммов коллекционных культур,

рекомендованных соответствующими стандартами и выращенных на искусственных питательных средах, в ряде случаев приводит к снижению достоверности испытаний. Это связано с тем, что музейные культуры адаптируются на искусственных средах и теряют свою агрессивность по отношению к испытываемому материалу. Кроме того, сложная, часто неоднородная, капиллярно-пористая структура строительных материалов затрудняет создание оптимального режима влажности для тест-культур.

С целью оптимизации и стандартизации условий роста микроскопических мицелиальных грибов на поверхности бетона, древесины, бумаги, лакокрасочных покрытий, других природных и синтетических материалов с фунгицидными добавками был разработан метод «агаровой сетки». Сущность метода заключается в том, что поверхность испытуемых образцов, помещенных в чашки Петри, наносят небольшое количество стандартной агаризованной питательной среды (среда Чапека, Чапека-Докса и др.), которая при застывании была тщательно перемешана и смешана со спорами тест-культуры гриба.

Инокулированную среду равномерно распределяют по поверхности образца в присутствии сетчатого шаблона. После снятия шаблона на образце остается так называемая «агаровая сетка», представляющая собой разделенный на миниатюрные блоки сетью борозд слой агаризованной среды, высота которого равна толщине сетчатого шаблона. Чтобы избежать высыхания среды образцы помещают на увлажненные бумажные фильтры или слой агарового геля («голодный агар»). Чашки Петри инкубируют в термостате с оптимальной для роста гриба температурой.

Через определенные промежутки времени, не реже чем 1 раз в сутки, несколько ячеек агаровой сетки снимают с образцов, помещают на предметные стекла в каплю воды и микроскопируют в проходящем свете.

В качестве критерия фунгитоксичности была выбрана длительность лаг-фазы (время от нанесения агаровой сетки до начала массового прорастания спор). Данный параметр хорошо коррелирует с концентрацией биоцидных препаратов в пропиточных растворах или лакокрасочных покрытиях. Исследования показали нецелесообразность проведения испытаний более 10 суток. Данного срока достаточно для выявления, способности материалов ингибировать рост плесневых грибов (частичного или полностью) или отсутствие у них фунгитоксичности.

Для удобства определения степени прорастания спор лучше использовать быстрорастущие виды с крупными темными спорами, у которых лаг-фаза в оптимальных условиях составляет 12-18 часов.

Изучение влияния биоцидных препаратов с различной концентрацией на развитие микромицетов различной видовой и штаммовой принадлежности выявило, что одни культуры чутко реагируют на повышенные концентрации биоцида удлинением лаг-фазы, другие — отличаются

высокой устойчивостью к антисептикам, заметная задержка прорастания спор у них наблюдается при сравнительно высокой токсичности материала.

В качестве тест-культуры можно использовать оба типа грибов. При необходимости быстрого отбора из большого количества образцов вариантов антисептической обработки, придающих материалам высокую фунгицидную активность, лучше использовать культуры, устойчивые к неблагоприятным воздействиям. Например, на 1 этапе отбора оставить варианты, где лаг-фаза резистентной культуры превышает 2 суток. При отработке технологических режимов, оценке устойчивости к внешним воздействиям и в других аналогичных исследованиях целесообразно использовать культуры, чувствительные к антисептикам.

Метод «агаровой сетки» позволяет количественно охарактеризовать фунгицидную активность материалов и в тех случаях, когда содержание антисептического препарата превышает минимальные ингибирующие концентрации. На практике антисептик нередко вносят с «запасом прочности», и выявить остаточную фунгицидную активность в том случае, когда рост и развитие грибов полностью ингибируется, довольно сложно. Химические методы могут определить лишь количество вещества, которое может находиться в активной или неактивной по отношению к живым организмам форме. В таких случаях критерием фунгитоксичности будет служить минимальное время контакта агаровой сетки с образцом вызывающее потерю жизнеспособности спор.

ПРОБЛЕМА МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКОГО РИСКА В ОБИТАЕМЫХ КОСМИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

*Дешевая Е.А., Новикова Н.Д., Поддубко С.В.
ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН
Москва*

В процессе многолетней эксплуатации станции МИР и начальном этапе функционирования Международной космической станции регулярно проводились исследования количественного и видового состава грибного компонента микробного сообщества, формирующегося в обитаемых отсеках станции. До 40% видов грибов, обнаруженных в среде обитания указанных космических станций, известны в качестве условно-патогенных возбудителей различных заболеваний у человека, т.е. при определенных условиях (астенизация организма, иммунодефицитные состояния и др.) они способны вызывать токсико-аллергические заболевания и патологические процессы. Из среды обитания космических станций

были выделены такие виды как *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Alternaria alternata*, *Penicillium crustosum*, *Cryptococcus neoformans* и др.

Существующие нормативные документы, регламентирующие безопасность среды обитания по микробиологическим показателям, определяют «допустимую микробную нагрузку» для условно-патогенных организмов в замкнутом гермообъекте: для воздушной среды – 100 колониеобразующих единиц грибов в 1 м³, для поверхностей конструктивных материалов – 100 жизнеспособных единиц на 100 см². Вместе с тем, существует сложность расчетов, лимитирующих границы микробиологической безопасности. Решение этой задачи производится при выраженной гетеротрофности популяций грибов, на фоне индивидуальных различий резистентности к этим агентам, присущей здоровым людям, а также возможности развития у космонавтов иммунодефицитных состояний и изменений чувствительности организма к микромицетам.

Отдельный интерес представляет влияние микромицетов на развитие неинфекционных заболеваний, например аллергических. Сенситизация к грибным аллергенам была выявлена у ряда космонавтов после завершения длительных орбитальных экспедиций на станцию МИР О.Д. Мешковым (1998 г.). У ряда космонавтов активация аллергических реакций *in vitro* к ряду бактериальных и химических аллергенов сопровождалась положительной реакцией к *Aspergillus flavus*. Анализ полученных данных позволяет предполагать, что появление перекрестных аллергических реакций к широкому спектру антигенов могло развиваться вследствие контакта операторов со спорами грибов или продуктами их метаболизма во время их работы в местах с повышенной обсемененностью зачатками микромицетов.

Таким образом, присутствие грибов в среде обитания космических объектов (в воздухе, на поверхностях различных материалов), представляющих определенную опасность для экипажей, является значительным фактором медицинского риска при длительных сроках эксплуатации орбитальных станций.

САПРОТРОФНЫЕ МИКРОМИЦЕТЫ В ВОЗДУХЕ РАЗЛИЧНЫХ ПОМЕЩЕНИЙ г. ВЛАДИВОСТОКА

Егорова Л.Н., Климова Ю.А.
Биолого-почвенный институт ДВО РАН
Владивосток

Закономерности распространения сапротрофных микромицетов в антропогенных биотопах привлекают все большее внимание в связи с

многообразием форм патологии, обусловленных микроскопическими грибами, постоянно присутствующими в среде обитания человека, в том числе и в воздухе помещений.

Целью данного исследования было изучение видового состава и численности микромицетов, обитающих в воздухе помещений различного назначения – жилых, административных, больничных. Всего было обследовано 32 помещения г. Владивостока, в том числе: рабочие кабинеты Биолого-почвенного института и Ботанического сада-института ДВО РАН, жилые квартиры, расположенные на первых этажах в кирпичных домах различных лет застройки, а также кабинеты Приморского краевого наркологического диспансера и Городской стоматологической поликлиники. Отбор проб воздуха проводился в июле-августе 2003-2004 гг. Для выявления микобиоты воздуха использовался метод седиментации спор.

В результате проведенных исследований установлены средние значения концентрации спор грибов в воздухе обследованных помещений, которые варьировали в пределах 2-194 КОЕ/м³ в административных помещениях, от 5 до 108 КОЕ/м³ – в жилых, от 3 до 70 КОЕ/м³ – в больничных помещениях.

Таксономическая структура выявленной микобиоты представлена 32 видами из 17 родов, относящихся к трем классам. Класс *Zygomycetes* включает 5 видов из 3 родов – *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*; класс *Ascomycetes* – 2 вида из 2 родов – *Eurotium* и *Chaetomium*; класс *Hyphomycetes* – 27 видов из 12 родов – *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chrysonilia*, *Cladosporium*, *Humicola*, *Geotrichum*, *Oidiodendron*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Trichoderma*.

Наибольшим видовым разнообразием характеризуются 2 рода – *Penicillium* (7 видов) и *Aspergillus* (5 видов). Род *Cladosporium* представлен 3 видами, роды *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus* включают по 2 вида, остальные 11 родов – по одному виду каждый.

В воздухе административных помещений зарегистрировано 11 родов микромицетов, в том числе 2 рода зигомицетов и 9 родов гифомицетов. В воздухе жилых помещений обнаружено 8 родов, в том числе 2 – зигомицетов, 6 – гифомицетов. В воздухе больничных помещений найдено 7 родов, 6 из них гифомицеты, 1 – зигомицеты. Анализ родового состава микромицетов показал, что из 17 выявленных родов общими для микобиоты всех обследованных помещений являются только 4 рода: *Penicillium* (частота встречаемости 85-95%), *Cladosporium* (45-50%), *Alternaria* (40-50%), *Aspergillus* (30-40%). Еще 2 рода – *Mucor* и *Rhizopus* отмечены как в воздухе административных, так и жилых помещений, с частотой встречаемости менее 20%. Микромицеты родов *Sporotrichum*, *Humicola*, *Rhizomucor* входят в состав микобиоты только больничных помещений, *Trichoderma* и *Aureobasidium* – только жилых, *Geotrichum*, *Chrysonilia*, *Paecilomyces*, *Oidiodendron*, *Eurotium* и *Chaetomium* – только

административных. Частота встречаемости перечисленных родов микромицетов не превышает 10-15%.

В воздухе жилых помещений отмечено 13 видов микромицетов: *Aspergillus flavus* Link: Fr., *Aspergillus fumigatus* Fresen., *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl., *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud, *Cladosporium sphaerospermum* Penz., *Cl. cladosporioides* (Fresen.) G. A. De Vries, *Cl. herbarum* (Pers.:Fr.) Link, *Penicillium purpurogenum* O. Stoll, *P. chrysogenum* Thom, *P. citrinum* Thom, *Trichoderma viride* Pers.:Fr., *Mucor circinelloides* Tiegh., *Rhizopus arrhizus* A. Fischer.

Из воздуха больничных помещений выделено 12 видов микромицетов: *Aspergillus ochraceus* K. Wilh., *A. fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Sporotrichum pruinosum* Gilman et E. Abbott, *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* Samson, *Stolk et Hadlok*, *P. brevicompactum* Dierckx, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *Humicola grisea* Traaen, *Rhizomucor pusillus* (Lindt) M. A. A. Schipper, *Cladosporium cladosporioides*, *Cl. herbarum*.

В воздухе административных помещений зарегистрировано 20 видов микромицетов: *Alternaria tenuissima* (Kunze: Fr.) Wiltshire, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* Tiegh., *A. versicolor* (Vuill.) Tiraboschi, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *Penicillium claviforme* Bainier, *P. terlikowskii* Zaleski, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *Geotrichum candidum* Link, *Chrysonilia sitophila* (Montagne) von Arx, *Paecilomyces variotii* Bainier, *Oidiodendron echinulatum* Barron, *Mucor racemosus* Fresen., *Rhizopus nigricans* Ehrenb., *Eurotium amstelodami* Mangin (анаморфа *Aspergillus hollandicus* Samson et W. Gams), *Chaetomium globosum* Kunze: Fr, *Cladosporium cladosporioides*, *Cl. herbarum*.

Анализ видового состава выявленной микобиоты показал, что из 32 обнаруженных в воздухе обследованных помещений видов грибов только 6 видов гифомицетов являются общими для помещений всех типов и характеризуются наиболее высокими показателями частоты встречаемости: *Penicillium chrysogenum*, *P. citrinum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cl. herbarum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*.

Таким образом, в воздухе помещений различного назначения формируется достаточно своеобразная микобиота с общим доминирующим комплексом грибов, состоящим из четырех родов гифомицетов — *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria* и *Aspergillus*. Грибы класса *Zygomycetes* постоянно присутствуют в воздухе всех обследованных помещений, но характеризуются различным видовым составом в разных типах помещений. Представители класса *Ascomycetes* обнаружены только в воздухе административных помещений.

Следует отметить, что все вышеперечисленные виды микромицетов, входящие в состав микобиоты воздуха обследованных помещений, являются обычными обитателями почвы, а также контаминантами пищевых продуктов и биодеструкторами самых разнообразных материалов и изделий, окружающих человека в повседневной жизни. В то же время, многие из них принадлежат к числу патогенных и условно патогенных грибов, вызывающих различного рода микотические заболевания как

эндогенного, так и экзогенного характера. К ним относятся в первую очередь возбудители оппортунистических микозов из родов *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. hollandicus*) *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. citrinum*), *Cladosporium* (*Cl. sphaerospermum*, *Cl. cladosporioides*, *Cl. herbarum*), *Paecilomyces* (*P. variotii*), *Geotrichum* (*G. candidum*), *Mucor* (*M. circinelloides*), *Rhizomucor* (*R. pusillus*), *Rhizopus* (*R. arrhizus*). Определенными патогенными свойствами обладают также *Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Sporotrichum pruinosum*, *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma viride*, *Chrysonilia sitophila*. Обитая в воздухе помещений, они служат потенциально опасным источником инфекции, особенно для людей с пониженным иммунитетом и склонных к аллергическим заболеваниям.

Полученные результаты вносят определенный вклад в микологический мониторинг среды обитания человека, позволяют судить о ее санитарном состоянии и могут быть использованы для прогноза заболеваний, вызванных микроскопическими грибами.

ЗНАЧЕНИЕ БИОЦЕНОТИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ МЕЖДУ ПЛЕСНЕВЫМИ ГРИБАМИ И АЛЛЕРГЕННЫМИ КЛЕЩАМИ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ В ФОРМИРОВАНИИ ЭКСПОЗИЦИИ БЫТОВЫХ АЛЛЕРГЕНОВ

Желтикова Т.М.¹, Антропова А.Б.¹, Биланенко Е.Н.², Мокеева В.Л.², Чекунова Л.Н.², Петрова-Никитина А.Д.²

¹ НИИ вакцин и сывороток имени И.И.Мечникова РАМН

² МГУ имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет
Москва

В настоящее время выдвинуто предположение, что хроническая, суммарная экспозиция даже низкой концентрации различных бытовых аллергенов (1-10 мкг/год) приводит к развитию аллергических заболеваний у людей с генетической предрасположенностью к атопии (Pomes, 2002). Однако было бы не верно трактовать формирование комплексной экспозиции аллергенов в жилых помещениях как некий механистический процесс. Экспозиция бытовых аллергенов формируется не только вследствие жизнедеятельности отдельных организмов, населяющих домашнюю пыль, но и в результате биоценологических отношений между ними.

Плесневые грибы, клещи домашней пыли семейства *Pyroglyphidae*, а также амбарного комплекса семейств *Acaridae* и *Glycyphagidae* про-

дуцируют аллергены, сенсibilизация к которым может привести к развитию аллергических заболеваний: аллергического ринита, атопического дерматита, бронхиальной астмы. В настоящее время выдвинута гипотеза о том, что грибы могут играть роль неспецифических иммуногенных триггеров при развитии аллергических заболеваний и усиливать иммунный ответ на другие аллергены, в частности клещевые (Katz et al., 1999; Savilahti et al., 2001). Анализ литературы свидетельствует о том, что микромицеты и клещи связаны топическими, форическими и трофическими связями. Наиболее изучены в этом аспекте амбарные клещи. Сведения о пироглифидных клещах неполны и противоречивы.

Топически пироглифидные и амбарные клещи в домашней пыли связаны более чем с 250 видами плесневых грибов.

Микромицеты подготавливают пищевой субстрат для успешного усвоения его пироглифидными и амбарными клещами; компенсируют клещам недостаток витаминов и микроэлементов (Захваткин, 1941; Saint Georges-Grédelet, 1987; Douglas, Hart, 1989; Hay et al., 1993). При недостатке основного источника пищи амбарные клещи могут полностью переходить на грибную диету (Griffiths et al., 1959; Farahat, 1966). Клещи, в свою очередь, способствуют расселению спор грибов, перенося их на покровах или в пищеварительном тракте, что подтверждает обнаружение спор грибов на кутикуле, в кишечнике и фекальных шариках клещей. (Sinha et al., 1970; Douglas, Hart, 1989; наши данные).

Помимо данных о мутуалистических взаимодействиях между плесневыми грибами, пироглифидными и амбарными клещами, имеются сведения об их антагонистических отношениях. Известно, что многие микромицеты, в первую очередь энтомопатогенные, вырабатывают фермент хитиназу, которая способна разрушать хитиновый покров клещей, тем самым, делая их уязвимыми для дальнейшего проникновения инфекции (Abdel-Sater, Eraqy, 2001). Некоторые виды грибов выделяют токсины, оказывающие на клещей токсическое действие (Racovitza, 1969). Кроме того, обильное развитие грибного мицелия препятствует передвижению клещей и затрудняет потребление пищи, частицы которой оказываются плотно оплетенными гифами (Wharton, 1976; Lustgraaf, 1978). В то же время некоторые компоненты кутикулы клещей (гексил-2-формил-3-гидроксibenзоат), а также сами клещи, вырабатывая различные феромоны (тревоги, половые), могут оказывать фунгистатическое или фунгицидное действие на плесневые грибы (Kuwahara et al., 1989; Leal et al., 1990; Shimizu et al., 2001).

Как свидетельствуют наши данные, биоценологические отношения между плесневыми грибами и клещами необходимо учитывать при производстве клещевых аллергенов, сырьем для которых служат культуры пироглифидных и/или амбарных клещей, где, как правило, присутствует высокая концентрация микромицетов.

Таким образом, биоценологические отношения между микромицетами и клещами варьируют от мутуалистических до антагонистических, что, несомненно, находит отражение на структуре экспозиции бытовых аллергенов в жилых помещениях.

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКО-АЛЛЕРГЕННОЙ КОНТАМИНАЦИИ ПОЧВ ПРОМЫШЛЕННЫХ РЕГИОНОВ РОССИИ

Зачиняева А.В., Зачиняев Я.В., Соломенникова И.И.
Российская Военно-Медицинская Академия
Санкт-Петербурге

Необычайно широкая распространенность грибов в природе ставит грибковые аллергены на лидирующее место при аллергических заболеваниях кожи и дыхательных путей.

Несмотря на наличие многих действующих факторов в патогенезе микоаллергозов, не менее важным из них следует считать экологический фактор. Такие загрязнители окружающей среды, как сернистый газ, оксиды азота, частицы дизельных выхлопов и золы, повышают проницаемость слизистых оболочек, способствуя проникновению в организм аллергенов и возникновению Ig E – реакции. Эти поллютанты способны играть роль мощных адъювантов, усиливающих продукцию IgE. Такой адъювантный эффект прояв-ляется даже при низкой концентрации антигенно – активных веществ грибов, сопоставимой с той, которая присутствует в окружающей среде.

Анализ видового состава почвенных грибов, выделенных из почв промышленных регионов (Норильского промышленного района, Мончегорского промышленного района, Череповецкого промышленного района – ЧПР) показал, что техногенных почвах широко представлены виды, способные вызвать у населения этих регионов разнообразные патологические состояния: иммунодепрессию, различные формы аллергии, астму, синдромы интоксикации: микотоксикозы, (BRS – Building related syndrome; ODTS – organic dust toxic syndrome). Так загрязненные почвы Норильского промышленного района (НПР) представлены аллергенными грибами: *Penicillium aurantiogriseum* – 50%, *P. funiculosum* – 30%, *Cladosporium cladosporioides* – 60%, *Aspergillus ustus* – 30%, *Torula lucifiga* – 70%, *Paecilomyces variotii* – 70%, *Stachybotrys lobulata* – 30% (в процентах дана частота встречаемости вида). Грибы: *Trichoderma koningii* – 50%, *T. viride* – 50%, *Acremonium kiliense* – 50%, *P. aurantiogriseum* – 50%, *Aphanocladium araneorum* – 40%, *A. fumigatus* – 50%, *Stachybotrys*

alternans – 40% представлены в почвах Мончегорского промышленного района (МПР). Техногенные почвы ЧПР представлены митоспоровыми грибами: *T. koningii* – 80%, *P. funiculosum* – 60%, *A. fumigatus* – 60%, *Fusarium oxysporum* – 40%, *Torula convolute* – 40%, *Penicillium aurantiogriseum* – 40%, *V. tenerum* – 60%, *Alternaria alternata* – 40%.

Для оценки этиологической значимости микромицетов в развитии аллергических состояний у жителей промышленных регионов предлагается использовать показатель – «уровень контаминации грибковыми аллергенами (Levm)», который представляет собой модификацию ранее введенного Марфениной О.Е. «индекса микологической опасности»

$$\text{Levm} = \text{Im} \times \text{Lr},$$

где $\text{Im} = \text{D} \times \text{C}$, D – изменение разнообразия (числа видов) по сравнению с контролем потенциально патогенных видов (число раз);

C – изменение содержания (обилия) по сравнению с контролем потенциально патогенных видов (число раз);

Lr – уровень риска развития заболевания, который соответствует уровню BSL (biological safety levels), присвоенному соответствующему роду/ виду возбудителя заболевания человека.

Уровень контаминации грибковыми аллергенами почв НПР составил 10.2, а почв МПР и ЧПР соответственно 20 и 9.4.

Столь высока контаминация почв этих регионов грибковыми аллергенами, безусловно, оказывает существенный вклад на уровень заболеваемости населения этих регионов аллергическими заболеваниями, отсюда следует необходимость постоянного регионального мониторинга и контроля аллергической заболеваемости.

НАКОПЛЕНИЕ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ В НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВАХ И ПРИ РЕКУЛЬТИВАЦИИ

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

Башкирский госуниверситет
Институт биологии УНЦ РАН
Уфа

В настоящее время в результате возрастания техногенных нагрузок интенсивность естественных процессов самоочищения почв снижается. Это может создать условия для активации в ней патогенных и условно патогенных микроорганизмов. Среди многочисленных антропогенных поллютантов окружающей среды следует выделить нефть и ее персистентные компоненты, которые попадают в почву в процессе добычи, транспортировки, хранения и эксплуатации.

Почвенные микромицеты представляют собой группу микроорганизмов универсальную по своему значению для формирования плодородия почвы. Их численность угнеталась лишь в первые дни после загрязнения различных типов почв (выщелоченный чернозем, серая лесная и темно-серая лесная почвы) нефтью и нефтепродуктами в концентрации до 10%. Анализы, проведенные через месяц и более после искусственного загрязнения почвы, показали, что в этот срок оставшиеся в почве нефтяные углеводороды не ингибировали развития микроскопических грибов. Их численность даже возрастала. Наблюдалось и увеличение видового разнообразия. Однако, несмотря на увеличение разнообразия микромицетов и их участия в процессах самоочищения почвы, наблюдались и некоторые отрицательные тенденции в трансформации грибного комплекса.

В последние годы в связи с распространением иммунодефицитных состояний человека начинает уделяться внимание мониторингу в окружающей среде условно патогенных для человека видов микроскопических грибов. Из исследованных нами нефтезагрязненных почв часто выделялись виды, относящиеся к группе потенциальных возбудителей глубоких микозов у человека (BSL2), – *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Fusarium oxysporium*, *F. solani*. Рост частоты встречаемости в загрязненной нефтью почве условно патогенных видов грибов связан, по-видимому, с их хорошей приспособляемостью к условиям внешней среды. В почвах, загрязненных нефтепродуктами, типичными частыми становились *Aspergillus sydowi*, *A. candidus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *Fusarium moniliforme* – виды, являющиеся возбудителями онихомикозов, кератомикозов, системных и диссеминированных микозов, инвазивных аспергиллезов. При этом значительно увеличивалась доля темно-окрашенных грибов, значительная часть которых является потенциально аллергенными видами.

При биорекультивации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, с внесением биопрепаратов, содержащих активные штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов, происходило ускорение снижения содержания остаточных углеводов. При обработке загрязненных почв биопрепаратом Бациспектин содержание условно патогенных видов микромицетов, принадлежащих к родам *Aspergillus* и *Fusarium* снижалось незначительно. В противоположность этому биопрепараты Деворойл и Белвитамил способствовали снижению их содержания в загрязненных почвах. После обработки биопрепаратом Деворойл уменьшалось обилие видов *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. restrictus*, *A. sydowi*, *Fusarium sp.*

Таким образом, при загрязнении почв нефтью и нефтепродуктами увеличивалась частота встречаемости и обилие видов условно патогенных микромицетов. Внесение различных биопрепаратов для рекультивации загрязненных нефтью почв способствовали снижению их частоты встречаемости, однако их содержание не возвращалось в исходному

уровню, характерному для фоновых почв. Очевидно, необходима разработка специальных мер по предотвращению аккумуляции потенциально опасных видов микроскопических грибов в загрязненных нефтью почвах.

МЕСТА И ИСТОЧНИКИ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОПАГУЛ МИКРОМИЦЕТОВ В ПОМЕЩЕНИЯХ

Лихачев А.Н.

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

На основании топического, трофического критериев, анализа жизненных форм и экоморф грибы подразделяют на ряд экологических групп, отражающих, по мнению авторов, положение вида в экосистеме и его трофические связи (Мирчинк, 1982; Великанов 19. Дудка, 1974; Осипян, 1970; Бондарцева, и др., 1975; Бондарцева 1998; Борисова и др. 1998). Однако, учитывая незамкнутость экосистем и многообразие путей миграции грибов, они представлены гетерогенными группами как в систематическом плане, так оказываются сборными и в трофическом отношении, часть из которых являются постоянными обитателями тех или иных экониш – “резидентами” (Дудка, 19), приспособленных к определенным условиям существования и субстратам. Формирование микобиоты урбанизированных территорий и непосредственно зданий носит динамический, сезонный характер и зависит в первую очередь от естественных источников их развития и накопления (Антропова и др., 2003, 2004; Власов и др. 2004), а также способности адаптироваться к новым экологическим условиям и субстратам. О высокой скорости возможной адаптации микромицетов к большим концентрациям тяжелых металлов, пестицидов различного назначения и механизмами действия и других факторов стрессового воздействия имеется обширная литература.

Урбанизация и загрязнение окружающей среды больших территорий приводит к значительным изменениям ассоциаций микобиоты, находящихся под мощным воздействием антропогенных факторов (Марфенина и др., 2002). Территории с нарушенными гидрологическими параметрами, а только в Москве они занимают около 40% (Экология крупного города (на примере Москвы), 2001), приводит к созданию в зданиях условий для развития микроорганизмов на различных материалах.

Конвенционные потоки воздуха осуществляют основной перенос в помещения пропагул грибов, часто адсорбированных на частицах пыли (Антропова и др., 2003). В зданиях состав микобиоты, как правило, довольно лабилен по сезонам и формируется из заносных, оппорту-

нистических видов, входящих в состав биоаэрозолей, а также видами – контаминантами материалов из мест их заготовки, переработки и хранения.

Развитию микромицетов в зданиях способствует аварийные протечки, места с наличием образования капельножидких конденсатов влаги, нарушенной гидроизоляции фундаментов и стен, теплоизоляции, вентиляции и т.д. При реконструкции и модернизации зданий, в частности с использованием оконных конструкций из пластика, алюминия и деревоалюминия, неправильный их подбор и некачественный монтаж, приводит к появлению конденсата по периметру оконных коробок, что создает условия для развитию плесени. Подобное явление отмечается при декорировании фасадов с применением декоративного бетона и плохой заделке швов. Вероятнее всего, на материалах, в составе которых содержатся вещества естественного происхождения, например целлюлоза, минералы в строительных и отделочных смесей и т.д., могут развиваться в первую очередь комплексы видов тем или иным образом связанных в природе с этими субстратами (Нюкша, Каневская, 1970; Ребрикова, Сизова, 1975; Елинов, 1977; Митковская, Коваль, 2004). На материалах с минеральной, синтетической основой и металлах развивается ассоциация видов, которые характерны для определенных типов почв и биоаэрозолей экотопов, где проводятся эксперименты (Туркова, 1974, Lugauskas et al., 2004).

Конденсационная влага и капиллярное смачивание приводит к повышению влажности отделочных материалов и способствует развитию микромицетов на их внутренней стороне, например обоев, штукатурке и т.д. (Кондратюк и др., 2002; Лихачев, 2003; Ребрикова, Дмитриева, 2000; 2003). Наличие, особенно капельножидкой влаги, выводит пропагулы микромицетов из состояния анабиоза.

Анализ мест наибольшего накопления и адсорбции пылевых частиц с пропагулами микромицетов показал, что это происходит в вентиляционных системах как жилых, так и производственных помещений и может достигать 5,6 x 10⁶ КОЕ/г. При этом пропагулы видов рода *Aspergillus*, *Penicillium* выявлены и в помещениях даже при ламинарном (Петрова и др., 2003) и кондиционированном воздухообмене (Смоляницкая, 2004). Вероятно, элементы конструкций кондиционеров (Grillot et al., 1990), также как и радио- и телеаппаратуры, компьютеров могут служить источником концентрации пропагул грибов из-за статического заряда на деталях и направленного потока воздуха от вентиляторов.

Анализ микобиоты адсорбированного биоаэрозоля на деталях радио- и телеаппаратуры, компьютеров выявил наличие пропагул *Aspergillus niger* v. *Thiegh.*, *A. flavus* Lk., *A. fumigatus* Fres., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud, *Botrytis cinerea* Per.: Fr., *Cladosporium herbarum* (Pers.:Fr.) Link., *Paecilomyces variotii* Bainier, *Penicillium chrysogenum* Thom., *P. brevi-compactum* Dierckx, *Stachybotrys chartarum* (Ehrens) S. Hughes, *Trichoderma viride* Pers.:Fr., *Ulocladium* sp.

При этом наибольшая концентрация пропагул отмечена на деталях телевизора и лопастях вентиляторов компьютера и составляет до 9×10^5 КОЕ/г. В тоже время в пробах воздуха этих помещений количество микромицетов не превышало 15-45 КОЕ/м³ и стен 10- 20 КОЕ/дм². Вероятно, что их можно отнести к группе ксерофильных и ксеротолерантных видов, пропагулы которых могут долгое время сохранять жизнеспособность в “стационарных” условиях влажностно-температурного режима помещений.

Литературные данные и собственные исследования показывают, что наиболее характерными для зданий различного назначения и на разных материалах являются виды родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, которые составляют, вероятно, ядро микобиоты в помещениях не зависимо от сезона. Нарушение тепемпературно-влажностного режима, физико-химические свойства материалов определяют возможность развития и формирования на них представителей и из других родов, образующих на определенное время ассоциации микобиоты помещений с доминированием определенных видов (Нюкша, 1994; Богомолова и др., 1999; Ребрикова, 1999; Сычугова и др., 2003; Власов и др., 2004).

Не смотря на то, что подавляющее число видов микромицетов представлено в помещениях в виде конидий, находящихся в анабиозе, или другими покоящимися стадиями, необходим контроль, особенно в зданиях давней постройки, за местами их возможного накопления и проведение профилактических мероприятий.

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ РАЗВИТИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАТОГЕННЫХ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Марфенина О.Е.¹, Фомичева Г.М.¹, Кулько А.Б.²

¹ Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, факультет Почвоведения

² Московский городской научно-практический центр борьбы с
туберкулезом Комитета здравоохранения Москвы

Последние десятилетия большое внимание медиков и микологов привлекает проблема вторичных микозов, вызываемых потенциально патогенными (оппортунистическими) мицелиальными грибами. Списки видов оппортунистических грибов, способных вызывать микозы человека, постоянно расширяются. Известно, то возможность заболеваний, во многом определяется состоянием человека и, в первую очередь, связана с его иммунным статусом. Каковы должны быть природные свойства микроскопических мицелиальных грибов, которые могут

быть наиболее опасными для человека и условия заражения исследовано в существенно меньшей степени. Для решения этой проблемы важно знание оптимальных экологических условий развития потенциально патогенных грибов, особенностей их накопления в окружающей среде, путей поступления к человеку и т.д.

В настоящее время показано, что возможностью вызывать микозы обладает очень широкий круг микроскопических грибов – несколько сотен видов. Большинство видов микроскопических грибов, известных как потенциально патогенные, широко распространено в окружающей среде. Однако, только с некоторыми из них (около 10 видов мицелиальных оппортунистов) заболевания связаны наиболее часто. Чем могут определяться экологические причины подобного явления?

Важнейшими для развития микроскопических грибов экологическими факторами являются такие как: содержание органических веществ, влажность, температура, рН и т.д. среды их обитания. Мы попытались проанализировать, как различаются по отношению к этим факторам виды микроскопических грибов, известные как возбудители вторичных микозов и типичные сапротрофные обитатели окружающей среды. То есть ответить на вопрос – какими экологическими свойствами должны обладать мицелиальные грибы, которые способны колонизировать слизистые оболочки и вызывать инвазии у человека.

Обладея разнообразными органическими веществами (белками, полисахаридами липидами и т. д.) и большим содержанием воды, организм человека в принципе может являться хорошей средой обитания для микроскопических грибов. Поэтому с экологических позиций, в первую очередь, возможность развития потенциально патогенных грибов следует исследовать с учетом температурного фактора. Проведенный нами анализ показал, что именно по температурным требованиям наиболее четко выявляются группы микроскопических грибов, проявляющие свойства патогенных.

Важнейшими среди мицелиальных грибов, возбудителей вторичных микозов, являются грибы рода *Aspergillus*. Наиболее опасные потенциально патогенные виды этого рода, могут развиваться в широком интервале температур, но имеют выраженные термотолерантные свойства. Наиболее четко это проявляется по значениям температурного оптимума. Для таких видов как *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, относящихся к группе наиболее частых возбудителей глубоких микозов, верхняя граница температурного оптимума развития составляет более 37°C (около 40°C). Для *A. flavus* известна способность, в целом, расти именно в интервале повышенных температур (17-47°C). Т.е. прослеживается связь между возможностью развиваться при повышенных температурах и вызывать глубокие инвазивные микозы.

Различия по отношению к температуре прослеживаются как между видами грибов рода *Aspergillus*, так и между клиническими и сапротрофными штаммами отдельных видов. Так, для вида *A. versicolor* нами было

показано, что клинические штаммы на богатых органических субстратах (кровяном агаре) могут развиваться при высокой температуре — до 40°C, в то время как штаммы, выделенные из природных местообитаний, такой способностью не обладают (Марфенина и др., 2004).

Для многих грибов порядка *Mucorales* (*Absidia corymbifera*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor pusillus* и др.) — важных агентов возникновения оппортунистических микозов, также известна способность развиваться при температуре выше 37°C. В то время как такие виды как *M. hiemalis*, *M. racemosus*, известные как сапротрофные виды и широко распространенные в окружающей среде, например, в почвах умеренных широт, имеют оптимумы роста при 30-32°C.

Грибы рода *Penicillium* существенно реже выявляются как возбудители микозов. Но по потенциально патогенным свойствам и среди видов этого рода также выявляются определенные тенденции, связанные с отношением к температуре. Большинство известных, как возможные потенциально патогенные виды пенициллов, относятся к секции *Biverticillata*. При этом основная часть видов этой секции способна развиваться при 37°C.

Известно, что среди представителей родов *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* наиболее способны вызывать инвазивные поражения человека виды *Paecilomyces variotii*, *Scopulariopsis brevicaulis*. Именно эти два вида имеют наиболее высокие температурные оптимумы роста среди видов этих родов.

Отметим, что до сих пор нет сведений о наличии потенциально патогенных свойств у ряда микроскопических грибов, широко распространенных в окружающей среде в умеренных широтах. Это, например, представители таких родов как *Arthrotrichum*, *Doratomyces*, *Gliocladium*, *Zygorrhynchus* и др. Эти грибы известны, как способные развиваться при более низких температурах, с температурным оптимумом около 25°C.

Значение других экологических свойств при оценке развития потенциально патогенных грибов исследовано в значительно меньшей степени. При анализе влияния кислотности среды, для многих оппортунистических мицелиальных грибов прослеживается способность развиваться, в первую очередь, в нейтральных условиях pH.

Таким образом, исходя из анализа экологических условий развития, как наиболее опасные потенциально патогенные мицелиальные грибы выявляются виды, имеющие оптимумы роста при повышенных температурах (37-40°C).

Проведенный нами анализ распространения видов потенциально патогенных грибов в разных климатических зонах России показал, что наибольший уровень присутствия таких видов в окружающей среде, как правило, выявляется именно в южных регионах, а наиболее «чистыми» являются северные и горные районы.

Реально предположить, что важными для распространения вторичных микозов могут быть современные тенденции изменения климата,

а именно, его возможное потепление, способное приводит к отбору видов, имеющих более высокие температурные оптимумы роста. Следует отметить, что некоторые подобные тенденции мы начинаем наблюдать уже сейчас при антропогенном изменении среды обитания человека. Так в городской среде, где, как известно, температуры на несколько градусов повышены, по сравнению с окружающими город территориями, наблюдается увеличение присутствия видов потенциально патогенных мицелиальных грибов. Это наиболее отчетливо проявляется в городах северных и умеренных широт, в которых отмечено увеличение встречаемости *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus* и др., а для грибов рода *Penicillium* — видов секции *Biverticillata*, обычно более широко распространенных в южных экосистемах.

Для формирования опасных микологических свойств городской среды большое значение имеет и возможность развития микроскопических грибов в помещениях при стабильных и повышенных температурах.

МИКРОМИЦЕТЫ — КОНТАМИНАНТЫ СТЕКЛОТЕКСТОЛИТОВ

Мотейюнайте О., Лугаускас А.

Вильнюсский педагогический университет

Институт Ботаники

Вильнюс, Литва

В настоящее время актуальной санитарной, эколого-технической проблемой является распространение микромицетов в окружающей антропогенной среде. Заметное увеличение числа микромицетов в помещениях и тем самым повышение уровня грибковых аллергенов — составная часть проблемы, рассматриваемой как «синдром больного здания» (Sick Building Syndrom). Для здравоохранения важным аспектом является изучение состава микобиоты помещений и выявление субстратов их развития. Зачатки микромицетов, попавшие на поверхность материалов, начинают развиваться и функционировать, выделяя метаболиты, вызывая повреждения субстрата. При строительстве и в процессе эксплуатации зданий используются разные полимерные материалы, которые могут быть субстратом для развития грибов. Известно, что легко доступными субстратами для развития микроорганизмов являются натуральные материалы, такие как бумага или кожа. Синтетические полимерные материалы более грибоустойчивы, однако микромицеты способны к ним адаптироваться и даже их разрушать. Процесс микодеструкции, происходящий в окружающей среде человека, неблагоприятно влияет на его здоровье.

Цель наших исследований – определение видового состава микромицетов на стеклотекстолитах и выявление активных штаммов.

В исследованиях использовали 3 стеклотекстолиты и углепластик разного химического состава. Стеклотекстолиты представляют собой слоистый материал, полученный методом горячего прессования стеклотканей, пропитанных терморезистивным связующим на основе совмещенных эпоксидной и фенолформальдегидной смол. Стеклотекстолиты ПСКх и ССТФК: прошивное полотно на основе кремнеземной ткани (63–65%), бакелитовая смола (35%). Стеклотекстолит ЖСП: кремнеземная стеклоткань (60%), бакелитовая смола (40%). Углепластик УССП: ткань УП (2–52%), стеклонить (11–8%), бакелитовая смола (40%). Для стеклотекстолитов характерно высокая механическая прочность. Они могут быть использованы при высокой влажности воздуха (93±2)% и при температуре 40±2. Такие условия пригодны для развития микроорганизмов. Стеклоткань используется при строительстве, изоляции стен и труб, в сельском хозяйстве (защита саженцев, утепление построек). Стеклотекстолиты предназначены для изготовления разных деталей электротехнического назначения, применяются в радиоэлектронике в качестве изоляции.

Материалы экспонировали в условиях Прибалтики (г. Неринга) в трех вариантах: на открытой площадке (П), под навесом (Н) и в складском помещении (С). Грибы с материалов выделяли прямым отсевом и смывом. Частоту встречаемости видов определяли по формуле: $A = B/C \times 100\%$, где В – число исследований, когда данный вид обнаружен, С – общее число исследований. Для сравнения степени сходства и различия комплексов микромицетов разных материалов в количественном выражении использовали коэффициент Сьеренсена-Чекановского: $S = 2C / A + B \times 100\%$, где С – сумма видов, общих для двух материалов, А и В – сумма всех видов первого (А) и второго (В) материала.

При обследовании на материалах идентифицировано от 172 до 180 видов микромицетов. Меньше всего видов выделено с материалов, экспонируемых на открытой площадке (от 53 до 59) и значительно больше под навесом – от 88 до 100 видов. Образцы под навесом были защищены от прямого воздействия осадков, ветра и солнца. Наиболее численным родом на стеклотекстолитах оказался *Penicillium*. Наиболее характерными для данной группы материалов были виды: *P. decumbens*, *P. cyclopium* и *P. funiculosum* (таблица 1). В условиях склада доминировали виды аспергиллов, которые составляли до 27% от общего числа видов. Типичными видами оказались *A. glaucus*, *A. versicolor* и *A. ustus*. На материалах, экспонированных на открытой площадке, преобладали представители семейства *Dematiaceae*.

Это семейство наиболее широко было представлено родами *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Stemphyllium*, *Ulocladium*. Явно доминирующих видов в этих условиях мало. На стеклотекстолите ПСКх доминировал *Botrytis cinerea* (навес) и *Penicillium decumbens* (склад), на стекло-

текстолите ССТФК – *Trichoderma viride* (открытая площадка), *Aspergillus glaucus*, *Penicillium corylophilum* и *P. funiculosum* (склад), на стеклотекстолите ЖСП – *Aspergillus glaucus* (склад), и на углепластике УССП – *Alternaria alternata* (открытая площадка) и *Aspergillus versicolor* (склад). Число случайных видов, обнаруженных во всех вариантах, различается незначительно: на открытой площадке они составляют 88,6±1,4, под навесом – 83,0±3,7, и на складе – 80,2±2,3 %. Таким образом существующие различия в химическом составе не сильно влияли на видовой состав микромицетов, населяющих материалы, содержащие бакелитовую смолу. Наибольший процент составляли случайные, попавшие из природы виды.

Для сравнения степени сходства и различия комплексов микромицетов на стеклотекстолитах использовали коэффициент Сьеренсена-Чекановского. Коэффициент рассчитывали относительно натуральной кожи «Шевро», в основе которой лежат органические белковые соединения и которая является легко доступным питательным и энергетическим субстратом для развития многих видов грибов. Оказалось, что приуроченность грибов к стеклотекстолитам значительно выше на открытой площадке и под навесом, чем в условиях склада (таблица 2). Самый низкий коэффициент общности, свидетельствующий об опреде-

Таблица 1. Частота встречаемости (%) микромицетов на стеклотекстолитах, экспонируемых в разных естественных условиях:
П – открытая площадка, Н – навес, С – склад.

Виды	Условия	Стеклотекстолиты			Углепластик УССП
		ПСКх	ССТФК	ЖСП	
<i>Alternaria alternata</i>	П	18,2	18,2	18,2	18,2
	Н	54,6	36,4	54,6	63,6
	С	0	0	9,1	0
<i>Aspergillus glaucus</i>	П	0	0	0	0
	Н	9,1	0	9,1	0
	С	45,5	63,6	63,6	45,5
<i>Aspergillus ustus</i>	П	0	0	0	0
	Н	0	0	0	0
	С	54,6	18,2	54,6	45,5
<i>Aspergillus versicolor</i>	П	0	0	0	0
	Н	0	0	0	0
	С	54,6	54,6	36,4	81,8

<i>Aureobasidium pullulans</i>	П	36,4	27,3	0	54,6
	Н	18,2	45,5	9,1	54,6
	С	9,1	0	18,2	9,1
<i>Botrytis cinerea</i>	П	18,2	9,1	9,1	9,1
	Н	63,6	36,4	45,5	54,6
	С	0	0	0	0
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	П	9,1	9,1	18,2	9,1
	Н	45,5	54,6	36,4	27,3
	С	9,1	9,1	18,2	0
<i>Cladosporium herbarum</i>	П	9,1	9,1	18,2	0
	Н	54,6	45,5	45,5	9,1
	С	9,1	0	18,2	18,2
<i>Cladosporium resinae</i>	П	0	0	9,1	0
	Н	18,2	36,4	18,2	18,2
	С	0	0	9,1	0
<i>Fusarium moniliforme</i>	П	0	18,2	18,2	27,3
	Н	27,3	9,1	18,2	18,2
	С	0	0	0	0
<i>Penicillium corylophilum</i>	П	9,1	0	0	0
	Н	0	18,2	18,2	0
	С	54,6	63,6	9,1	18,2
<i>Penicillium cyclopium</i>	П	0	9,1	9,1	9,1
	Н	27,3	27,3	45,5	9,1
	С	36,4	45,5	36,4	18,2
<i>Penicillium decumbens</i>	П	0	0	0	9,1
	Н	9,1	36,4	18,2	9,1
	С	63,6	45,5	27,3	5,54
<i>Penicillium funiculosum</i>	П	0	9,1	0	9,1
	Н	36,4	45,5	18,2	9,1
	С	54,6	63,6	27,3	45,5
<i>Trichoderma viride</i>	П	45,5	72,7	27,3	27,3
	Н	45,5	27,3	36,4	54,6
	С	9,1	9,1	19,2	0

ленном видовом составе, установлен для стеклотекстолита ПСКх (открытая площадка). Сравнение видового состава микромицетов, выделенных с стеклотекстолитов и натуральной кожи, показало, что между ними существуют достоверные различия.

Видовой состав микромицетов на исследованных материалах был достаточно многочислен. Однако только отдельные виды или штаммы грибов активно функционируют на стеклотекстолитах и их разрушают. Для выявления среди выделенных грибов активных биодеструкторов использовали селективную среду без источника органического углерода (Жданова, Паутените и др., 1987). В данной среде с исследуемых материалов выделяли лишь 2-3 вида микромицетов. На стеклотекстолитах, экспонированных на открытой площадке, обнаружены активные штаммы видов *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Trichoderma viride*; в условиях склада – *Penicillium decumbens* и *Penicillium funiculosum*; под навесом – *Ulocladium chartarum*. Таким образом из большого числа микромицетов были выделены самые активные штаммы. По данным многих авторов, а также нашим исследованиям, эти грибы часто встречаются в помещениях и известны как возбудители болезней.

Как показали наши исследования, из окружающей среды на материалы и изделия попадают много разных зачатков микромицетов. Однако не всегда те виды, для которых характерна высокая частота встречаемости, являются и активными биодеструкторами. Микромицеты, активные биодеструкторы материалов, могут быть и потенциальными возбудителями болезней.

Таблица 2. Значение коэффициента Сьеренсена-Чекановского для видового состава микромицетов на стеклотекстолитах по сравнению с натуральной кожей

Материалы	Условия экспозиции			По всем 3 вариантам
	открытая площадка	навес	склад	
Стеклотекстолит ПСКх	7,8	20,9	36,8	41,1
Стеклотекстолит ССТФК	10,8	20,3	30,5	37,0
Стеклотекстолит ЖСП	12,5	30,4	31,8	40,9
Углепластик УССП	16,0	15,4	34,4	37,7

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ НОСИТЕЛЕЙ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* В НЕКОТОРЫХ БОЛЬНИЦАХ

Назисян Е.Р., Амбардзумян А.Дз.,
Арутюнян К.Э., Тер Степанян М.М.

Кафедра эпидемиологии Ереванского государственного
университета имени М. Гераци
Ереван, Армения

Грибы рода *Candida* играют важную роль в развитии инфекционных осложнений у пациентов с нарушениями иммунной системы, в частности при лейкозах при этом источником инфекции может являться как сам больной, так и медицинский персонал. Следует отметить, что существует более высокая распространенность орофарингеального носительства грибов рода *Candida* среди больных лейкемией, чем среди больных другими заболеваниями. Однако, проблема носительства в полости носа грибов рода *Candida* при лейкемии недостаточно изучена и требует дополнительных исследований.

Учитывая вышеуказанное, нами был обследован на носительство грибов рода *Candida* в полости носа медицинский персонал и больные двух больниц (Центр гематологии имени проф. Еоляна и отделение общей хирургии больницы № 1) Еревана. Мазки брали стерильными ватными тампонами и делали посевы на желточно-солевой агар, среду Сабуро и кровяной агар. После этого чашки с посевом переносили в термостат при 37°C на 18-20 часов и на следующий день делали мазки для микроскопирования. Для идентификации выделенных стафилококков ставили тесты на плазмокоагулазу и лецитовителлазную активность.

В результате проведенных нами исследований было выявлено, что 40,2% медицинского персонала являются носителями грибов рода *Candida*, при этом 31,3% из них, в ассоциации с *S. aureus*, 43,7% с коагулазонегативными стафилококками, а 25,0% в монокультуре. Распространенность носительства грибов рода *Candida* среди медицинского персонала центра гематологии составляет 25,9%, а среди медицинского персонала отделения общей хирургии 61,5%. Таким образом носительство грибов рода *Candida* среди медицинского персонала отделения общей хирургии превышает тот же показатель среди медицинского персонала центра гематологии в 2,38 раза ($P < 0,02$). Подобная корреляция наблюдается также при рассмотрении ассоциаций грибов рода *Candida* с коагулазонегативными стафилококками, 71,1% в отделении общей хирургии и 10,2% в центре гематологии, то есть носительство в отделении общей хирургии превышает тот же показатель в центре гематологии в 7 раз ($P < 0,01$). При исследовании больных лейкозами было выявлено, что 75,2% являются носителями грибов рода *Candida*, при этом 11,3% из них, в монокультуре, а 88,7% в ассоциации с коагу-

лазонегативными стафилококками. 63,6% пациентов отделения общей хирургии были носителями грибов рода *Candida*, при этом 28,6% из них, в монокультуре а 71,4% в ассоциации с коагулазонегативными стафилококками. Не было выявлено ассоциаций грибов рода *Candida* с *S. aureus*. Следовательно, носительство грибов рода *Candida* в полости носа среди больных лейкозами незначительно превышает тот же показатель среди пациентов отделения общей хирургии.

Таким образом выявлена связь между частотой носительства грибов рода *Candida* среди медицинского персонала и типом стационаров. Обнаружено также, что уровень носительства в полости носа грибов рода *Candida* среди больных лейкозами превышает тот же показатель среди пациентов отделения общей хирургии, что соответствует данным по орофарингеальному носительству.

САНИТАРНО-МИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПЫЛЬЦЕВОЙ ОБНОЖКИ С ПАСЕК ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Осинцева Л.А., Чекрыга Г.П., Соловьева О.В.

Сибирский научно-исследовательский и проектно-технологический институт переработки сельскохозяйственной продукции
(ГНУ СибНИПТИП)

п. Краснообск, Новосибирская область

Пыльцевая (или пчелиная) обножка медоносных пчел отнесена к категории биологически активных добавок, поэтому показатели ее безопасности, в том числе и микробиологической, регламентированы нормативным документом СанПиН 2.3.2.1078-01. Ряд исследователей считают, что отечественные санитарные нормы не учитывают присущую этому продукту пчеловодства высокую обсемененность сапрофитными плесневыми грибами. В образцах обножки из районов Прибалтики, Китая, Украины, Урала, Казахстана, Испании, собранных в 2001, 2002 гг. авторы установили, что численность МАФАНМ и дрожжей превышает норму в 56 и 51% случаев (Хисматуллин Р.Г. с соавт., 2003 г.; Хисматуллин Р.Г. с соавт., 2004г.). Предлагается пересмотреть нормы микробной безопасности в отношении пыльцевой обножки. В связи с этим актуальным представляется изучение естественного уровня развития микрофлоры этой биологически активной добавки.

Целью работы явилась количественная оценка естественной обсемененности аэробными микроорганизмами, в том числе плесневыми грибами, пыльцевой обножки, собранной на пасеках Западной Сибири.

Образцы обножки были собраны в 2002, 2003 и 2004 гг. на пасеках различных районов Новосибирской области и Алтайского края. Численность мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов определяли по ГОСТ глубинным посевом последовательных разведений суспензии обножки на МПА (ООО БиоКомпас-С, г. Углич), количество плесневых грибов и дрожжей – посевом в среду Сабуро с левомицетином (НПО «Питательные среды», г. Махачкала). Определение микофлоры проводили по определителям: Д. Саттон и др. (2001), В.И.Билай, Э.З Коваль (1988), Л.Н. Кашкин и др. (1979). Полифлерность образцов обножки устанавливали по количеству цветковых оттенков обножек в составе образца. Первичные данные обрабатывали с помощью пакета прикладных программ «Snedecor» (Сорктн О.Д., 2004).

Установлено соответствие всех исследованных образцов пыльцевой обножки нормативным требованиям по общей микробной обсемененности (таблица). Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов изменялось от $(0,5+0,28) \times 10^2$ до $(8,1+2,82) \times 10^2$ КОЕ/г в зависимости от района сбора образца. Достоверное влияние ($F=15,4$) района сбора обножки на показатель КМАФАнМ наблюдалось в 2003 г, когда микробная обсемененность на 88% определялась местом сбора. Слабая корреляция с полифлерностью образцов ($r = 0,3$) не позволяет судить о роли ботанического происхождения пыльцы в формировании как бактериальной ($r=0,24$), так и грибной ($r=0,05$) эпифитной микофлоры обножки. Прослеживалась тенденция к снижению количества микромицетов (среда Сабуро) с возрастанием видового разнообразия обножек в образце ($r= -0,29$).

Из всех исследованных образцов только 16,7% соответствовали установленным требованиям по обсемененности плесневыми грибами (среда Сабуро): сбор 2002 г. из Колыванского и Мошковского районов Новосибирской области. Остальные образцы характеризовались превышением норматива (не более 100 КОЕ/г) в 1,4 – 3,3 раза.

Штаммы грибов, выделяемые на МПА, обнаруживались в составе эпифитной микофлоры обножки в количествах, сопоставимых с уровнем бактериальной обсемененности образцов, в 58% случаев. Вероятно, наличие плесневых грибов, продуцирующих антибиотики, оказывают влияние на рост и развитие на питательных средах бактериальной и дрожжевой микофлоры.

При изучении микофлоры образцов из 3-х районов Новосибирской области и 2-х – Алтайского края установлено, что доминировали виды родов *Mucor* и *Penicillium* – 40 и 20% соответственно. Частота встречаемости составила 100% для видов, принадлежащих родам *Mucor* и *Penicillium*, 60% – роду *Sporotrichium* и по 20% для видов, относящихся к родам *Aureobasidium* и *Stemphilium*. Среди плесеней встречались штаммы токсиногенных видов.

Таблица. Количество микроорганизмов, выделенных на различных средах из образцов пчелиной обножки (x 10² КОЕ/г)

№	Район и год сбора	МПА			Сабуро	Полифлерность
		ОЧМ*	Грибы и дрожжи	Бактерии	Грибы	
1	НСО, Баганский, 2002	1,90+0,56	1,00+0,28	0,90+0,28	1,45+0,21	10
2	НСО, Венгеровский, 2002	2,15+0,07	1,00+0,42	1,15+0,49	1,85+0,07	8
3	НСО, Тогучинский, 2002	2,35+0,07	0,85+0,07	1,50+0,14	2,0+0,84	11
4	НСО, Коченевский, 2002	2,45+0,63	0,85+0,91	1,60+1,55	1,40+0,84	-
5	НСО, Колываский, 2003	1,35+0,35	0,40+0,14	0,95+0,21	0,2+0,0	7
6	НСО, Мошковский, 2003	2,35+0,91	0,15+0,07	2,20+0,84	0,4+0,0	7
7	НСО, Черепановский, 2003	1,35+0,07	0,60+0,00	0,75+0,07	1,8+0,84	7
8	НСО, Красноозерский, 2003	7,90+0,07	4,60+1,13	3,30+0,42	3,05+0,91	6
9	Алтайский край, Баевский, 2003	1,10+0,56	0,55+0,49	0,55+0,07	2,25+2,47	6
10	Алтайск. край, Залесовский, 2003	8,10+2,82	4,05+0,49	4,05+2,33	2,35+2,89	8
11	НСО, г. Новосибирск, 2003	0,50+0,28	0,40+0,28	0,10+0,0	2,15+0,77	4
12	НСО, г. Новосибирск, 2004	0,80+0,00	0,45+0,21	0,35+0,21	3,35+1,48	5
Коэфф. корреляции (полифлерность)		0,31	0,052	0,24	-0,29	
F (F _г = 9,1) (F _г = 3,9)	в 2002 г.	0,6	0,05	0,3	3,8	
	в 2003 г.	15,4	20,8	4,9	0,9	
Доля влияния района сбора	в 2002 г.	0,00	0,00	0,00	0,11	
	в 2003 г.	0,88	0,91	0,67	0,00	
НСР %	в 2002 г.	1,19	1,46	2,31	1,35	
	в 2003 г.	2,80	1,40	2,26	3,65	
F (F _г = 18,5)	по годам	2,2	0,04	2,8	1,0	
Доля влияния года сбора		0,38	0,00	0,47	0,12	
НСР %		0,86	1,07	0,64	5,10	

ОЧМ – общее число микроорганизмов.

Таким образом, уровень и характер контаминирования пыльцевой обножки микроорганизмами определялись экологическими условиями ее сбора. Большинство исследованных образцов, полученных на пасеках Западной Сибири, не соответствуют требованиям СанПиН. В связи с этим, нам представляется целесообразным изменение технологии

получения и обработки пыльцевой обножки в зависимости от места её сбора, а так же установление нормативных требований к содержанию микотоксинов в биологически активной добавке на основе этого продукта пчеловодства.

МИКОТИЧЕСКАЯ ЗАГРЯЗНЕННОСТЬ ВОЗДУХА БОЛЬНИЧНЫХ ПАЛАТ ЦЕНТРА ПЕРИНАТОЛОГИИ, ГИНЕКОЛОГИИ И АКУШЕРСТВА АРМЕНИИ

Осипян Л.Л.¹, Абрамян Р.А.², Саркисян Э.Ю.¹, Гюлхасян В.М.²

¹ Ереванский государственный университет

² Центр перинатологии, акушерства и гинекологии Армении
Ереван, Армения

Микроскопические грибы широко распространены в естественной среде человека и при определённых условиях могут играть значительную роль в патологии человека. Известно, что некоторые условно-патогенные микромицеты, проникая с воздухом в помещение, способны стимулировать микогенную сенсибилизацию у человека.

Установлен факт зависимости уровня микотической заболеваемости от концентрации грибов во внешней среде, прежде всего, в воздухе, а также на предметах, окружающих больного (Weinberg, 1984). Высокий уровень грибной контаминации воздуха и предметов внешней среды может привести к возникновению отдельных заболеваний и даже вспышек внутрибольничных микозов, микотоксикозов, аллергической сенсибилизации у больных с ослабленной иммунной системой. Например, концентрация конидий аспергиллов внутри больниц может увеличиваться не только в результате проникновения потоков загрязненного воздуха извне, через системы вентиляции, кондиционирования воздуха и т.д., но и вследствие размножения грибов внутри помещений, например, в условиях повышенной влажности (Arnou, 1991). Поскольку споры мицелиальных грибов практически всегда присутствуют в больничном воздухе, то основным путем заражения больных является аэрогенный.

Настоящее время внутрибольничные грибные инфекции представляют собой актуальную и сложную проблему для современной медицины. Грибы, как возбудители внутрибольничных инфекций, выходят на первое место по частоте и летальности вызываемых ими заболеваний (Bodey, 1998).

Придавая значения выше сказанному, нами было проведено исследование микобиоты воздуха помещений в Центре перинатологии, гинекологии и акушерства (ПГА центр) г. Еревана.

Были взяты пробы воздуха в родблоке, операционных, перевязочных. Пользовались седиментационным методом, осаждая пропагулы микромицетов из воздуха в чашки Петри с агаризованной средой Чапека-Докса. Открытые чашки расставлялись в помещении с экспозицией 15 минут на высоте 1-1.5м. Затем культуры инкубировали в термостате при $27^{\circ}\text{C}\pm 2$ до появления видимого роста грибов (3-5 сут.). После их подсчета, инкубирование продолжали до появления спороншения для идентификации выросших грибов. Число спор (ЧС) в 1м^3 воздуха высчитывалось по формуле Омелянского:

$$\text{ЧС} = 5 \times 10^4 \times \text{C} / \pi r^2 \times t,$$

где C – число колоний микромицетов в чашке;

r – диаметр чашки;

t – время экспозиции (15 минут).

Проведенное исследование показало, что во всех помещениях доминировали роды *Penicillium* и *Aspergillus*. Роды грибов по числу выделенных видов можно расположить в следующем порядке: *Penicillium* (9), *Aspergillus* (4), *Cladosporium* (3), *Alternaria* (2), *Stemphylium* (1).

Контаминированность пропагулами микромицетов большинства помещений в среднем составляла $<10^3$. Лишь в отдельных случаях (род-блок) она была выше, поскольку в помещении проводились ремонтные работы. Среди выделенных грибов многие известны как возбудители разных аллергических и других микотической заболеваний. Например, *Aspergillus fumigatus* Fres. наиболее частый возбудитель аспергиллеза у человека, поражающий внутренние органы и нервную систему, *A. niger* v. *Tiegh.* часто выявляется как вторичный инфицирующий агент. Оба вида являются продуцентами микотоксинов. Также неблагоприятны для здоровья выделенные штаммы видов *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Cladosporium herbarium* (Pers.) Link, *C. cladosporioides* (Fres.) De Vries и др., которые вызывают кожные и смешанные диссеминированные инфекции.

Следует отметить, что до настоящего времени остается открытым вопрос стандартизации отбора проб и допустимых норм концентрации пропагул видов плесневых грибов в помещениях. Известно, что для представителей рода *Alternaria* пороговый уровень концентрации спор в воздухе составляет примерно 100 пропагул/м³ (Gravesen, 1979). Более высокая экспозиция аллергена в среде, окружающей больных с предрасположенностью к атопии является фактором риска, так как может способствовать сенсибилизации и провоцировать развитие микогенной аллергии.

Очевидно, что для оценки заспоренности воздуха следует ориентироваться не столько на общее количество выделенных КОЕ, сколько на таксономическую принадлежность их в аспекте потенциально опасных видов для здоровья человека.

Глава 4.

МИКОГЕННАЯ АЛЛЕРГИЯ И ИММУНОПАТОЛОГИЯ, СВЯЗАННАЯ С ГРИБАМИ

КЛИНИЧЕСКАЯ И АЛЛЕРГО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОГЕННОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ ПЕЦИЛОМИКОЗНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Ахунова А.М.
Поликлиника № 204 ЮАО
Москва

Пециломикоз, впервые описанный у человека Uys и соавт. в 1963 г., до настоящего времени остается малоизученным видом системного микоза. Повсеместное распространение грибов рода *Paecilomyces* в почве различных географических зон предполагает массовую инфицированность ими населения земного шара. Однако отсутствие настороженности врачей по отношению к данной патологии, как и использование рутинных методов выделения грибов из патологического материала от больных затрудняют освещение данного вопроса. Нами, как и другими авторами (Z. Varath, V. Betina, 1972; З.А. Гиясов и соавт., 1982) обнаружен диморфизм грибов рода *Paecilomyces*. Изучение в эксперименте поведения мелилиальных частиц гриба рода *Paecilomyces* вида *Paecilomyces variotii* Banier (1907) в культуральной среде с клетками К-562 показало быстрый темп их превращения в зрелые тканевые формы в виде сферул в интервале 6 часов. Одновременно была выявлена способность мелких незрелых форм-эндоспор к внутриклеточному циклу паразитирования (А.М. Ахунова, 1992).

В динамике проведено клинико-лабораторное, аллерго-иммунологическое и микробиологическое обследование 190 больных бронхиальной астмой в возрасте от 1 года до 70 лет. Среди них мужчин-99, женщин-91. Давность заболевания колебалась от 2-х недель до 24 лет. 108 больных проживали в городе, 82-в сельской местности.

Культуральное выделение грибов рода *Paecilomyces* и прямой количественный подсчет зрелых сферул гриба в 1 мкл крови с целью разграничения пецилоносительства от клинически выраженного пециломикоза производили с использованием собственных методик (1991, 2000). Многообразие клинических форм пециломикоза обусловлено особенностями реактивности организма и специфичностью пораженных органов или тканей. Клинически выраженный пециломикоз с преимущественным поражением бронхолегочной системы формирует обструктивный синдром с клинической и морфологической картиной бронхиальной астмы инфекционно-аллергической формы, которую мы в силу наличия внутренней инфекции грибом рода *Paecilomyces* обозначили эндогенной атопической, у лиц с преобладанием IgE-механизма иммунитета и эндогенной неатопической без такового.

ДРОЖЖЕВЫЕ ГРИБЫ, КАК ИСТОЧНИК ВОЗМОЖНЫХ АЛЛЕРГЕНОВ В ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ

Глушакова А.М.
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения

Домашняя пыль – своеобразный антропогенный субстрат, в состав которого входят как неорганические, так и органические компоненты: частицы почвы, текстильные волокна и остатки пищи, слущенный эпидермис человека и домашних животных, перья, капок, пыльца, и т.п. С домашней пылью тесно связаны различные микроорганизмы, включая бактерии, споры и мицелий грибов, сине-зеленые водоросли, а также виды микроартропод. Особый интерес к изучению микобиоты жилых помещений связан с большим значением микогенных аллергенов в развитии аллергических заболеваний. В настоящее время в основном проводят изучение мицелиальных грибов, тогда как дрожжи, населяющие городские квартиры, практически не изучены. В микологических исследованиях они обычно рассматриваются лишь на родовом уровне или просто отмечается присутствие одноклеточных форм. В то же время известно, что частота сенсибилизации к аллергенам разных дрожжей среди больных с атопическим дерматитом достаточно высока и достигает 84% к *Malassezia furfur* и 47% – к *Rhodotorula mucilaginosa* (=Rh. rubra).

В связи с этим в нашу задачу входило изучение численности и видового состава дрожжевого населения домашней пыли на примере ряда квартир в г. Москве и Московской области. В природе дрожжевые грибы особенно многочисленны и разнообразны на живых и отмирающих надземных частях растений. Поэтому одновременно мы исследовали также состав дрожжей на комнатных растениях, как возможного источника дрожжей в домашней пыли.

Дрожжи учитывали стандартным методом посева, используя в качестве питательной среды сусло-агар, подкисленный молочной кислотой (4 мл/л) для подавления роста бактерий. Подсчет выросших колоний проводили после 7 суточной инкубации при комнатной температуре. Чистые культуры идентифицировали до вида по морфологическим и физиологическим признакам, которые определяли стандартными методами.

По полученным данным для каждого образца рассчитывали общую численность дрожжей в образующих колонии единицах на грамм (КОЕ/г) и относительное обилие каждого вида дрожжей.

Дрожжи были обнаружены в 60% проанализированных образцов пыли. Численность колебалась в пределах 10^3 - 10^6 КОЕ/г, в среднем составляя около 10^4 КОЕ/г. Всего было обнаружено 16 видов дрож-

жевых грибов родов *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon*.

Виды *Cryptococcus diffluens* и *Rhodotorula mucilaginosa* встречались особенно часто и были выделены почти из всех образцов, содержащих дрожжи. Экспериментально показано, что вид *C. diffluens* способен переносить длительное обезвоживание в неактивном состоянии, что особенно важно, так как низкий уровень влажности – один из главных лимитирующих факторов существования дрожжей в домашней пыли, который приводит к изменению соотношения доминирующих видов дрожжей, выводя на первое место устойчивый к высушиванию *C. diffluens*. Другой доминирующий в домашней пыли вид дрожжевых грибов *R. mucilaginosa* – постоянно обнаруживается в различных природных растительных субстратах, однако в значительно меньшем обилии. Встречаемость *R. mucilaginosa* на листьях растений и в растительных остатках в средней полосе составляет около 5%, в дерново-подзолистых почвах только 2–3%. Среди субдоминантов, выделяющихся из домашней пыли, следует отметить типично фитобионтный вид *Sporobolomyces roseus*, обнаруженный примерно в трети проанализированных образцов. Характерной особенностью домашней пыли можно считать присутствие в ней видов дрожжей из группы условных патогенов: *Candida catenulata*, *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*.

Численность дрожжей на листьях и цветках как комнатных, так и дикорастущих растений колебалась в пределах 103–105 КОЕ/г, однако средние значения численности для комнатных растений были существенно ниже. Дрожжи были обнаружены лишь в 30% проанализированных образцов комнатных растений. В почвогрунте из цветочных горшков средняя численность дрожжей была примерно такой же, как в верхних горизонтах дерново-подзолистых почв. Таксономический состав эпифитных дрожжевых сообществ на комнатных растениях и в почве цветочных горшков существенно отличался от того, что наблюдается в природе. Значительную часть дрожжевого населения комнатных растений и почвогрунта составляли виды, малочисленные в природных субстратах. Доминировали на листьях комнатных растений краснопигментированные дрожжи *Rhodotorula mucilaginosa*, которые были многочисленны также и в домашней пыли. В то же время, на листьях дикорастущих растений, эти дрожжи, хотя и характеризуются высокой встречаемостью, но в индивидуальных группировках их доля редко превышает 5%. Заметно выше также на комнатных растениях было обилие эврибионтных аскоспоровых дрожжей *Debaryomyces hansenii*.

На комнатных растениях, также как и на дикорастущих, формируются эпифитные дрожжевые сообщества, но значительно более малочисленные и заметно обедненные по видовому составу.

Таким образом, в жилых помещениях формируются антропозависимые дрожжевые сообщества, отличающиеся от сообществ естественных природных систем. Особенности дрожжевого населения домашней

пыли – доминирование устойчивых к высушиванию эпифитных видов и наличие условно-патогенных видов. В непосредственном окружении человека складывается комплекс дрожжей, который следует учитывать при поиске микогенных аллергенов.

ИЗУЧЕНИЕ РАСТВОРИМЫХ ФОРМ МЕМБРАННЫХ АНТИГЕНОВ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ВТОРОГО ТИПА, ОСЛОЖНЕННЫХ ВИРУСНОЙ И ГРИБКОВОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

И.В. Евсегнеева

Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова

Важную роль в регуляции иммунного ответа играют растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы, образующиеся за счет шеддинга или альтернативного сплайсинга матричной РНК. Получены данные о том, что они могут выполнять функции ограничителей иммунных реакций или же выступать в роли активаторов иммунологических процессов. Кроме того, сывороточный уровень отдельных антигенов является мониторинговым показателем течения патологического процесса при ряде заболеваний, в том числе и при ВИЧ-инфекции и оппортунистических микозах. Информация о наличии и функциональной роли растворимых форм получена лишь для немногих из более 240 идентифицированных в настоящее время дифференцировочных антигенов. Таким образом, исследование количественного содержания растворимых форм (s-форм) мембранных белков клеток иммунной системы имеет как практическое, так и теоретическое значение.

Значительный рост больных сахарным диабетом 2 типа сочетается с повышенной частотой у этих больных заболеваний вирусной (вирусные гепатиты В и С) и грибковой (кератоконъюнктивиты) природы. Патогенетическое значение столь частой ассоциации до настоящего времени не изучено. Нами изучен уровень растворимых форм (s – форм) мембранных белков клеток иммунной системы у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с вирусным гепатитом В и кератоконъюнктивитом.

Полученные данные свидетельствуют об особой роли мембранная форма ICAM-3 (CD50) антигена экспрессируется на поверхности лей-

коцитов и играет важную роль в инициации иммунного ответа. CD50 антиген характеризуется конститутивной экспрессией и отсутствием чувствительности к медиаторам воспаления. Сывороточный уровень растворимого CD50 антигена оставался неизменным как у больных с неосложненным течением сахарного диабета, так и у больных гепатитом В, однако при их сочетании или наличии кератоконъюнктивита его содержание достоверно повышалось также регистрировался повышенный уровень этого антигена в стадии декомпенсации сахарного диабета и при наличии

Полученные результаты позволяют предположить, что при осложнении сахарного диабета изменение концентрации sCD50 антигена отражает интенсивность воспалительных процессов в организме и может использоваться при мониторинге лечения.

ИММУНИТЕТ К ГРИБКОВЫМ ИНФЕКЦИЯМ: СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ И ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОКОРРЕКЦИИ

Караулов А.В.

Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова

За последние годы увеличение числа грибковых инфекций напрямую связано с ростом различных форм нарушений иммунитета. Именно природа и степень нарушений в системе защиты определяет клиническую картину и тяжесть грибковой инфекции. В механизме противогрибкового иммунитета участвуют различные компоненты. На стадии распознавания – дендритные клетки, передающие информацию Т – хелперам. Протективный адаптивный ответ обеспечивается Тх-1 – типа, которые обеспечивают адекватную активацию фагоцитов в месте инфекции. Баланс между протективным иммунным ответом и иммунопатологией определяется продукцией цитокинов (интерлейкин-12, интерферон – гамма) и включает индукцию регуляторных Т-клеток и секрецию интерлейкина-10. Иммуноterapia при грибковых инфекциях включает применение иммуномодуляторов, обеспечивающих модуляцию функции фагоцитов (фталгидразиды), стимуляцию Тх-1 ответа (мурамилпептиды) и увеличение секреции противовоспалительных медиаторов (синтетические аналоги пептидов тимуса). Открытие Toll- подобных рецепторов, возможности использования дендритных вакцин и протективных антител открывает новые возможности для специфической иммунотерапии.

ПОДДЕРЖАНИЕ ЭКОЛОГИИ И ЭФФЕКТИВНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА КАК ОСНОВА ПРОФИЛАКТИКИ ГРИБКОВОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

*Караулов А.В., Ликов В.Ф., Евсегнеева И.В., Кокушков Д.В.
Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова*

Основой эффективного иммунного ответа является регулярная «тренировка» различных видов защиты, что возможно только при наличии постоянной антигенной нагрузки. К сожалению, в большинстве случаев лечебная тактика при респираторных инфекциях ориентирована только на элиминацию предполагаемых возбудителей, что неминуемо сопровождается стерилизацией обширных зон обитания эндосимбионтных бактерий, появлению устойчивых форм патогенов и их ассоциаций, созданию условий для формирования недостаточности местных и системных механизмов эффективной защиты. При респираторных инфекциях развитие различных форм кандидозов сопровождается развитием различных нарушений иммунной системы и замедляет процесс выздоровления больного. Клинический опыт убеждает нас в том, что использование бактериальных иммуномодуляторов, которые в терапевтических дозах восстанавливают функции иммунной системы, поддерживает и экологическое равновесие на слизистых оболочках респираторного (имудон) и кишечного (бронховаксом) трактов. При этом схема и дозировка препаратов зависит от тяжести и длительности воспалительного процесса. Так, при пневмониях в стадии реконвалесценции обязательны курсы бронховаксома и имудона (в том числе и ситуационно для профилактики, при респираторных рецидивирующих заболеваниях – наряду с антибактериальными препаратами использование препаратов (ИРС-19, имудон) является не только желательным, но и обязательным составляющим лечения. Клинический эффект при их применении заключается не только в снижении числа рецидивов и количества потребляемых антибиотиков, но и в профилактике кандидозов. Наиболее показательны изменения микробиоценоза полости рта под влиянием имудона, использование которого приводит к элиминации грибов рода *Candida*. Адекватным методом для иммуномониторинга является исследование sIgA, содержание которого отражает эффективность местной защиты и коррелирует с данными клинического обследования больных.

СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ КАНДИДОЗОМ И АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ С МИКОГЕННОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИЕЙ

*Лебедева Т.Н., Соболев А.В.,
Минина С.В., Баранцевич Е.П.*

*НИИ Медицинской микологии
имени Кашкина П.Н. Санкт-Петербургской медицинской
академии последипломного образования МЗ РФ
Санкт-Петербург*

Известно выраженное отрицательное влияние микогенной сенсibilизации на течение атопических заболеваний. В развитии сенсibilизации к *Candida* важную роль отводят колонизации организма грибами этого рода. Патологические процессы часто сопровождаются изменением уровня перекисного окисления липидов. Последний определяется с одной стороны накоплением свободных радикалов, с другой – состоянием систем антиоксидантной защиты, ингибирующей перекисидацию липидов. Резервы антиокислительной активности имеют широкие колебания при различных формах заболеваний и в определенных случаях требуют коррекции препаратами, обладающими антиоксидантной активностью.

Цель настоящей работы состояла в оценке уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиокислительной активности (АОА) плазмы крови у больных кандидозом желудочно-кишечного тракта и атопическим дерматитом, сопровождающимся микогенной сенсibilизацией.

Всего было обследовано 10 практически здоровых лиц, 12 больных различными формами кандидоза желудочно-кишечного тракта и 9 больных с обострением атопического дерматита с сенсibilизацией к аллергену *Candida*. ПОЛ определяли по содержанию малонового диальдегида (ТБК-тест). Антиокислительную активность плазмы крови оценивали известным методом торможения перекисления липидов с использованием в качестве субстрата желточных липопротеидов.

Результаты исследований показали, что у больных кандидозом ПОЛ и АОА плазмы крови, как правило, существенно не отличались от контрольной группы. Напротив, при обострении атопического дерматита уровень ПОЛ повышался на 6,5–11,2%, а АОА плазмы крови снижалась на 10,0–19,6% по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы. Истощение систем антиокислительной защиты, сопровождающееся активацией ПОЛ, у больных атопическим дерматитом с микогенной сенсibilизацией, видимо, требует коррекции препаратами антиоксидантного действия.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИМУДОНА В ПРОФИЛАКТИКЕ КАНДИДОЗОВ ПРИ РЕЦИДИВИРУЮЩИХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Ликов В.Ф., Кокушков Д.В.

Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова

Слизистые оболочки полости рта и глотки в силу своего топографического положения первыми подвергаются атаке патогенов. При рецидивирующих респираторных инфекциях в полости возникает застой слизи, повышается вязкость секрета, что затрудняет его отток, ослабляет его защитные функции и способствует развитию местной инфекции. Более 80% респираторных заболеваний сопровождаются поражением слизистой оболочки глотки и лимфоидного глоточного кольца. Важный фактор ослабления защитных реакций слизистых – различные сопутствующие заболевания (бронхиальная астма, сахарный диабет, вирусные гепатиты, парадонтит), пожилой возраст и прием определенных препаратов, приводящих к ослаблению местного иммунитета. Подсчитано, что каждую минуту в слюну попадает примерно 1 млн лейкоцитов, причем 90% всех лейкоцитов слюны составляют полиморфноядерные нейтрофилы, которые своим бактерицидным свойствам активно противодействуют микроорганизмам, представляющим флору полости рта. *sIgA* принадлежит ведущая роль в местной иммунной защите слизистых оболочек, он ингибирует адгезивную способность вирусов, бактерий и грибов. Важную роль играет и микроэкология полости рта, в которой помимо бактерий присутствуют и грибы (актиномициты, кандиды). Имудон стимулирует защитные силы слизистой оболочки полости рта, увеличивает количества *sIgA*, играющих главную роль в системе защиты ротовой полости. Он содержит антигены 12 штаммов микроорганизмов, включая *Candida*. Мы использовали препарат для профилактики кандидоза полости рта у больных РРЗ (6 таблеток в течение 2 недель). Ни в одном случае при антибактериальной терапии мы не наблюдали развитие кандидоза, тогда как в контрольной группе процент поражения составил свыше 5%. При возникновении стоматита мы назначали до 8 таблеток в день в течение 3 недель, эффект от лечения наблюдался уже на первой недели (проходили сухость полости рта, исчезали налет и гиперемия на пораженных участках и т.д.). Профилактический эффект одного курса сохранялся в течение 4 месяцев. Иммуномониторинг в виде исследования секреторного *IgA* также подтвердил клинический эффект препарата. Таким образом, использование имудона является эффективным методом профилактики и лечения кандидозов ротовой полости при РРЗ.

СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ К ДРОЖЖЕВЫМ ГРИБАМ – ПРИЧИНА ОБОСТРЕНИЙ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

Лукина Н.М., Абдушкурова А.М., Сайлауова К.С., Оспанова С.А., Тонконогова Н.В., Серикбаева М.М., Джаболдинов А.С.

Научно-исследовательский кожно-венерологический институт
Министерства Здравоохранения Республики Казахстан
Алматы, Казахстан

К особой группе причинных факторов атопического дерматита следует отнести бактериальные, грибковые, лекарственные, вакцинальные и другие факторы. Во-первых, они реже встречаются как самостоятельные этиологически значимые аллергены, вызывающие атопический дерматит. Во-вторых, они чаще выступают в ассоциации с классическими аллергенами, формируя поливалентную аллергию, или выступают в роли триггеров (факторов, имеющих преимущественно провоцирующее действие за счет усиления отдельных звеньев механизма аллергии).

Целью нашей работы явилось выявление роли дрожжевых грибов как причинного фактора обострений при атопическом дерматите.

В задачи нашего исследования входил анализ результатов микологического исследования с очагов поражения кожи, данных анамнеза о сезонности обострений у больных атопическим дерматитом.

Проанализированы данные результатов микологического исследования очагов поражения кожи 119 больных атопическим дерматитом, находившихся на стационарном лечении в отделении алергодерматозов НИКВИ, в возрасте от 1,5 до 21 года – 69 (58,0%) женского и 50 (42,0%) мужского пола, из них с везикуло-крустозной формой атопического дерматита – 31 (26,1%), эритемато-сквамозной – 43 (36,1%), лихеноидной – 45 (37,8%) больных.

При культуральном обследовании материала из очагов поражения кожи у больных атопическим дерматитом процент носителей грибов *Candida* на коже составил 82,3%: *C. albicans* составляли 69,4% выделенных штаммов, *C. tropicalis* – 22,4%, *C. crusei* – 8,2%.

Рассматривалась частота выделения грибов рода *Candida* из очагов поражения у больных различными клиническими формами атопического дерматита (табл.1).

Полученные данные свидетельствуют о превалировании в микофлоре грибов рода *Candida* в очагах поражения у больных эритемато-сквамозной формой атопического дерматита. Как показал ретроспективный анализ анамнестических данных истории болезни испытуемой группы в 69,7% случаев время обострения заболевания совпадает с началом похолодания (октябрь, ноябрь-месяцы). Больные этой группы проживают в частном секторе, в недостаточно отапливаемых, плохо проветрива-

Таблица 1. Видовой спектр дрожжеподобных грибов рода *Candida*, выделенных из очагов поражения при атопическом дерматите

Название микроорганизмов	Везикуло-крустозная форма (n=21)	Эритемато-сквамозная форма (n=33)	Лихеноидная форма (n=44)
<i>C. tropicalis</i>	23,8% (n=5)	33,3% (n=9)	18,1% (n=8)
<i>C. crusei</i>	9,5% (n=2)	12,1% (n=3)	6,8% (n=3)
<i>C. albicans</i>	66,6% (n=14)	78,8% (n=21)	47,7% (n=33)

емых, влажных помещениях, что, видимо, могло бы способствовать микробной обсеменности кожного покрова.

Таким образом, показана роль дрожжевых грибов в развитии сенсibilизации у больных атопическим дерматитом преимущественно с эритемато-сквамозной формой, что может являться одной из причин сезонности обострений.

НЕМЕДИКАМЕНТОЗНЫЕ МЕТОДЫ И ИММУНОКОРРЕКТОРЫ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ МИКОТИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ

Мельник А.П., Тверской Р.М.,
Яковлев И.М., Исламов Ю.Ш., Шевкунов С.В.
Магнитогорский кожно-венерологический диспансер
Магнитогорск

Необходимость воздействия на многочисленные патогенетические механизмы при микотической патологии приводит к одновременному использованию большого количества медикаментозных препаратов, многие из которых обладают выраженными побочными эффектами. Поэтому, поиск новых методов лечения, в том числе и немедикаментозных, остается актуальной задачей.

Целью исследования была оценка эффективности большой аутогеомоноотерапии (БАГОТ) и квантовой гемотерапии (КГТ) в сочетании с иммунокорректорами в комплексном лечении осложненных микозов стоп (ОМС).

Обследованы с последующим лечением 72 больных с ОМС, обусловленными *Tg. rubrum*.

Мужчин – 57, женщин – 15, в возрасте от 28 до 59 лет. У 58 больных, наряду с явлениями экзематизации и вторичной инфекции, были поражены ногтевые пластинки стоп и кистей.

Выделены две группы больных. В первой группе (23 чел.) исследовалось состояние фагоцитарной системы: у всех больных наблюдали снижение процента фагоцитирующих клеток ($26,3 \pm 3,2\%$, при норме 60-80%), фагоцитарного числа ($3,1 \pm 0,6$ ед., при норме 4-9 ед.), абсолютного фагоцитарного показателя ($8,64 \pm 2,71$ млн/мл, при норме 27,3–36,4 млн/мл), индекса активации нейтрофилов ($1,8 \pm 0,7$, при норме > 3). Наряду с применением системных антимикотиков по непрерывной схеме (экзифин, тербизил), с целью стимуляции кислород-зависимой цитотоксичности нейтрофилов проводили КТГ с помощью волоконного облучателя ОВК-3 мод.4а в режиме: мощность излучения на торце световода – 40 мВт, спектральный диапазон УФ – излучения – 340-600 нм, экспозиция – 30-40 мин., количество сеансов 6-10. Одновременно использовали полиоксидоний (П.) – синтетический иммуномодулятор из группы водорастворимых производных гетероцепных полиаминов. Учитывали, что взаимодействие П. с нейтрофилами и моноцитами приводит к усилению синтеза цитокинов и фагоцитоза. Завершенность фагоцитоза играет одну из основных ролей в патогенезе микотической патологии. Причем, способность П. стимулировать бактерицидные свойства нейтрофилов, не связана с активацией кислородзависимых механизмов бактерицидности, а выраженные антиоксидантные, антиоксидантные, мембраностабилизирующие свойства обуславливают его использование на фоне длительного применения системных антимикотиков. Назначали П. по 6 мг внутримышечно 2 раза в неделю в течение 2-х месяцев.

Во второй группе (49 чел.) оценивалась эффективность БАГОТ в сочетании с липоидом (Л.). Анализ влияния БАГОТ на иммунный статус проводился по уровню субпопуляций лимфоцитов (CD 3+, CD 4+, CD 8+, CD 20+, CD 56+, CD 4+ / CD8+) стрептовидинбиотинным способом, Jg E – иммуноферментным методом, НСТ – тест – методом инкубации в термостате с раствором латекса, Jg A, JgM, JgG – турбидиметрическим методом. Каждому из пациентов было проведено 8-10 сеансов БАГОТ в течение 4-5 недель, т.е. 2 раза в неделю, на фоне базисной терапии системными антимикотиками по непрерывной схеме. В пластиковый одноразовый контейнер «Гемакон 500/300» с антикоагулянтом осуществлялся забор 100 мл венозной крови, после чего в него вводили озono-кислородную газовую смесь (200-250 мл, с концентрацией озона в газе 10 мкг/мл). Тщательно и аккуратно перемешивали содержимое контейнера в течение 5 минут, затем модифицированную аутокровь реинфузировали в вену. Озono-кислородную газовую смесь получали на отечественном медицинском озонаторе «МЕДОЗОНС – БМ» (сертиф. № РОСС. RU. ME34.В01010). Одновременно применяли Л. – синтетический препарат природного происхождения, который повышает общую сопротивляемость макроорганизма к патогенному фактору прежде всего за счет активации клеток фагоцитарной системы иммунитета (нейтрофилов и макрофагов), сти-

мулирует антителообразование и реакции клеточного иммунитета, по 1 таб. (10 мг) в день, в течение 10 дней сублингвально (инструкция по применению МЗ РФ №95/211/14 от 8.06.95 г.).

В обеих группах для уменьшения антигенной нагрузки пораженные ногтевые пластинки удалялись аппаратным способом, с последующей мазевой терапией, проводилась дезинфекция обуви камерным методом.

По данным проведенного исследования комплексное лечение с применением КТГ и БАГОТ оказалось эффективным, соответственно, в 86,9% случаев (20 больных) и 89,7% случаев (44 больных). Критерий – отсутствие рецидивов в течение 2-х лет. Отмечена более ранняя элиминация грибов при положительной клинической динамике, выраженное стимулирующее действие на показатели фагоцитоза, тенденция к увеличению некоторых показателей клеточного иммунитета (CD3+ – клеток, CD4+ – клеток, CD 56+ – клеток и иммунорегуляторного индекса), снижение аллергического компонента, сокращение сроков лечения, уменьшение побочных явлений по сравнению с традиционными методами.

ВЛИЯНИЕ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* НА СИНТЕЗ ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА ИММУННЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Поспелова А.В., Бурмистрова А.Л., Хомич Ю.С., Самышкина Н.Е., Бахарева Л.И.¹

Челябинский государственный университет

¹ *ГКБ № 6*

Челябинск

Кандидоз является одной из наиболее распространенных грибковых инфекций. Кроме того, эта нозологическая форма является оппортунистической инфекцией, поэтому даже при наличии высокоактивных противогрибковых средств лечение кандидоза на фоне иммунодефицита не всегда бывает успешным. Данная проблема стимулирует интерес к изучению иммунного ответа при кандидозе. Важную роль в модуляции иммунного ответа играют цитокины, синтезируемые иммунными клетками. В частности, считается, что интерферон-гамма ассоциируется с активацией Th-1 звена (Т-хелперы 1 типа) клеточного иммунитета на ранних стадиях инфекции. Активность Th-1 лимфоцитов способствует излечению от кандидоза, в то время как преобладающая деятельность

лимфоцитов Th-2 типа ассоциируется с хронизацией кандидозного процесса. Отмечено, что преобладание Th-1 или Th-2 типов иммунного ответа зависит от длительности заболевания и массивности инфицирования. Такая ситуация описывается при изучении иммунного статуса людей, больных кандидозом. Целью же нашего исследования является оценка влияния грибов рода *Candida* на выработку интерферона-гамма иммунными клетками крови донора.

Материалы и методы: в исследовании использовались 42 клинических штамма грибов рода *Candida*, полученных при микробиологическом обследовании пациентов с подозрением на кандидозный процесс. Данные штаммы культивировались 48 часов на среде Сабуро, дважды отмывались буферным раствором при центрифугировании (3000 об/мин в течение 15 мин). Для приготовления антигена грибные клетки прогревались при 80 град. С в течение 1 часа на водяной бане, для стимуляции цитокинопродукции использовалась суспензия, содержащая 10 в 7 степени кл/мл. При постановке использовалась цельная периферическая гепаринизированная кровь донора, разведенная средой RPMI с глутамином в соотношении 1:5. Кровь и грибной антиген в соотношении 1:1 помещались в иммунологический планшет. В качестве контроля (оценка спонтанной индукции) использовалась кровь с добавлением культуральной среды без грибного антигена. Планшеты инкубировались 72 часа в условиях эксикатора (37°C, 0,5% CO₂). После инкубации сняты супернатанты, разделены на малые порции и заморожены при - 70°C. Определение количества интерферона-гамма в супернатантах производилось методом ИФА с использованием специальных тест-систем (производство ЗАО «Вектор-Бест» г. Новосибирск, Россия).

Так как клетки крови способны к спонтанной выработке цитокинов, при анализе результатов важно оценить не столько абсолютные значения содержания интерферона-гамма в супернатантах, сколько отношение уровня индуцированной цитокинопродукции к уровню спонтанной.

Результаты: данные представлены в следующей таблице:

Выработка интерферона-гамма	n	Средняя арифметическая величина (пг/мл)	Величина квадратичного отклонения	Стандартная ошибка
Спонтанная	42	1418,28	422,01	105,15
Индукцированная	42	1248,22	307,22	78,26
Отношение индуцированная/спонтанная	42	0,915	0,129	0,035

Вывод: При инкубации в течение 72 часов клеток крови донора с антигеном, полученным из клинических штаммов грибов рода *Candida*, *in vitro* не регистрируется значительное увеличение продукции интерферона-гамма.

ВЛИЯНИЕ ГРИБОВ РОДА CANDIDA НА СИНТЕЗ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ/ ПРОТИВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ИММУННЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

*Поспелова А.В., Бурмистрова А.Л.,
Хомич Ю.С., Самышкина Н.Е., Бахарева Л.И.¹*
Челябинский государственный университет
¹ГКБ № 6, Челябинск
Челябинск

Грибы рода *Candida* являются самыми распространенными возбудителями микотических заболеваний. Кандидозы – микозы, вызванные *Candida*, чаще возникают на фоне дисбаланса в иммунной системе организма. С возрастанием частоты встречаемости данного заболевания среди людей возрастает интерес к состоянию иммунной системы при кандидозах для выявления тех звеньев иммунной защиты, воздействие на которые могло бы способствовать успешному лечению.

В настоящее время считается, что цитокины служат важнейшими факторами иммунопатогенеза заболеваний, оценка уровней цитокинов позволяет изучать состояние иммунной системы организма. Уровень синтеза цитокинов зависит и от состояния иммунных клеток, и от состояния самого стимулирующего фактора-индуктора (качественный и количественный состав). Целью нашего исследования является оценка грибов рода *Candida* как индукторов цитокинопродукции. Задачей данной работы является оценить влияние грибов рода *Candida* на синтез провоспалительных/противовоспалительных цитокинов (ИЛ1-альфа, ИЛ-1бета, ФНО-альфа, антагонист рецептора ИЛ-1) иммунными клетками периферической крови донора.

Материалы и методы: в исследовании использовались 18 клинических штаммов грибов рода *Candida*, полученных при микробиологическом обследовании пациентов с подозрением на кандидозный процесс. Данные штаммы культивировались 48 часов на среде Сабуро, дважды отмывались буферным раствором при центрифугировании (3000 об/мин в течение 15 мин). Для приготовления антигена грибные клетки прогревались при 80°C в течение 1 часа на водяной бане, для стиму-

ляции цитокинопродукции использовалась суспензия, содержащая 10 в 7 степени кл/мл. При постановке использовалась цельная периферическая гепаринизированная кровь донора, разведенная средой RPMI с глутамином в соотношении 1:5. Кровь и грибной антиген в соотношении 1:1 помещались в иммунологический планшет. В качестве контроля (оценка спонтанной индукции) использовалась кровь с добавлением культуральной среды без грибного антигена. Планшеты инкубировались 24 часа в условиях эксикатора (37°C, 0,5% CO₂). После инкубации сняты супернатанты, разделены на малые порции и заморожены при -70°C. Определение количества цитокинов в супернатантах производилось методом ИФА с использованием специальных тест-систем (производство ООО «Цитокин» г. Санкт-Петербург, Россия).

Так как клетки крови способны к спонтанной выработке цитокинов, при анализе результатов важно оценить не столько абсолютные значения содержания цитокинов в супернатантах, сколько отношение уровня индуцированной цитокинопродукции к уровню спонтанной.

Результаты: представлены в следующей таблице:

Продукция цитокинов	N	Средняя арифметическая величина (пг/мл)	Величина стандартного отклонения	Стандартная ошибка среднего
IL-1α (спонтанная продукция)	16	10,994	25,2484	6,3120
IL-1α (индуцированная продукция)	16	23,769	97,5821	24,3955
IL-1α (отношение индуц./спонт.)	16	36,164	47,7532	11,9383
IL-1β (спонтанная продукция)	18	28,324	19,7591	4,6573
IL-1β (индуцированная продукция)	18	44,183	20,2689	4,7774
IL-1β (отношение индуц./спонт.)	18	7,304	23,6376	5,5714
IL-1Ra (индуцированная продукция)	16	371,160	75,3564	18,8391
IL-1Ra (спонтанная продукция)	16	1531,856	967,6327	241,9082
IL-1Ra (отношение индуц./спонт.)	16	10,269	23,2824	6,1395
TNF-α (спонтанная продукция)	17	13,738	23,4396	5,6849
TNF-α (индуцированная продукция)	17	179,677	84,7982	20,5666
TNF-α (отношение индуц./спонт.)	17	30,329	22,0944	5,3587

Таким образом, при совместном культивировании клеток крови донора с антигеном, полученным из клинических штаммов грибов рода *Candida*, in vitro через 24 часа в супернатантах фиксируется одновременно высокий уровень провоспалительных цитокинов (ИЛ-1α, ИЛ-1β, ФНОα) и противовоспалительного антагониста рецептора ИЛ-1.

СРАВНЕНИЕ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ ДОНОРОВ В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ И ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ *CANDIDA SPP.*

Самышкина Н.Е., Бурмистрова А.Л., Чернов Ю.И.,
Рамина Ю.С., Бахарева Л.И.,
Мокринская Е.А., Захарова Н.М.
МГУ факультет почвоведения

Москва

Челябинский государственный университет
Челябинск

МУЗ Городская клиническая больница № 6
МУЗ Городская поликлиника № 7
Челябинск

За последние десятилетия возросла распространенность микозов. В частности, реальную клиническую значимость приобретает проблема кандидоза. В большинстве случаев кандидоз слизистых (в частности вульвовагинальный кандидоз) является эндогенной инфекцией, результатом *Candida*-носительства. Эндогенный кандидоз развивается вследствие внедрения в ткани грибов, являющихся нормальными обитателями слизистых оболочек человека. Источником его могут быть *Candida spp.* обитающие или временно обитавшие в кишечнике, ротовой полости, на коже. Переходу грибов в паразитическое состояние может способствовать снижение защитных сил макроорганизма, наблюдаемое при назначении антибиотиков широкого спектра действия, при длительном применении кортикостероидов, иммунодепрессантов, оральных контрацептивов (преимущественно комбинированных), при наличии тяжелых заболеваний (онкопатологии, болезней крови, диабета и др.), гиповитаминозов, обменных нарушений, хронических болезней.

Большинство исследователей считают, что защита макроорганизма от кандидозной инфекции зависит в основном от функциональной активности факторов врожденного иммунитета, среди которых наибольшее значение имеют клетки, обладающие фагоцитарной активностью. Известно что, система фагоцитоза является определяющим событием во врожденной иммунной защите. Принимать участие в фагоцитарных реакциях способны клетки воспаления: нейтрофилы, моноциты/макрофаги, эозинофилы.

Одним из важнейших механизмов защиты от *Candida*-инфекции является выселение в толщу эпителия и на его поверхность фагоцитирующих клеток, среди которых преобладают нейтрофилы. Считается, что нейтрофилы играют наиболее активную роль в уничтожении клеток грибов, обладая рядом фунгицидных систем и способностью разрушать

как бластоспоры, так и псевдомицелиальные элементы *Candida* за счет фагоцитарных и секреторных механизмов.

Вместе с тем, предметом продолжающейся дискуссии остается вопрос о роли мононуклеарных фагоцитов, нейтрофилов и эозинофилов, как истинных факторов иммунной защиты при кандидозной инфекции. Неоднозначные, а нередко и противоречивые данные обусловили многообразие взглядов о значении этих клеток: от признания за макрофагами важной роли в защите от *Candida spp.* до мнения об их неэффективности или даже отрицательной роли как потенциальных разносчиков возбудителя, способствующих диссеминации кандидозной инфекции.

Остается открытым вопрос о наличии общности и различий во взаимоотношениях природных и клинических штаммов грибов рода *Candida* с фагоцитирующими клетками периферической крови человека, что является важным в понимании механизмов инфицирования макроорганизма эндогенными и экзогенными путями.

Цель исследования: сравнить фагоцитарную и внеклеточную бактерицидную активность донорских фагоцитов в отношении клинических и природных штаммов *Candida spp.*

Материалы и методы. В работе использовано 12 природных штаммов, выделенных с объектов окружающей среды, любезно предоставленных кафедрой биологии почв факультета почвоведения МГУ: 2838 *Candida guilliermondii*, 3198 *Candida guilliermondii*, 3206 *Candida guilliermondii*, 3172 *Candida tropicalis*, 3446 *Candida tropicalis*, 3447 *Candida tropicalis*, 3448 *Candida tropicalis*, 3569 *Rhodotorula rubra*, 35-1 *Rhodotorula rubra*, 2676 *Rhodotorula rubra*, 3-4 *Saccharomyces paradoxu*, 3394 *Kluyveromyces thermotolerans*.

Клинические штаммы *Candida spp.* были выделены от 15 женщин в возрасте 18-53 лет (средний возраст 31,6 года), у которых на основании клинико-лабораторного обследования диагностированы кольпиты, эндоцервициты, хронические сальпингиты, эрозии и эктопии шейки матки. Бактериологическому и микроскопическому изучению было подвергнуто отделяемое цервикального канала и влагалища. Кроме того, было проведено цитоморфологическое изучение мазков со слизистых влагалища и шейки матки. Титр высеваемых культур *Candida spp.* составил $10^4 - 10^6$ КОЕ/мл. Видовой состав полученных изолятов распределился следующим образом: *Candida albicans* – 73%, *Candida glabrata* – 20%, *Candida krusei* – 7% случаев. У 11 женщин выявлена кандидозная моноинфекция, у 4 – ассоциация *Candida spp.* с условно-патогенной микрофлорой.

Объектом исследования служили фагоциты, полученные из периферической крови 20 клинически здоровых доноров в возрасте 22-50 лет.

В опыте использовались только живые суточные культуры *Candida spp.*, выращенные на жидкой среде Сабуро.

Результаты. 1. Совместное культивирование клеток, способных к фагоцитозу, с живыми клиническими и природными штаммами *Candida spp.* выявило, что все фагоциты периферической крови обладают значительной кандидоцидной активностью. Первыми и самыми активными фагоцитирующими клетками по отношению к природным и клиническим штаммам грибов рода *Candida* являются нейтрофилы. На втором месте по фагоцитарной активности в отношении клинических и природных штаммов *Candida spp.* стоят моноциты. Эозинофилы обладают меньшей фагоцитарной активностью в отношении природных и клинических штаммов *Candida*.

Для всех клеток воспаления (нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов) фагоцитарная активность (% фагоцитоза, фагоцитарное число, фагоцитарный индекс) клинических и природных штаммов показала зависимость от длительности инкубации, нарастая с увеличением времени инкубации. При сравнении активности фагоцитоза клинических и природных штаммов грибов *Candida* было установлено, что фагоцитарная активность всех клеток (нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов) была выше в отношении клинических штаммов не зависимо от времени инкубации.

2. Показатели, отражающие отдельные этапы фагоцитарной реакции, были представлены в виде “индекса адгезии” и “индекса поглощения”.

Ранний этап фагоцитарной реакции, представленный “индексом адгезии”, характеризуется количеством “прилипших” *Candida* к одному истинному фагоциту. На начальных режимах инкубации (15 минут) индексы адгезии нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов в отношении клинических и природных штаммов одинаковы. Однако с увеличением времени инкубации до 60 минут индексы адгезии нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов в отношении клинических штаммов становятся выше индексов адгезии природных штаммов и нарастают, тогда как индексы адгезии нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов в отношении природных штаммов снижаются.

3. Поздний этап фагоцитарной реакции, представленный “индексом поглощения”, характеризуется количеством поглощенных *Candida* одним истинным фагоцитом. На начальных этапах инкубации индексы поглощения нейтрофилов и моноцитов выше в отношении клинических культур *Candida*, чем природных штаммов. Однако с увеличением времени инкубации до 60 минут индексы поглощения нейтрофилов и моноцитов в отношении клинических штаммов становятся ниже, чем индексы поглощения природных штаммов. Кроме того, с увеличением времени инкубации снижается поглощение клинических штаммов моноцитами. Эозинофилы же при обоих режимах инкубации активнее поглощают клинические штаммы. Однако скорость поглощения меняется: с увеличением времени инкубации захват клинических штаммов уменьшается, а природных увеличивается.

4. Кроме способности к фагоцитозу клетки воспаления обладают внеклеточной бактерицидной активностью за счет дегрануляции нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и спонтанной секреции микробцидных веществ. Бактерицидная внеклеточная активность отражает активацию фагоцита и последующую его дегрануляцию, позволяя судить о дистантном действии фагоцитов на *Candida spp.* Бактерицидная внеклеточная активность фагоцитирующих клеток преобладает в отношении природных штаммов в 2,5 раза при 15 минутах инкубации ($p=0,072$) и в 3,8 раза при 60 минутах инкубации ($p=0,005$) по сравнению с клиническими штаммами и нарастает с увеличением времени инкубации.

Заключение. Несмотря на то, что клетки воспаления проявляют выраженную фагоцитарную активность в отношении клинических штаммов через 60 минут взаимодействия, конечный результат партнерства реализуется в сниженной внеклеточной бактерицидной активности и поглотительной способности фагоцитирующих клеток в отношении клинических штаммов в сравнении с природными.

ПОВЫШЕНИЕ АФФИННОСТИ АНТИТЕЛ К ОСНОВНЫМ БЕЛКАМ ГРИБА *ASPERGILLUS FUMIGATUS* ЗАВИСИТ ОТ ДОЗЫ АНТИГЕНА И ФОРМИРОВАНИЯ ГЕРМИНАЛЬНЫХ ЦЕНТРОВ

*Свирицкая Е.В., Шевченко М.А.,
Вискова Н.Ю., Шеховцова Е.Л.*

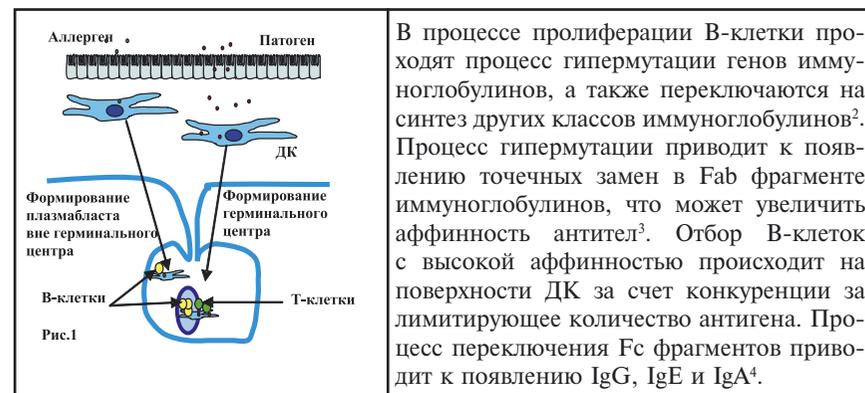
*Институт биоорганической химии имени академиков М.М.
Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН
Москва*

Введение

Аллергия является результатом гиперактивации иммунной системы в ответ на низкие дозы антигена, поступающего через слизистые оболочки. Одним из клинических признаков аллергической реакции, вызывающим посещение больным врача, является реакция гиперчувствительности немедленного типа, опосредованная связыванием IgE антител с аллергеном. До настоящего времени не ясно, почему в норме отсутствует продукция IgE, и какие механизмы принимают участие в формировании IgE при патологии. Данная работа посвящена изучению особенностей формирования IgE на аллергены условнопатогенного гриба *Aspergillus fumigatus*.

Нормальный иммунный ответ на антигены, и особенно на внутриклеточные патогены, формируется внутри особых образований, называемых герминальными центрами (ГЦ) и возникающими в лимфо-

тических узлах (ЛУ) или селезенке в процессе ответа на патоген¹. ГЦ формируется вокруг дендритных клеток (ДК), представляющих антигены как в виде пептидов, так и в виде полноразмерной молекулы. Это приводит к тому, что вокруг ДК собираются антиген-специфичные Т и В-клетки (Рис.1). Наличие плотного контакта между ДК, Т и В-клетками приводит к эффективной активации адаптивного иммунного ответа, характеризующегося экспансией Т-клеток, специфичных к белкам данного патогена, а также к интенсивной пролиферации В-клеток.



В процессе пролиферации В-клетки проходят процесс гипермутации генов иммуноглобулинов, а также переключаются на синтез других классов иммуноглобулинов². Процесс гипермутации приводит к появлению точечных замен в Fab фрагменте иммуноглобулинов, что может увеличить аффинность антител³. Отбор В-клеток с высокой аффинностью происходит на поверхности ДК за счет конкуренции за лимитирующее количество антигена. Процесс переключения Fc фрагментов приводит к появлению IgG, IgE и IgA⁴.

Показано, что при формировании ГЦ основным типом антител являются IgG1 и IgG3⁵. Одной из возможностей, объясняющих продукцию IgE, является отсутствие формирования ГЦ при ответе на аллергены (Рис.1). Это связано с тем, что для формирования ГЦ требуется высокая концентрация антигенов, а также наличие на них структур, распознаваемых ДК⁶. При попадании низкого количества антигена макрофаги и ДК, находящиеся в тканях, приносят их в ЛУ. Однако в аллергенах отсутствуют структуры, активирующие ДК⁷. В результате возникает внефолликулярный центр, в котором отсутствуют условия для пролиферации Т-клеток, а также для селекции В-клеток⁸. В итоге активированные В-клетки не имеют достаточного сигнала для дифференцировки, что приводит к продолжительному процессу переключения Fc фрагментов. Конечной стадией такого переключения как раз и являются IgE антитела.

Цель работы

В данной работе проведен анализ аффинности IgG и IgE вызванных иммунизацией мышей аллергеном из грибов *A. fumigatus Asp f 2* по протоколу с и без формирования ГЦ.

Методы

Для индукции ГЦ мышей линии BALB/c иммунизировали п/к 100 мкг/мышь *Asp f 2* с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ). Иммунный ответ без формирования ГЦ вызывали десятикратной иммунизацией *Asp f 2* в фосфатном буфере (ФБ). Дозы использовали от 300 мкг/мышь

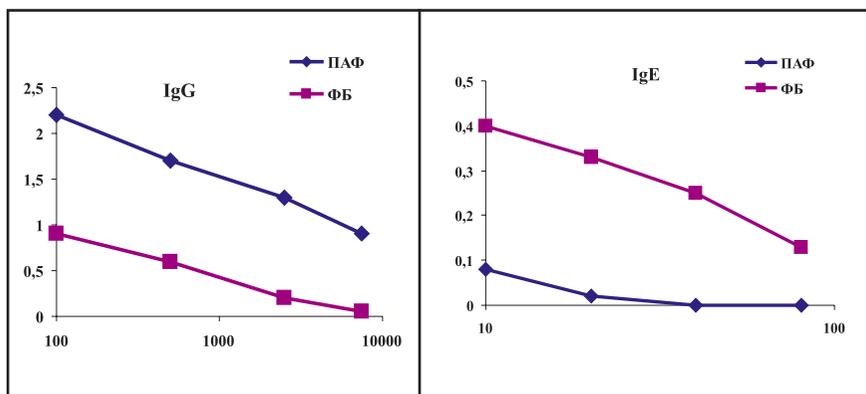


Рис.2. Продукция IgG и IgE при иммунизации в ПАФ и ФБ. Мышам вводили ИЛ-4.

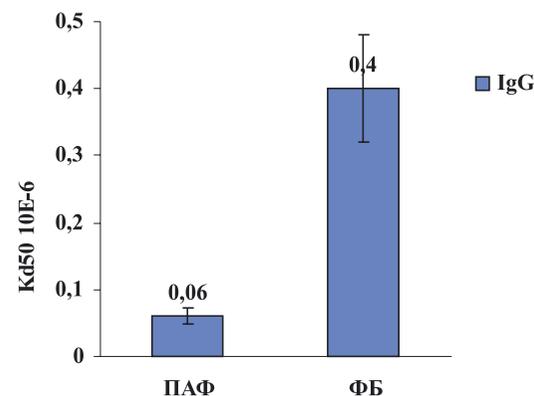


Рис.3. Kd IgG антител при иммунизации в ФБ и ПАФ.

до 3 мкг/мышь (общая доза). Дополнительно мышам вводили интерлейкин 4 (ИЛ 4) в/б для усиления продукции IgE. Титры антител и константы диссоциации (Kd) анализировали в динамике ответа с помощью ИФА.

Результаты и обсуждение

Высокие дозы антигена- ПАФ против ФБ

Иммунизация с ПАФ ведет к формированию ГЦ, что приводит к продукции В-клетками высокоаффинных (с низкой Kd) IgG антител.

Для анализа влияния формирования ГЦ на аффинность, мышей иммунизировали в три раза большей дозой антигена в ФБ. Однако титры IgG были значительно более высокими в случае иммунизации с ПАФ (Рис.2). Кроме того, иммунизация в ПАФ не приводила к появлению IgE (Рис.2, правое окно). И, напротив, иммунизация в ФБ приводила к появлению IgE. Анализ Kd показал, что формирование ГЦ при иммунизации в ПАФ приводит к значительному повышению аффинности (снижению Kd) IgG антител и препятствует формированию IgE (Рис.3.) И, напротив, иммунизация в ФБ провоцировала формирование IgE антител с низкой аффинностью (Рис.4).

Аллергены в ФБ- низкие или высокие дозы вызывают IgE?

В норме аллергены поступают в организм в очень низких дозах. Поэтому ответ на аллергены не ассоциирован с формированием ГЦ. Отсутствие ГЦ препятствует селекции В-клеток с повышенной аффинностью.

Действительно, иммунизация мышей в ФБ в высокой дозе приводила к повышению аффинности, в отличие от естественной аффинностью, характерной для IgM антител, при иммунизации низкой дозой Asp f 2 (Рис. 5).

Роль ИЛ-4 в синтезе IgE

Аллергические заболевания имеют генетическую основу. Считается, что предрасположенность к повышенной продукции ИЛ-4 и ИЛ-13 играет значительную роль в патогенезе аллергических заболеваний. Для анализа влияния ИЛ-4 на синтез IgE при иммунизации мышей низкой дозой аллергена из грибов *A. fumigatus* мышам дополнительно вводили ИЛ-4 в/б. Добавление ИЛ-4 приводило к повышению уровня как IgG, так и IgE (Рис. 5 и 6).

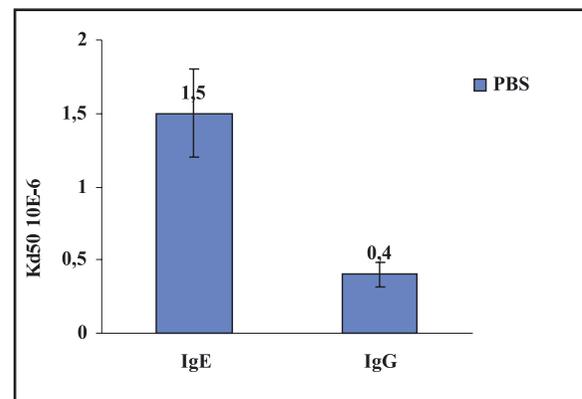


Рис.4. Kd IgG и IgE антител при иммунизации в ФБ.

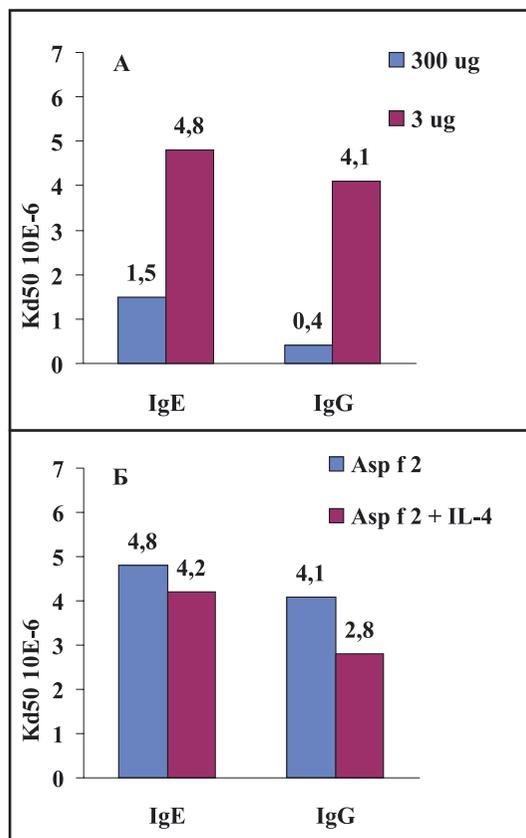


Рис.5. А. Kd IgG и IgE антител при иммунизации в ФБ низкими или высокими дозами аллергена Asp f 2. Б. Влияние ИЛ-4 на аффинность антител IgG и IgE классов.

Выводы

Таким образом, нами показано, что попадание аллергена в низких и очень низких дозах в организм может вызывать формирование IgE антител внегерминальным путем. Генетически опосредованная повышенная продукция ИЛ-4 с большой вероятностью усиливает этот процесс.

Литература

1. MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:117-39.
2. Monticelli S, Vercelli D. Molecular regulation of class switch recombination to IgE through epsilon germline transcription. *Allergy.* 2001 Apr;56(4):270-8.
3. Inouye K, Ito T, Fujimaki H, Takahashi Y, Takemori T, Pan X, Tohyama C, Nohara K. Suppressive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the high-affinity antibody response in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci.* 2003 Aug; 74(2):315-24. Epub 2003 May 28.
4. Nagumo H, Agematsu K, Kobayashi N, Shinozaki K, Hokibara S, Nagase H, Takamoto M, Yasui K, Sugane K, Komiyama A. The different process of class

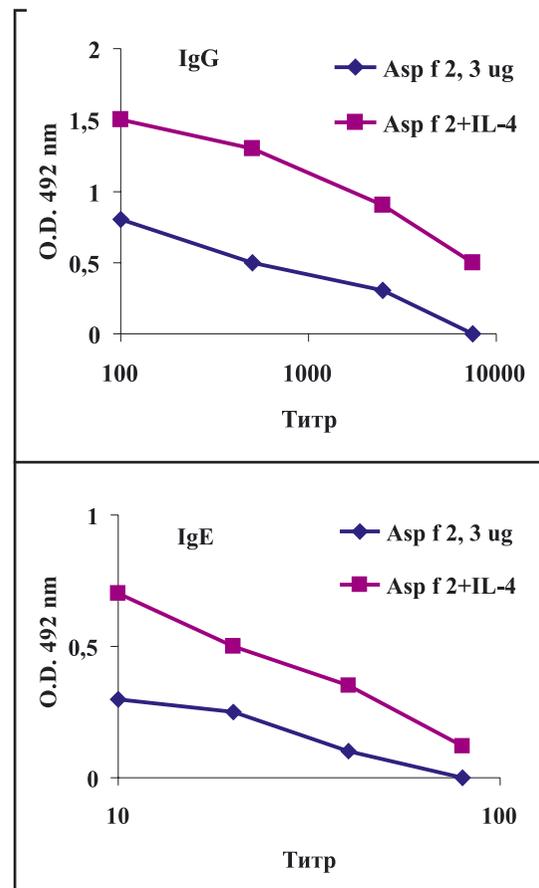


Рис.6. Повышение титров IgG и IgE антител при иммунизации в ФБ низкими дозами Asp f 2 в присутствии ИЛ-4.

switching and somatic hypermutation; a novel analysis by CD27(-) naive B cells. *Blood.* 2002 Jan 15;99(2):567-75

5. Skvaril F. *Monogr Allergy. IgG subclasses in viral infections* 1986;19:134-43
6. Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system *J Leukoc Biol.* 2004 May;75(5):749-55. Epub 2004 Jan 14.
7. Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Korting HC. Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol.* 2004 Jan;12(1):44-9. Review
8. MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zuniga E, Cook MC, Vinuesa CG. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev.* 2003 Aug; 194: 8-18.

Работа проведена при поддержке фонда РФФИ, грант 04-04-48815.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАЛЛЕЛИ У БОЛЬНЫХ КАНДИДОЗОМ КОЖИ И СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК

Соколова Т.В., Мокроносова М.А., Григорьян С.А.
ГИУВ МО РФ

НИИ Вакцин и сывороток
имени И.И. Мечникова
Москва

Кандидоз – является наиболее распространенным грибковым заболеванием среди населения. Грибы рода *Candida* оставляют далеко позади все грибы вместе взятые.

Кандидозная инфекция является оппортунистической, поражая прежде всего ослабленный организм. *C. albicans* входят в состав постоянной микрофлоры пищеварительного тракта. При этом наибольший процент колонизации (65 – 80%) наблюдается в толстой кишке. В полости рта *C. albicans* обнаруживается у 27% обследуемых людей, а колонизация влагалища происходит у 10 – 30% здоровых женщин (Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В., 2003).

Кандидозная инфекция является значимым триггерным фактором отягощающим течение многих дерматозов, аллергического генеза. Установлено, что кандидоз полости рта является проявлением системного кандидоза, и источником высоко вирулентных штаммов грибов, в этом случае является кишечник (Златкина А.Р., и соавторы, 2001).

Целью настоящего исследования явилось изучение частоты высеваемости грибов рода *Candida*, у больных с клинически верифицированным диагнозом кандидоза кожи и слизистых оболочек, и сопоставление полученных данных с результатами внутрикожных аллергических проб с антигеном *C. albicans* и обнаружением IgM и IgG в сыворотке крови методом ИФА.

Под наблюдением было 26 больных кандидозом кожи (КК) и слизистых оболочек (КСО) возрасте от 3 до 60 лет. Преобладали женщины (84%). Дети составили 1/3 (32%) выборки. Среди нозологических форм наиболее часто регистрировались кандидоз слизистой оболочки полости рта (77,3%), как правило, сопровождающийся хейлитом (68,2%), и кандидозный вульвовагинит (80%). Реже диагностировались кандидозная онихия и паронихия (27,3%), в большинстве случаев осложненные микотической экземой кистей (22,8%). Кандидозный дерматит ладоней и подошв, а также баланопостит выявлены у единичных больных (4,6%). Отмечено, что кандидозная инфекция протекает, как полиочаговое заболевание. В среднем на одного больного приходилось 3,1

нозологических форм КК и КСО. КК и КСО выявлен у 1/3 больных с диагнозом микробная экзема, что, вероятно обусловлено повторными курсами антибактериальной терапии.

Всем больным проведено бактериологическое исследование мазков из зева, носа на грибы рода *Candida* и кала на дисбактериоз, а женщинам – и влагалищного отделяемого. Лабораторно диагноз верифицирован в 80,8% случаев. При этом грибы рода *Candida* обнаруживались с очагов на слизистых оболочках значительно чаще, чем при исследовании кала на дисбактериоз. Они выявлены у половины больных в зеве (50%), носу (45,5%) и вагине (45,5%). При посеве содержимого толстого кишечника рост наблюдался только у 19,3% больных. Существенно, что у 69,3% больных рост грибов рода *Candida* наблюдался с двух очагов. Важно отметить, что при положительном результате бакпосева со слизистой носа имела место клиническая картина КСО полости рта. Установлено преобладание грибов *C. albicans* (90,4%). Лишь в 2 случаях отмечен рост *C. tropicalis* и *C. parapsilosis*.

Важно отметить, что наиболее чувствительным методом диагностики оказались внутрикожные аллергические пробы с кандидозным антигеном. Положительная гиперэргическая реакция немедленного типа (ГНТ) отмечена у 92% больных. Гиперэргическая реакция замедленного типа (ГЗТ) наблюдалась у всех больных, в том числе резко положительная у 1/3 пациентов. У половины больных следы от внутрикожной пробы с антигеном *C. albicans* сохранялись в виде инфильтрации, переходящей в гиперпигментацию до 3 недель. В контрольной группе из 15 здоровых людей в возрасте от 4 до 43 лет ГНТ отсутствовала, а ГЗТ была не более 5 мм.

IgM- и IgG-антитела к *C. albicans* выявлены у 30,8% больных, IgG – у 7,7%, IgM – у 3,9%. Таким образом, иммунологический метод дал положительный результат в 42,4 % случаев, преимущественно у больных в давностью заболевания 3 месяца и более.

Выше изложенное свидетельствует, что КК и КСО сопровождается гиперэргической иммунологической реакцией со стороны гуморального и клеточного иммунитета, что подтверждается положительными внутрикожными пробами с кандидозным антигеном. О высокой сенсибилизирующей роли грибов рода *Candida* свидетельствует нередкое осложнение КК и КСО микробной экземой. Метод бактериологического исследования достаточно информативен при кандидозной инфекции и позволяет подтвердить клинический диагноз. При этом наиболее ценным является забор материала со слизистой оболочки зева, носа и вагины.

УРОВЕНЬ ПРОТИВОКАНДИДОЗНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ E В КРОВИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ

**Фещенко Ю.И., Рекалова Е.М.,
Круглова И.Ф., Ясирь С.Г.**

*Институт фтизиатрии и пульмонологии имени Ф.Г. Яновского
Киев, Украина*

При обострениях хронических неспецифических заболеваний легких (ХНЗЛ) кандиды в нижних дыхательных путях определяются в клинически значимом титре у половины больных, что в значительной степени связано с интенсивным применением у них антибактериальной и ингаляционной кортикостероидной терапии. Однако в большинстве случаев трудно отличить кандидозное носительство и колонизацию дыхательных путей от кандидоза, когда происходит инвазия микромицета в бронхолегочную ткань, что может усугублять неспецифический патологический процесс. Остается неясным также, насколько *Candida*, которые входят в состав нормальной микрофлоры человека, при колонизации нижних дыхательных путей больных ХНЗЛ могут влиять на аллергические процессы.

С целью установления влияния *Candida* на течение ХНЗЛ у взрослых иммунокомпетентных больных был изучен уровень противокандидозных сывороточных иммуноглобулинов (Ig) E и проведен корреляционный анализ его взаимосвязи с другими клиническо-лабораторными показателями.

Было обследовано в динамике 49 больных ХНЗЛ, средний возраст их составлял $47,5 \pm 2,0$ лет, давность заболевания – $8,5 \pm 1,3$ лет, длительность обострения – $1,9 \pm 0,2$ месяца. Среди обследованных было 23 мужчин и 26 женщин. У 7 человек (14%) был диагностирован хронический необструктивный бронхит, у 16 больных (33%) – бронхиальная астма (БА), у 17 больных (35%) – хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), у 9 больных (18%) – сочетание ХОЗЛ и БА. На амбулаторном этапе 24 человека (49%) получали антибиотики, 16 человек (33%) – ингаляционные кортикостероидные препараты. Было проведено клиническое, рентгенологическое, функциональное, бронхологическое, микробиологическое, паразитологическое (с целью идентификации пневмоцист микроскопическим методом при окраске 1% раствором толуидинового синего и азур-эозином) обследование. Иммунологическое обследование включало использование проточной лазерной цитометрии (проточный цитометр «FACScan») с использованием моноклональных антител с двойной меткой («Caltag laboratories»,

США) с фенотипированием основных популяций лимфоцитов для оценки системного иммунитета, определением иммуноглобулинов A, M, G, уровня циркулирующих иммунных комплексов, фагоцитарного звена (показатель фагоцитоза и НСТ-тест моноцитов, нейтрофилов крови) и факторов местной защиты (альвеолярных макрофагов). Уровень специфических противокандидозных (к *C. kruzei* и *C. maltosa*) Ig E-антител в сыворотке крови определяли полуколичественным методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем «Аллерген» филиала ФГУП НПО «Микроген» (Ставрополь, Россия). Статистическая обработка материала проводилась с помощью лицензионных программных продуктов, входящих в пакет Microsoft Office Professional 2000 в программе Excel. При сравнении количественных признаков в двух выборках использовался двухсторонний t-критерий Стьюдента (для зависимых и независимых выборок). Для анализа связи между показателями вычислялся коэффициент корреляции Пирсона. Различия считались достоверными при значении $p \leq 0,05$.

Candida spp. микробиологически были выявлены в мокроте в фазе обострения – у 22 больных (45%), в фазе ремиссии – у 22 человек (50%). Наличие в фазе обострения в сыворотке крови противокандидозных Ig E сопровождалось выделением культуры микромицета из мокроты только у 22–41% больных, тогда как в случае отсутствия реагинов – у 58–38% больных, $p < 0,05$ (см. таблицу).

Таблица

Частота выявления сывороточных специфических иммуноглобулинов E у больных ХНЗЛ (в скобках – количество положительных проб/количество обследованных)

В сыворотке/мокроте	Ig E к <i>C. kruzei</i>		Ig E к <i>C. maltosa</i>	
	обострение	ремиссия	обострение	ремиссия
Выявлены Ig E	37% (18/49)	27% (12/44)	84% (41/49)	59% (26/44)
Параллельно <i>Candida</i> выделены из мокроты	22% (4/18)*	42% (5/12)	41% (18/41)	50% (13/26)
Не выявлены Ig E	63% (31/49)	73% (32/44)	16% (8/49)	41% (18/44)
Параллельно <i>Candida</i> выделены из мокроты	58% (18/31)*	41% (13/32)	38% (3/8)	50% (9/18)

Примечание: * – отмеченные показатели отличались достоверно ($p < 0,05$).

Следовательно, подъем уровня сывороточных специфических Ig E у больных ХНЗЛ чаще не был связан с выделением из дыхательных путей *Candida*, и может свидетельствовать о наличии перекрестнореагирующих антител, либо о перенесенном в прошлом инфицировании данным видом микроорганизмов, приведшем к образованию клеток памяти (в частности, В-лимфоцитов, которые при любой неспецифической активации могут активизироваться и синтезировать антитела соответствующей специфичности).

Были выявлены корреляционные связи ($p \leq 0,05$) между уровнем противокандидозных Ig E в фазе обострения и следующими показателями: уровнем аланинаминотрансферазы ($r=0,41$), СОЭ ($r=0,34$), CD22+ ($r=0,54$), Ig A ($r=0,35$), Ig M ($r=0,40$), титром нормальных антител ($r=0,41$), фагоцитарным числом моноцитов крови ($r=0,39$), а также показателем фагоцитоза нейтрофилов ($r= -0,36$) и показателем фагоцитоза альвеолярных макрофагов ($r= -0,48$). Следовательно, уровень противокандидозных сывороточных Ig E в фазе обострения был связан с активностью В-лимфоцитов (CD22+, Ig A, Ig M, титр нормальных антител), фагоцитов крови и легких, функцией печени (аланинаминотрансфераза) и величиной СОЭ, являющейся показателем воспалительных процессов в организме.

Кроме того, по ряду показателей, установленных в обострении, отмечалась сильная корреляция с уровнем противокандидозных Ig E в ремиссии, а именно: процента эозинофилов ($r=0,74$), CD3+ ($r= -0,41$) и CD4+ лимфоцитов крови ($r= -0,38$), количества пневмоцист в мокроте ($r=0,59$), особенно больших ($r=0,78$) и средних ($r=0,57$) форм, а также фагоцитарного числа альвеолярных макрофагов ($r=0,74$). То есть, высокий уровень специфических Ig E в фазе ремиссии был взаимосвязан с эозинофилией, угнетением Т-лимфоцитов (CD3+) и их хелперной фракции (CD4+), активностью альвеолярных макрофагов, количеством пневмоцист в дыхательных путях в обострении. Наличие корреляционной связи между уровнем противокандидозных Ig E в ремиссии с величиной форсированной жизненной емкости легких в обострении ($r= -0,28$, $p < 0,05$) может свидетельствовать о том, что выраженные обструктивные нарушения легочной функции, отражающие ухудшение клинического состояния больных, взаимосвязаны с концентрацией данных реакинов.

Уровень Ig E в ремиссии коррелировал также с другими показателями, определенными параллельно в фазе ремиссии ($p \leq 0,05$): с процентом лимфоцитов ($r=0,42$), CD3+ ($r=0,36$) и CD8+ ($r=0,53$), CD22+ ($r=0,64$) крови, концентрацией сывороточного Ig A ($r=0,28$) и количеством больших форм пневмоцист в мокроте ($r=0,60$). Следовательно, уровень специфических Ig E в фазе ремиссии был взаимосвязан с функционированием лимфоцитов крови и их Т- (в том числе супрессорной – CD8+) и В-фракций (CD22+, Ig A), а также наличием пневмоцист в мокроте.

Таким образом, титр противокандидозных Ig E коррелировал с изменением регуляторных фракций Т-лимфоцитов (CD 3+, CD 4+, CD 8+) и активностью В-системы иммунитета (CD 22+, сывороточных антител), – т.е. процессами, характерными для гипераллергических реакций.

Выводы: 1) Образование сывороточных противокандидозных Ig E иногда может быть связано с наличием *Candida* в нижних дыхательных путях больных ХНЗЛ.

2) Увеличение концентрации сывороточных противокандидозных Ig E чаще взаимосвязано с высоким уровнем алергизации организма (возможно, вследствие перекрестной алергизации или активизации В-лимфоцитов), что способствует ухудшению состояния больных.

3) Титр сывороточных противокандидозных Ig E коррелирует с процессами активного размножения пневмоцист в дыхательных путях больных ХНЗЛ.

Глава 5.

МИКОТОКСИКОЛОГИЯ. НОВЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ МИКОТОКСИКОЗОВ И ОТРАВЛЕНИЙ ГРИБАМИ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ КОНТАМИНАЦИИ ОХРАТОКСИНОМ А ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Аксёнов И.В., Эллер К.И., Тутьельян В.А.
ГУ НИИ питания РАМН
Москва

Охратоксин А – вторичный метаболит микроскопических плесневых грибов родов *Penicillium* (*P. verrucosum*) и *Aspergillus* (*A. ochraceus*), стоит в ряду приоритетных микотоксинов – контаминантов пищевых продуктов, и представляет высокую опасность для здоровья человека. Охратоксин А обладает выраженным нефротоксическим, канцерогенным, а также тератогенным и нейротоксическим действием. Охратоксин А встречается повсеместно в продуктах питания и с высокой частотой и в значительных концентрациях обнаруживается в зерновых продуктах, кофе, сухофруктах, специях, вине и фруктовых соках. Так, по результатам исследований, проведенных в странах ЕС, 55% проб продовольственного зерна контаминированы охратоксином А на уровне 0,00005 – 0,03 мг/кг, причем наибольший процент (50%) загрязненных проб обнаружен при анализе образцов ржи. При изучении образцов вина выявлено 59% проб, загрязненных охратоксином А на уровне 0,000003 – 0,016 мг/кг. 47,3% образцов кофе, по данным экспертов ЕС, контаминированы охратоксином А на уровне 0,00001 – 0,066 мг/кг. Особого внимания заслуживают данные о частом обнаружении данного микотоксина в моче, крови, а также материнском молоке у населения многих европейских стран, что свидетельствует о постоянном поступлении охратоксина А в организм человека. Основной вклад в величину поступления охратоксина А с продуктами питания вносят зерновые (50%), вино (13%), кофе (10%), специи (8%) и пиво (5%). Содержание охратоксина А в странах ЕС регламентируется на уровне 0,005 мг/кг в продовольственном сырье и 0,003 мг/кг в продуктах питания. Данные о загрязнении пищевых продуктов охратоксином А в РФ отсутствуют.

Нами была разработана методика идентификации и количественного определения охратоксина А в пищевых продуктах с использованием твердофазной экстракции на силикагеле и обращено-фазовой ВЭЖХ, пригодная для проведения мониторинга загрязнения продуктов питания этим микотоксином. Предел обнаружения для охратоксина А равен 0,00005 мг/кг. Степень извлечения из зерновых субстратов при содержании микотоксина на уровне 0,005 мг/кг составила 75-80 %.

С помощью разработанной методики было проведено выборочное исследование частоты и уровня загрязнения охратоксином А основных видов продовольственного зерна урожая 2004 года. Для этого было отобрано 46 проб продовольственного зерна (32 пробы пшеницы, 6 проб ржи, 8 проб ячменя) из различных регионов РФ.

В результате проведенного исследования установлено, что 45,7% изученных образцов продовольственного зерна были контаминированы охратоксином А на уровне 0,00005 – 0,005 мг/кг, что не превышает существующие за рубежом регламентируемые уровни содержания данного микотоксина (0,005 мг/кг). В частности 40,6% образцов пшеницы были загрязнены охратоксином А на уровне 0,00005-0,0003 мг/кг. Среди образцов ржи 50% проб содержали охратоксин А на уровне 0,00-0,02 – 0,001 мг/кг. При исследовании образцов ячменя выявлено 62,5% контаминированных охратоксином А проб, при этом уровень загрязнения составил 0,00005 – 0,005 мг/кг.

В результате выборочных исследований образцов кофе и вина установлена их контаминация охратоксином А на уровне 0,0005 – 0,0015 мг/кг.

Таким образом, полученные результаты выборочных исследований свидетельствуют о возможности широкого распространения охратоксина А в продуктах питания и в первую очередь в зерне продовольственного назначения, и о необходимости проведения дальнейших исследований уровня контаминации этим микотоксином продовольственного сырья и пищевых продуктов в целях оценки риска потребления охратоксина А с продуктами питания для здоровья населения РФ.

ФУЗАРИОЗ КОЛОСА – ЯВНАЯ И СКРЫТАЯ ОПАСНОСТЬ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПУТЬ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ

Бабаянц О.В., Бабаянц Л.Т.
Селекционно-генетический институт – Национальный центр
семеноведения и сортоизучения УААН
Одесса

В степной зоне Украины многолетние исследования фузариозных заболеваний зерновых колосовых культур показали значимость их для количества и качества конечного продукта: зерна. Эпифитотии фузариоза колоса озимой пшеницы по нашим наблюдениям приводили к 100% потере урожая (1988 г.), когда посевы приходилось сжигать на корню. На отдельных полях мы наблюдали потери 70-80% урожая (1991, 2002, 2004 гг.). Практически ежегодно локально фиксируются очаги фузариоза колоса с недоборами урожая от 15 до 30% (Бабаянц, 2003).

Микологический анализ возбудителей заболевания показал, что без исключения, во все годы исследований доминирующим в степи Украины является *Fusarium graminearum* Shwabe. В зависимости от погодных условий, складывающихся в весенне-осенний период основному виду сопутствуют и часто встречаются – во влажные прохладные годы

– *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, во влажные теплые – *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum.*, *F. poae*, в жаркие – *F. macroceras*. Детализация видового состава фузариев и изучения уровня их патогенности показывает, что *F. graminearum* – это основной и постоянный возбудитель фузариоза колоса и зерна.

Изучение штаммового разнообразия *F. graminearum* показало, что 86% всех выделенных имеют высокий уровень патогенности, 12% – средний и лишь 2% – непатогенные штаммы. Уровень патогенности фузариев повышался, когда наблюдались смешанные инфекции *F. graminearum* с *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum.*, *F. poae* или *F. macroceras*.

Начало заражения колоса фузариями во времени совпадает с периодом цветения пшеницы и при благоприятных условиях может продолжаться до полного формирования зерновки. При этом наиболее агрессивны *F. graminearum*, *F. macroceras*, *F. culmorum*, *F. poae*. Остальные виды «включаются» в разрушительную работу позже, после полного созревания хлебов, когда для них складываются благоприятные условия. Эти же виды, как показали исследования, выделяются высоким уровнем токсинообразующей способности. Все они являются продуцентами дезоксиниваленола, зearаленона, Т-2 и НТ-2 токсина. Уровень токсинообразования меняется в процессе вегетации растений и не всегда совпадает со степенью поражения.

В условиях искусственно создаваемой эпифитотии фузариоза колоса при поражённости зерна восприимчивого сорта Одесская полукарликовая на 80-100%, у устойчивых сортов она составляла от 0 до 5%, причем поражённость их колосовых чешуй достигала 15-25% на фоне 100% у восприимчивого сорта. После 1 месяца послеуборочного хранения зерна при н.у. (11% влажности) количество фузариозных зерен и интенсивность их поражения не изменялись. Повышение влажности до 18-20% привело к увеличению количества фузариозных зерен даже у устойчивых сортов и достигало 20-50%. Микологический анализ анатомических частей зерновки показал также, что у устойчивых сортов распространение фузариев не выходило за пределы оболочки. Эндосперм практически не разрушался, а зародыш поражен не был. Зерно восприимчивых сортов, имеющее при нормальных условиях хранения 18-27% поражения, в условиях повышенной влажности разрушалось полностью.

В решении проблемы получения экологически безопасной, не загрязненной микотоксинами зернопродукции важен интегрированный подход, в котором создание устойчивых сортов играет ведущую роль. Работа по созданию фузариозоустойчивых сортов ведется во многих странах, в том числе в Украине в селекционно-генетическом институте. Многолетнее изучение генофонда пшеницы позволило выделить относительно устойчивые к возбудителю фузариоза колоса сорта, линии, формы, происходящие из Южной Америки, Китая, Юго-Восточ-

ной Азии. Вместе с тем были обнаружены отдельные устойчивые сорта из европейских стран и Северной Америки. Однако была установлена сложность использования этого материала в качестве доноров фузариозоустойчивости при селекции озимой пшеницы в силу существенных недостатков по целому ряду основных признаков и свойств. В селекционно-генетическом институте в результате межвидовой гибридизации осуществлена интрогрессия в озимую мягкую пшеницу генов фузариозоустойчивости. Созданы линии, обладающие как минимум тремя доминантными высокоэффективными *Fhs*-генами. Они происходят от *Aegilops cylindrical* и не идентичны известным *Fhs*-генам (Бабаянц и др., 2002). Ценность линий заключается в том, что наряду с фузариозоустойчивостью они обладают высокой групповой устойчивостью к возбудителям большинства листостебельных заболеваний и головневых пшеницы (Бабаянц и др. 2001,). Селекционная работа показала, что линии являются хорошими донорами устойчивости к выше указанным патогенам. Ведется работа по созданию аналогов лучших сортов СГИ с групповой устойчивостью к фитопатогенам. Получены первые обнадеживающие результаты. Сорта проходят основные испытания.

ТОКСИЧНОСТЬ ГРИБОВ ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ ЯРОВОГО РАПСА

Бондарь Т.И., Кирик Н.Н.

*Национальный Аграрный Университет
Киев, Украина*

Согласно имеющимся в литературе сведениям общее количество видов грибов в мировой микрофлоре колеблется в пределах от 200 до 300 тыс. видов. Экологически потенциально опасными являются токсигенные виды и штаммы, которых насчитывается — от 100 до 150 видов.

Рядом исследователей выделено от 80 до 2000 микотоксинов, среди которых 47 высокотоксичных и 15 — с канцерогенными и мутагенными свойствами (афлатоксины, стеригматоцистин, лютеоскирин, исландицин, элайомицин, охратоксин А, патулин, зearаленон, диоксиниваленол, Т-2-токсин, диацетоксискирпенол, веррукарин А, глиотоксин, споридесмин, цитринин, фузаренон Х, циклопиазоновая, пеницилловая и коевая кислоты).

Наибольшую опасность для человека и животных представляют продукты питания и корма, загрязненные метаболитами грибов, относящихся к двум группам. Первая — так называемые складские грибы, к которым относятся представители родов *Aspergillus* и *Penicillium*. Это в основном грибы, не способные поражать вегетирующие растения и попадающие в

зерновые, грубые корма и продукты питания главным образом в период уборки, приготовления и хранения. Ко второй группе относятся грибы, поражающие растения в период их вегетации и способными в дальнейшем развиваться при хранении кормов и продуктов. Среди их наблюдаются виды родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Stachybotrys*, *Cladosporium*, *Verticillium*.

Из токсигенных микромицетов широким распространением характеризуются представители родов *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Mucor*. Повсеместное распространение, высокий процент токсигенных изолятов и широкий спектр продуцируемых ими микотоксинов, свидетельствуют о потенциальной опасности грибов рода *Fusarium*: токсигенные штаммы секции *Sporotrichiella* составляют от 63 до 91 % исследованных штаммов, секции *Discolor* — 58, *Elegans* — 33, *Martiella* — 25 %. Токсигенный потенциал грибов рода *Alternaria* значительно меньше — 20–30 % изолятов.

Токсические вещества, в зависимости от вида гриба, могут образоваться как в мицелии, спороносном аппарате и в спорах, так и в самом субстрате, в результате химических превращений, вызванных грибом. Эти вещества изучены весьма недостаточно. Подавляющее число микотоксинов являются экзотоксинами, т.е. выделяются в субстрат, на котором растет гриб, а не удерживаются в структуре последнего. Микотоксины могут оставаться в корме в течение длительного времени после гибели образовавшего их гриба.

Грибные токсины условно делят на 2 группы: микотоксины и фитотоксины. Из фитотоксинов, важных для фитопатологии, первыми идентифицировали фузариевую кислоту и её производные, пиколиновую кислоту и ликомаразмин. Позже фитотоксические свойства обнаружены и у некоторых микотоксинов. На сельскохозяйственных культурах широко распространены фузариозы. Их возбудителями является около 10 видов *Fusarium*. Весомую роль в развитии этих болезней играют и другие грибы: родов *Alternaria*, *Arthrinium*, *Helminthosporium*, *Chaetomium*, *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Verticillium*. Все они являются почвенными грибами.

Для рода *Fusarium* известно более 15 токсинов которые образуют 26 видов. Отмечено также образование микотоксинов и у некоторых видов выше упомянутых родов.

Токсины образуются при росте грибов на естественных субстратах и при культивировании в лабораторных условиях.

Билай В. И. испытывала действие токсических веществ из культур *Fusarium sporotrichioides* (Sherb.) Bilai, *F. poae* (Peck.) Bilai, *Dendrodochium toxicum* Bon., *Stachybotrys alternans* Bon. которые наносились на стебли и листья фасоли, подсолнечника, овса, томата, фуксии, клевера, картофеля хризантем и других 11 видов растений. Через 48 часов, как на молодых, так и более взрослых растениях, в местах нанесения экстрактов на листьях образовались четко очерченные пятна пораженной ткани,

потом наблюдалось скручивание, засыхание ее и заметное отставание растений в росте по сравнению с контрольными. На стеблях также образовались четко выраженные, буроватые, вдавленные, долго не заживающие пятна в виде ожогов. Особенно чувствительными к действию этих экстрактов оказались листья овса, клена американского, дикого винограда, сирени, подорожника.

Однако способность образовывать фитотоксины разными видами грибов, изучена ещё слабо. Совсем недавно коллектив японских исследователей впервые из *F. oxysporum* выделил и идентифицировал как фитотоксины, 5 кислот: п-гидроксибензойная, фенилуксусная, миндальная, о-гидроксифенилуксусная, п-гидроксифенилуксусная кислоты.

В наших исследованиях, при изучении корневых гнилей рапса, было отмечено, что растения пораженные на ранних стадиях развития почти всегда усыхали. В определенной степени этому могли способствовать токсины возбудителей заболевания: фузариевая кислота (грибы рода *Fusarium*), гельминтоспорул, лонгифолен и викторин (*Bipolaris sorokiniana*), альтернариол и альтернариевая кислота (виды *Alternaria*), и другие токсичные метаболиты (*Verticillium*, *Pythium* и др.). В фазу два-четыре настоящих листочков с корневой системы пораженных растений было выделено в чистую культуру более 120 штаммов грибов, принадлежащих к 14 родам. Для определения способности образовывать токсины нами было отобрано по несколько штаммов следующих видов: *Pythium ultimum* var. *ultimum* Trow., *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Alternaria tenuissima* (Fr.) Wiltsh., *Chaetomium terrestris* Corda, *Fusarium moniliforme* She Id., *F. moniliforme* var. *lactis* (Pir. et Rib.) Bilai comb. nova, *F. culmorum* (W. G. Sm.) Sacc., *F. gibbosum* App. et Wr. emend. Bilai, *F. gibbosum* var. *bullatum* (Sherb.) Bilai comb. nova, *F. sambucinum* Fuck., *F. sambucinum* var. *minus* Wr., *F. sambucinum* var. *trichoteciodes* (Wr.) Bilai comb. nova, *F. oxysporum* Schlecht. emend. Snyd. et Hans., *F. oxysporum* var. *ortoceras* (App. et Wr.) Bilai comb. nova., *F. semitectum* Berk. et Ravar., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc, *F. solani* var. *argillaceum* (Fr.) Bilai comb. nova.

Токсическое действие культуральных фильтратов этих грибов мы изучали по влиянию на прорастание семян, рост и развитие проростков. Для этого изоляты на протяжении 14 дней выращивали на жидкой картофельно-глюкозной среде. Отфильтрованной жидкостью увлажняли двухслойную фильтровальную бумагу на дне чашек Петри и раскладывали семена. В качестве контроля использовали стерильную воду. Учеты энергии прорастания и лабораторной всхожести проводили соответственно на 3-й и 7-й день, влияние на развитие растений — на 10-й день.

Самая низкая энергия прорастания была в варианте с грибами *Pythium ultimum* var. *ultimum* — 2%, у *F. oxysporum* — 22%, *F. moniliforme* — 30% и *F. moniliforme* var. *lactis* — 38%. Во всех остальных вариантах этот показатель не превышал 66% (в контроле 88%).

Лабораторная всхожесть в контроле составила 99%. В варианте с *Pythium ultimum* var. *ultimum* – 74%, в других вариантах – в пределах 80-92%, кроме *Chaetomium terrestris* – 98% и *F. gibbosum* var. *bullatum* – 96%.

Было отмечено токсическое действие некоторых фильтратов, которое проявлялось в задержке роста главного корня растений, а нередко и в отмирании его кончика. В контроле такие растения отсутствовали. Совсем не развивались корешки в варианте с *F. culmorum* (штамм №2 – 100%, другие штаммы этого вида 25-36%). Количество угнетённых растений в вариантах с грибами *B. sorokiniana*, *F. moniliforme* var. *lactis*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum* были в пределах 14,5-9,5%, других видов от 0 до 4%.

Длина главного корня растений в контроле составила 7 см, в вариантах с *F. moniliforme* – 7,5, а в вариантах с *F. culmorum* (штамм №2) и *F. sambucinum* – только 1 и 2 см. Во всех других вариантах этот показатель колебался в пределах 4,5-6,5 см.

Токсические вещества выделяемые грибами снижали массу растений до 0,018 г в варианте с *F. culmorum* (штамм №2), и до 0,020 – 0,028 г в вариантах с *B. sorokiniana* и *Ch. terrestris*, соответственно. В контроле масса растений была более высокой – 0,049 г, в других вариантах колебалась от 0,030 до 0,045 г.

Приведенные выше результаты изучения штаммов грибов выделенных из корневой системы ярового рапса свидетельствуют, что их культуральные фильтраты содержат токсины, которые снижают всхожесть семян, угнетают развитие растений, задерживают рост корней или вызывают отмирание кончиков корешков. Отмечена различная фитотоксичность разных штаммов одного и того же вида.

ГРИБНЫЕ ОТРАВЛЕНИЯ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ УКРАИНЫ В ПОСЛЕДНЕЕ ДЕСЯТИЛЕТИЕ

Дудка И.А.

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины
Киев, Украина

Украина принадлежит к числу стран, в которых дикорастущие грибы традиционно используются в пищу населением. Химический состав плодовых тел съедобных грибов свидетельствует о том, что они являются полноценным продуктом питания, обеспечивающим жизнедеятельность организма человека. Сухое вещество плодовых тел грибов богато азотистыми соединениями, в особенности белками. Именно поэтому дикорастущие грибы называют “лесным мясом”. Белковые вещества грибов относятся к фосфорсодержащим глюкопротеидам, они состав-

ляют нередко 50-80% (в среднем 70%) всего количества азотистых соединений. Остальные 30% приходятся на промежуточные продукты белкового обмена, к которым относятся аммонийный азот, свободные аминокислоты, органические основания, фунгин (мицетин), иногда мочевины и пуриновые соединения. В частности, грибные белки содержат все аминокислоты, в том числе и незаменимые, количество которых от общей суммы аминокислот составляет 42-49%. В плодовых телах съедобных грибов обнаружены триптофан, аргинин, тирозин, лейцин, гистидин, цистин, аланин, лизин и др. Количественное содержание свободных аминокислот в тканях плодовых тел съедобных грибов невелико, обычно оно варьирует от 0,33 до 2,61% (Дудка, Вассер, 1987). Тем не менее, оценивая пищевую ценность грибов, следует учитывать значение не только грибного белка, но и других белковых веществ, в первую очередь свободных аминокислот. Именно они в сочетании с экстрактивными и специфическими ароматическими веществами обуславливают стимуляцию секреторной деятельности желудочных желез.

Значение грибов как продукта питания не исчерпывается тем, что их плодовые тела содержат значительное количество белка и других белковых веществ. Грибы характеризуются также наличием углеводов, липидов, витаминов, пигментов, минеральных веществ, в том числе микроэлементов. Именно эти вещества, в особенности углеводы, в последние десятилетия привлекли внимание к съедобным грибам как к источнику получения новых фармакологических препаратов. Наряду с моносахаридами, в плодовых телах грибов обнаружены полисахариды (гликоген, микоинулин, микодекстрин и др.). Эти биологически активные полисахариды имеют различный химический состав, включающий обычно высокомолекулярные бета-глюканы. Грибные полисахаридные препараты из съедобных и других грибов обладают противоопухолевым, антивирусным, иммуномодулирующим, радиопротекторным и другими спектрами действия, прошли принятую в фармакологии процедуру апробации и доказали свою перспективность при клиническом использовании (Бухало, Бисько, Соломко и др., 2004).

В Украине количество съедобных грибов достигает 500 видов, но реально населением используется только 15-20 из них. Многолетний анализ данных заготовительных организаций свидетельствует, что чаще всего проводится сбор и переработка 10-15 видов, в частности таких, как *Boletus edulis*, *B. luridus*, *Suillus luteus*, *Leccinum scabrum*, *L. aurantiacum*, *Armillariella mellea*, *Cantharellus cibarius* и др. В последнее время разрешена заготовка 50 видов грибов, среди которых разные виды рядовок (*Tricholoma portentosum*, *T. flavovirens*, *Lepista nuda*), сыроежек (*Russula flava*, *R. obscura*, *R. foetens*), *гъзудей* (*Lactarius piperatus*, *L. rufus*) и др. Наряду со съедобными грибами в Украине встречается около 80 видов потенциально опасных для здоровья ядовитых грибов, из которых 20-25 видов являются особо опасными для жизни человека. Ядовитые грибы относятся к базидиомицетам семейств *Amanitaceae*,

Agaricaceae, Tricholomataceae, Cortinariaceae, Strophariaceae, Russulaceae, Boletaceae, Paxillaceae и др. Среди токсинов, которые продуцируют эти грибы, следует отметить такие: мускарин, фаллотоксины, аматоксины, виротоксины (Вассер, 1992). До 95% всех грибных отравлений, которые регистрируются в Украине, вызывает бледная поганка (*Amanita phalloides*), плодовые тела которой содержат значительное количество фалло- и аматоксинов. Мускарин является характерным для плодовых тел *Amanita muscaria*, а наличие виротоксинов свойственно плодовым телам *Amanita verna* и *A. virosa*. По характеру действия на организм человека ядовитые грибы разделяют на гастроэнтеротропные, нейротропные и гепатонепротропные. Грибы первой группы (*Agaricus xanthodermus, Tricholoma pardinum, Entoloma lividum*) вызывают легкие отравления, в основном кишечные и желудочные расстройства, симптомы которых проявляются через 1-2 часа после употребления грибов. Грибы, которые имеют нейротропное действие на организм человека (*Inocybe patouillardii, Amanita muscaria, A. pantherina*), воздействуют на нервные центры, вызывая через 0,5-4 часа тошноту, головокружение, потерю сознания, галлюцинации. Потерпевшие, которые употребляли грибы этих двух групп, при условии своевременной медицинской помощи, довольно быстро выздоравливали. Наиболее опасными являются грибы третьей группы (*Amanita phalloides, A. verna, A. virosa, Cortinarius orellanus, Lepiota brunneoincarnata, Hypholoma fasciculare, H. sublateritium*). Признаки отравления становятся заметными лишь после того, как яды достигают головного мозга, нарушают регуляцию функции отдельных органов, вызывают органические повреждения печени и почек. Смерть от токсинов *A. phalloides* наступает на 2-5 сутки, *C. orellanus* – на 2-3-тью неделю.

Традиционная привычка населения Украины использовать дары леса – ягоды, грибы, лекарственные и другие полезные растения – сохраняется до настоящего времени. Проведенные в разных регионах страны опросы показали, что 57% респондентов систематически используют для пополнения пищевого рациона свежие, сушеные и консервированные дикорастущие грибы. При этом не принимаются во внимание те изменения, которые произошли в генетической памяти людей. Многие из них теперь проживают в больших городах, давно оторвались от природы, утратили навыки сбора грибов, умение различать съедобные и ядовитые грибы. Между тем, в специальной и популярной литературе о грибах подчеркивается тот факт, что некоторые ядовитые грибы по своему внешнему виду напоминают съедобные, так называемые грибы-двойники (Зерова, 1970; Дудка, Вассер, 1987; Лессо, 2003). Бледная поганка, а вместе с нею и два других вида смертельно ядовитых мухоморов – *Amanita virosa* и *A. verna* – похожи на молодые плодовые тела шампиньонов, путают их и с некоторыми сыроежками, и с зеленушкой. *Cortinarius orellanus* многим несведущим сборщикам кажется похожим на *Tricholoma robustum*, которая является хорошим съедобным

грибом. Ложные опята – серно-желтый (*Hypholoma fasciculare*) и кирпично-красный (*H. sublateritium*) – принимают за настоящие съедобные опенки.

Утрата навыков сбора дикорастущих грибов у населения городов и степной зоны Украины, ухудшение общей экологической ситуации (загрязнение тяжелыми металлами, пестицидами, а на части территории страны – радионуклидами) приводят к значительному увеличению количества отравлений в грибные годы. Мониторинг за числом грибных отравлений, проведенный в последнее десятилетие (1994 – 2004 гг.), показал, что обычно в течение года регистрируется не более 1000 случаев за год. Наименьшее количество случаев отравления грибами (51) пришлось на 1994 г. Пик грибных отравлений отмечен в 1996 г., когда было зарегистрировано 2861 отравление, в том числе 731 – у детей. 166 случаев (из них 61 у детей) имели летальный исход. Максимальное количество отравлений грибами в 1996 г. пришлось на октябрь (1434 человека). В сентябре было отмечено отравление у 881, а от начала года до сентября – у 395 человек. Распределение количества грибных отравлений по областям Украины свидетельствует, что в 1996 г. больше всего пострадало от этого явления население южных областей, расположенных в степной зоне: Запорожская (315), Луганская (252), Херсонская (234), Донецкая (178), Кировоградская (165), Днепропетровская (154). Значительное количество отравлений грибами в 1996 г. было отмечено также в АР Крым (258), на территории которого, наряду со степями, значительные площади занимают горные леса. В 1996 г. почти 70% всех грибных отравлений и 80% смертельных случаев от них пришлось на области степной зоны Украины. При этом наибольшее количество смертельных исходов от грибных отравлений было зарегистрировано в Луганской (36), Херсонской (15), Днепропетровской (12) областях и АР Крым (11), а детей – в Луганской области (13) и АР Крым (8). Существующий в Украине “Временный классификатор чрезвычайных ситуаций” (дополнение к поручению Кабинета Министров от 7.09.1996 г. №17803/97) указывает, что чрезвычайной является ситуация, когда при отравлении людей (код 30201) в результате употребления пищевых продуктов наблюдаются смертельные случаи у 10 или более пострадавших. В соответствии с этой классификацией отравления грибами в 1996 г. носили характер чрезвычайной ситуации.

С микологической точки зрения такое доминирование случаев грибных отравлений, в том числе со смертельным исходом, в областях степной зоны страны, возможно, объясняется тем, что в степи редко встречаются представители семейства *Boletaceae*, к которому относятся ценные съедобные виды грибов с трубчатым гименофором. Видовой состав макромицетов в этой зоне представлен преимущественно грибами семейств *Agaricaceae, Tricholomataceae, Russulaceae, Amanitaceae* с пластинчатым гименофором. К последним, в частности, относятся самые опасные ядовитые грибы. К тому же, анализ данных, полученных

при опросе, использующих дикорастущие грибы респондентов из областей степной зоны, показал, что 85% из них собирали грибы в лесополосах, которые характеризуются особой загрязненностью тяжелыми металлами, пестицидами, выбросами автотранспорта.

В течение ряда последующих лет ситуация с грибными отравлениями населения Украины не достигала уровня чрезвычайной, хотя в отдельные годы (1999, 2001, 2002) в ряде областей (Луганская, Сумская, Харьковская, Николаевская), начиная с июля, было зарегистрировано значительное количество отравлений свежесобранными грибами. Особенно неблагоприятная ситуация с грибными отравлениями сложилась в первую половину 2004 г. С начала года и до 6 сентября число отравлений (392) практически достигло уровня 1996 г. (395). При этом наибольшее количество пострадавших от употребления грибов отмечено преимущественно в областях лесной и лесостепной зон Украины, а именно в Винницкой (45), Ивано-Франковской (34), Львовской (32), Киевской (28), Кировоградской (24), Житомирской (15). Достаточно высоким было число пострадавших от грибных отравлений за первую половину 2004 г. и в некоторых областях степной зоны. Так, 30 случаев было зарегистрировано в Одесской, 23 – в Донецкой, 20 – в Днепропетровской, меньше, соответственно 15 и 10 – в Луганской и Запорожской областях. Анализ ответов респондентов из первой группы областей на вопрос о месте сбора грибов показал, что 92% опрошенных собирали их в лесах. Несмотря на значительное число грибных отравлений в первую половину 2004 г. и на благоприятный для развития грибов метеорологический прогноз на сентябрь-октябрь 2004 г. ситуация не достигла уровня чрезвычайной, так как вопреки прогнозу осень в Украине была сухой и недостаток влаги сдерживал массовое появление осенней волны грибов.

Дальнейшее развитие системы миколого-гигиенического мониторинга грибных отравлений будет способствовать сокращению их числа в Украине.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕТОКСИЦИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ МИКРОМИЦЕТОВ НА МИКОТОКСИНЫ

Иванов А.В., Матросова Л.Е.,

Сергейчев А.И., Степанов В.И., Трмасов М.Я.

*ФГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт
Казань*

Среди экотоксикантов природного происхождения наибольшую опасность представляют микотоксины, обладающие высокой токсичностью, мутагенными, тератогенными, канцерогенными и иммуно-

супрессивными свойствами. Микотоксины-вторичные метаболиты микроскопических грибов, широко распространенные в природе соединения. При попадании с контаминированном микроскопическими грибами кормом возникают заболевания микотоксикозы. Наибольшую опасность представляют Т-2 токсин, афлатоксин, охратоксин, зеараленон, фумонизины. Микотоксины отличаются высокой стабильностью и сохраняют свою биологическую активность в контаминированном субстрате длительное время. В последнее время актуальность приобретает изыскание для детоксикации микотоксинов биологических средств. Известно, что микроскопические грибы и микроорганизмы способны трансформировать высокотоксичные соединения микотоксинов до менее токсичных метаболитов. Так, например, в отношении Т-2 токсина эффективны грибы рода *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, дрожжи, штаммы микроорганизмов *Laktobacillus* и *Propionibacterium*, *Curtobacterium* (Nakayama K. et al., 1980; Ueno Y. et al., 1983; Štyriak I. et al., 1998; Кобзиста О.П. и др., 2001). Способностью разрушать зеараленон обладают микроорганизмы видов *Rhodococcus* и *Nocardia* (Duvick J., 1999). В отношении афлатоксинов эффективны грибы рода *Aspergillus*, дрожжи, бактерии *Laktobacillus* и *Propionibacterium* и т.д. (Борисенко А.Е., Мирская Е.Е., Борисенко Е.Г., 1990; Мучкаева Н.А. 1991; Cotty Peter C.J. 1994; Cole Richard J., Dorner Joe W., Blankenship Paue D., 1994; Ahokas J., 1998).

Учитывая высокую устойчивость и опасность, которую представляют микотоксины для животных и человека, в лаборатории контроля и индикации природных экотоксикантов объектов ветнадзора ФГНУ ВНИВИ (г. Казань) был проведен поиск штаммов для детоксикации Т-2 токсина. В результате скрининга были отобраны 2 наиболее эффективных штаммов почвенных микромицетов: F-96 и K-96. В лабораторных условиях изучены морфологические, культурально-биохимические и физиологические их свойства. Установлено, что выделенные штаммы обладают выраженной сахаролитической, протеолитической, каталазной, уреазной активностью. На лабораторных животных (белые мыши, крысы, кролики, морские свинки) изучена их безвредность.

Для определения детоксицирующего действия в отношении Т-2 токсина были проведены серии опытов *in vitro*. С этой целью в ряд пробирок с содержанием по 10 мл физиологического раствора (контрольные) и по 10 мл взвеси микромицетов F-96 и K-96 в физиологическом растворе (опытные) вносили ацетоновый раствор Т-2 токсина. Для приготовления раствора Т-2 токсина использовали кристаллический токсин в количестве 5 мг, растворенный в 50 мл ацетона (содержание Т-2 токсина в 1 мкл составило 1 мкг). Как в контрольные, так и опытные пробирки вносили по 50 мкл ацетонового раствора, содержащего соответственно 50 мкг Т-2 токсина. Через 24, 48, 72 час проводили качественное и количественное определение Т-2 токсина методом тонкослойной хроматографии с биоавтографическим завершением, ис-

пользуя культуру *Candida pseudotropicalis* шт. ПК-44 м, любезно предоставленный А.Н. Котиком, хроматомассспектрометрией.

В результате проведенных исследований установлено, что штаммы F-96 и K-96 способны разрушать *in vitro* 52% и 40% Т-2 токсина соответственно. Детоксицирующее действие данных микромицетов вероятно объясняется синтезом фермента эпоксидазы, разрушающее эпоксидальное кольцо Т-2 токсина. Полученные *in vitro* данные подтверждены в производственных опытах на субстрате органического происхождения.

МЕХАНИЗМЫ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ МИКОТОКСИНА ФУМОНИЗИНА В1

Иванченко О.Б.¹, Мартынова Е.А.²

¹ ГОУ ВПО Санкт-Петербургский Государственный
Университет низкотемпературных и пищевых технологий
Санкт-Петербург

² ГУ НИИ питания РАМН
Москва

Фумонизины — это вторичные метаболиты микроскопических плесневых грибов рода *Fusarium* и *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*. В настоящее время открыто около 20 различных фумонизинов, которые относятся к группам В, С, А и Р. Фумонизин В1 обладает канцерогенными свойствами для человека и животных. Другой потенциальной мишенью фумонизина является геномная ДНК.

Многочисленные экзогенные и эндогенные факторы приводят к повреждению ДНК. Для сохранения стабильности генома в клетке существует многоуровневая система репарации ДНК. Повреждение ДНК может происходить несколькими способами, в том числе при потере пар оснований, единичных нуклеотидов, а также за счет ошибочного встраивания неспаренных нуклеотидов. Для каждого механизма существует определенный набор ферментов репарации, функцией которых является определение характера повреждения ДНК и механизма её восстановления. Например, ДНК гликозилазы действуют как первая ступень в репарации пар оснований, UvrABC эксцизунклеазы входят в состав репарационного комплекса при восстановлении нуклеотидов, тогда как функцией ДНК фотолиаз является непосредственное исправление повреждений.

Данные по генотоксичности фумонизина В1 носят противоречивый характер. Большинство авторов, исследовавших мутагенные свойства фумонизина на тестовых штаммах *Salmonella typhimurium*, как с метаболической активацией, так и без неё, не выявили мутагенной активнос-

ти фумонизина В1. По нашим данным, полученным с использованием тестового штамма *Salmonella typhimurium* TA 100, фумонизин В1 в диапазоне концентраций от 10⁻⁶М до 10⁻³М не проявил мутагенной активности, так как число колоний — ревертантов в опыте не превысило контроль более, чем в 2,5 раза. Однако следует подчеркнуть, что отрицательный результат в этих исследованиях не говорит о полном отсутствии мутагенной активности фумонизина. Дело в том, что данный тест характеризует только две мишени действия исследуемого вещества.

Метод SOS-Chromotest позволяет оценить влияние тестируемого вещества на другие мишени в клетке, отличные от мишеней теста с использованием *Salmonella typhimurium*. SOS-ответ индуцируется генотоксичным агентом в культуре специфического штамма клеток *E. coli* PQ37, которые содержат гибридный ген *sfIA::lacZ*. Этот штамм микроорганизмов постоянно синтезирует щелочную фосфатазу, которая используется для коррекции токсических изменений в клетках. Экспрессия структурного гена бета-галактозидазы находится под контролем гена *sfIA*, одного из генов SOS регулона. Таким образом, индукция бета-галактозидазной активности отражает экспрессию гена *sfIA* и индукцию SOS системы. По нашим данным фумонизины В1 и В3 не обладают генотоксической активностью в тесте SOS-Chromotest, тогда как фумонизин В2 обладает достоверной генотоксической активностью.

Другим методом оценки генотоксичности является ДНК-повреждающий тест. Принцип метода заключается в селективном ингибировании роста мутантных штаммов по сравнению с диким типом. В настоящее время существуют два типа методов определения ДНК-повреждающей активности химических соединений на бактериях — чашечный и суспензионный. В данной работе использовался суспензионный метод, в котором индикаторные бактерии инкубируют в жидкой среде, содержащей исследуемое вещество. Для определения генотоксичности фумонизина В1 использовали тестовые штаммы *Escherichia coli*: WP — дикий тип, *trp*- и три мутантных штамма, дефектные по различным путям репарации: Pol A- — штамм, с нарушенным синтезом ДНК-полимеразы I, *trp*-; Rec A- — с нарушенной пострепликативной репарацией и общей рекомбинацией, *trp*-; Uvr A- — с нарушенной эксцизионной репарацией, *trp*-. Влияние фумонизина В1 на мутантные штаммы оценивали по проценту выживаемости. Наиболее высокая выживаемость обнаружена у штамма Pol A-, у которого нарушена работа ДНК-полимеразы I, исправляющей повреждения во время синтеза ДНК. Наибольший ДНК-повреждающий эффект под действием фумонизина зарегистрирован на штамме Uvr A-, у которого дефектна эксцизионная репарация. На этом штамме фумонизин проявляет сильные ДНК-повреждающие свойства. Таким образом, фумонизин В1 вызывает изменения в ДНК, для исправления которых необходимо полноценное функционирование экс-

цизионной репарации. В ряду исследуемых концентраций наибольший эффект показан для концентрации фузонизина 10-5 М.

Для дальнейшего анализа влияния фузонизина В1 на геном оценивали изменение устойчивости клеток *E. coli* к антибиотикам под действием фузонизина. Изменение чувствительности клеток к антибиотикам является показателем геном-повреждающей активности. В настоящее время известны такие механизмы резистентности микроорганизмов к действию антибактериальных средств, как мутации в геноме, наличие плазмид, рибосомальное метилирование, экспрессия генов устойчивости к лекарственным веществам (MDR) и другие. Определено несколько генов, экспрессия которых определяет тот или иной механизм устойчивости, в частности, ген *erm(34)* кодирует рибосомальное метилирование макролидов.

В работе исследовали следующие антибиотики: тетрациклин, доксициклин, левомицетин и карбомицин. Карбомицин (магнамицин) активен в отношении Gr+ бактерий. Левомицетин взаимодействует с 50S субъединицей рибосомы, в результате чего происходит ингибирование активности пептидилтрансферазы, ответственной за образование пептидных связей. Тетрациклин ингибирует реакцию ацетилирования, опосредующую прикрепление транспортной РНК. Доксициклин является полусинтетическим препаратом тетрациклинового ряда, механизм действия которого связан с нарушением образования белковой цепи и её преждевременной диссоциацией.

Наиболее значимые изменения в чувствительности клеток наблюдаются в отношении антибиотика доксициклина после 3 часов инкубации с фузонизином В1 в концентрации 10-5 М. В концентрации 10-6 М влияние фузонизина на клетки *E. coli* минимальное. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами по изучению токсических свойств фузонизина В1, когда концентрация 10-5М оказалась максимально токсичной в ряду исследуемых концентраций (10-3 10-6). Карбомицин не влияет на рост *E. coli*, ответ клеток микроорганизмов на действие данного антибиотика не изменяется в случае обработки их фузонизином в исследуемом диапазоне концентраций. Обработка клеток *E. coli* фузонизином в течение 3 и 24 часов практически не влияет на изменение чувствительности к левомицетину и тетрациклину.

Фузонизин имеет много мишеней действия в клетке, вследствие чего трудно определить конкретный механизм его действия. Полученные данные о влиянии фузонизина В1 на геном частично можно объяснить нарушением синтеза сфинголипидов и накоплением в клетке сфинганина и сфингозина. Методом флуоресцентных зондов и тепловой денатурацией достоверно установлено, что сфингозин наиболее активно по сравнению с другими продуктами сфингомиелинового цикла взаимодействует с ДНК. Имеются данные о влиянии сфингозина на структуру ДНК за счет формирования ионной связи между аминокислотной группой сфингозина и атомом кислорода фосфатной группы молекулы

ДНК. Изменение структуры ДНК в результате ее взаимодействия со сфингозином приводит к изменению ее субстратной специфичности. Сфингозин является ингибитором ДНК-праймазы *in vitro* и *in vivo*. Он также препятствует образованию мутаций типа сдвига рамки считывания, вызываемых интеркалирующим антибиотиком карминоцицином. Полученные результаты дают основание предположить, что сфингозин препятствует интеркаляции антибиотика в ДНК. Подобным образом сфингозин может влиять на ДНК-связывающие свойства ряда регуляторных белков, включая транскрипционные факторы и топоизомеразы.

Выводы:

1. Фузонизин В1 обладает ДНК-повреждающим эффектом на тестовых штаммах *E. coli*. Для исправления повреждений, возникающих под действием фузонизина, необходимо полноценное функционирование эксцизионной репарации.
2. Фузонизин В1 изменяет чувствительность клеток *E. coli* к антибиотикам доксициклину. Максимально эффективная концентрация фузонизина 10-5М. Карбомицин не влияет на рост *E. coli* и ответ клетки на действие данного антибиотика не изменяется в присутствии фузонизина. Обработка клеток *E. coli* фузонизином В1 не влияет на изменение чувствительности к левомицетину и тетрациклину.

Одним из механизмов генотоксического действия фузонизина В1 является ингибирование церамидсинтазы и накопление в клетке сфингозина, обладающего геномодифицирующими свойствами.

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ МАКРОЦИКЛИЧЕСКИХ ТРИХОТЕЦЕНОВ НА ДРОЖЖИ И ЗЕЛЕННЫЕ ВОДОРОСЛИ

Кобзистая О.П.
Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного
НАН Украины
Киев, Украина

К особо опасным контаминантам пищевых продуктов и кормов, встречающимся в естественных условиях, относятся микотоксины – вторичные метаболиты микроскопических грибов. Микотоксины часто присутствуют в кормах и пищевых продуктах как смесь метаболитов вследствие контаминации этих субстратов различными грибами. К тому же, токсинпродуцирующие грибы могут образовывать классы родственных по химической структуре микотоксинов.

С этой точки зрения, действие комбинированных микотоксинов представляет важную новую область исследований, так как комбинации микотоксинов оказывают значительное негативное влияние на биологические объекты. Изучение действия комбинаций микотоксинов на тест-объектах указывает на необходимость пересмотра регламентированных допустимых концентраций некоторых токсинов.

Исходя из вышеизложенного, нашей задачей было изучение различных вариантов комбинированного действия компонентов макроциклических трихотеценов *Dendroochium toxicum*, таких как веррукарин А, веррукарин J, роридин А, роридин Е и роридин Н.

В качестве тест-культур были использованы ранее отобранные штаммы дрожжей *Candida kefir* 899, *C. kefir* 724, *C. kefir* 725, *Pichia membranaefaciens* 473, а также штаммы зеленых водорослей *Chlorella vulgaris* 327, *C. vulgaris* 189, *C. kessleri* 200. В опытах исследовали влияние, как отдельных микотоксинов, так и их комбинаций на тест-культуры. Концентрация микотоксинов во всех вариантах составляла 1 мкг/диск.

Результаты исследований показали, что совместное действие веррукарина А и роридина А остается на уровне активности одного микотоксина относительно как дрожжевых, так и водорослевых тест-систем. Исключение составило комбинированное действие этих микотоксинов на *C. kessleri* 200, в данном случае оно носит антагонистический характер по отношению друг к другу, что проявляется в уменьшении диаметра зоны задержки роста. Аналогичные данные были получены также для комбинаций микотоксинов: веррукарин А + веррукарин J и веррукарин А + роридин Н. Однако если исходить из активности веррукарина J, то следует отметить, что его совместное действие с веррукаринном А имеет как признаки синергизма (в отношении *C. kefir* 899), так и признаки антагонистического действия (в отношении *C. kessleri* 200).

Более сложная комбинация (рооридин А + роридин Е + роридин Н) также характеризовалась тем или иным взаимодействием, в зависимости от исследуемой тест-системы. Например, относительно *C. kefir* 899 и 725, а также *C. vulgaris* 327 проявлялось синергическое действие, в то время как относительно *C. vulgaris* 189 – антагонистическое.

Кооперативное взаимодействие всего изученного комплекса (веррукарин А + веррукарин J + роридин А + роридин Е + роридин Н) относительно тест-систем, за исключением *C. kessleri* 200, проявляло признаки выраженного синергизма.

Как показывает опыт, в большинстве случаев тяжело понять и предвидеть реальную токсичность макроциклических трихотеценов в опытах *in vitro*. Характер взаимодействия этого комплекса в естественных условиях выглядит намного сложнее, о чем свидетельствуют те проявления патологии, которые наблюдаются при дендродохио- и стахиботриотоксикозе.

Поскольку, изучение токсического действия макроциклических трихотеценов, как и других микотоксинов, относилось в основном к

индивидуальным компонентам, в будущем внимание ученых должно быть сосредоточено на изучении именно комбинированного взаимодействия микотоксинов.

ЯДОВИТЫЕ ГРИБЫ ЗАПАДНОЙ ЧАСТИ ЦЕНТРАЛЬНОГО КАВКАЗА

Крапивина Е.А., Шхагапсоев С.Х.
Кабардино-Балкарский государственный университет
Нальчик

Планомерное исследование грибов-макромицетов региона начато нами с 1999 года и продолжается до настоящего времени. Учитывая, что многие из них являются ценным пищевым продуктом, важно определение видового состава съедобных и ядовитых грибов с целью пропаганды среди населения малоизвестных съедобных видов и уменьшения «рекреационного пресса» на грибы, традиционно собираемые населением.

Грибы традиционно принято разделять на съедобные, не съедобные и ядовитые. Несмотря на то, что грибы, являются ценным пищевым продуктом, в них содержится большое количество клетчатки и хитина, который плохо переваривается, а потому рекомендуются для употребления людям со здоровым желудочно-кишечным трактом.

Грибы могут вызвать отравления по ряду причин. Во-первых: они скоропортящийся продукт и может вызвать легкие пищевые отравления при неправильном сборе (переросшие, старые), транспортировки и хранения.

Во-вторых: плодовые тела и мицелий макромицетов, обитающих в экологически загрязненных условиях, аккумулируют значительное количество тяжелых металлов и продуктов неполного сгорания топлива, и могут вызвать отравления различной степени.

В третьих: кроме этого, грибы являются причиной отравления в результате использования в пищу ядовитых видов собранных по незнанию или вследствие большого сходства ядовитых грибов со съедобными.

Поэтому выявление видового состава ядовитых грибов является первостепенной задачей микологических исследований для территории всей России, и в том числе для Центрального Кавказа. Для изучаемого региона выявлены наиболее опасные виды макромицетов. Грибами с резко выраженным плазматоксическим, гемолитическим и гепатотропным действием являются представители рода *Amanita*: *Amanita aspera* (Fr.) Hooker, *A. citrina* (Schaeff.) Pers. (= *A. mappa* (Lasch) Quel, *A. muscaria* (L.: Fr.) Pers., *A. pantherina* (D. S.:Fr.) Krombh., *A. phalloides* (Vaill: Fr.)

Link, *A. rubescens* (Pers.: Fr.) S. F. Gray, *A. porphyria* (Alb.: Schw.: Fr.) Mlady, *A. virosa* (Fr.) Bertillon. Из перечисленных видов этого рода самой ядовитой является бледная поганка (*Amanita phalloides*) – содержащая около 10 ядовитых соединений поражающих нервную, пищеварительную, кроветворные системы. Гемолитический эффект яда бледной поганки равносителен яду гюрзы. Смертельной дозой является 0,03 г яда, меньше половины плодового тела, причем отсутствует противоядие. Из семейства Cortinariaceae наиболее опасны виды рода *Inocybe*, почти все они ядовиты и содержат токсин мускарин, концентрация которого в грибах этого рода в 10 раз больше, чем в мухоморовых (*Amanitaceae*). Из этого рода в Кабардино-Балкарии встречается 3 вида.

Наиболее ядовита и опасна для жизни *Inocybe patouillardii*.

Всего выявлено 27 видов ядовитых грибов из 12 родов и 7 семейств: *Amanita aspera* (Fr.) Hooker, *A. citrina* (Schaeff.) Pers. (= *A. mappa* (Lasch) Quel, *A. muscaria* (L.:Fr.) Pers., *A. pantherina* (D. S.:Fr.) Krombh., *A. phalloides* (Vaill.: Fr.) Link, *A. rubescens* (Pers.:Fr.) S. F. Gray, *A. porphyria* (Alb.: Schw.: Fr.) Mlady, *A. virosa* (Fr.) Bertillon, *Lepiota aspera* (Pers.: Hofm.: Fr.) Quel, *L. cristata* (Bull.) Quel., *Entoloma rhodopolium* (Fr.) Kumm. f. *nidorosum*, *Hygrocybe conica* (Scop.: Fr.) Kumm., *H. olivaceoalbus* (Fr.: Fr.) Fr., *H. pudorinus*(Fr.) Fr., *Hypholoma fasciculare* (Huds.: Fr.) Kumm., *H. sublateritium* (Fr.) Quel (= *Nemotoioma sublateritium* (Fr.) Karst.), *Clitocybe alba* (Bat.) Sing. (= *C. cerussata* (Fr.) Gill), *Mycena alcalina* (Fr.) Kumm, *M. inclinata* (Fr.) Quel, *Mycena pura* (Pers.:Fr.) Kumm., *M. vulgaris* (Pers.:Fr.) Kumm., *M. rosella* (Fr.) Kumm., *Tricholoma sulphureum* (Bull.: Fr.) Kumm., *Paxillus involutus* (Batsch.: Fr.) Fr., *Inocybe geophylla* (Sow.:Fr) Kumm. var. *geophylla*, *I. erubescens* Blytt: Rostrup. (= *I. patouillardii* Bres.), *I. rimosa* (Fr.) Kumm.

В последнее время с целью предупреждения отравлений грибами проводится широкая разъяснительная работа среди населения с использованием средств массовой информации. Проблема отравления дикорастущими видами грибов остается актуальной на сегодняшний день.

Необходимы совместные усилия специалистов – врачей, микологов, а также активная поддержка муниципальных и властных структур. Создание регионального микологического центра с участием специалистов КБГУ и токсикологов санэпиднадзора, в обязанности которых бы входило оказание консультационных услуг населению по определению видовой принадлежности (идентификации) грибов, их токсичности, пропаганде знаний о грибах, обучение методам культивирования. Способствовать активной пропаганде среди населения видов не съедобных и ядовитых грибов, что позволит не только сохранить жизнь и здоровье людей, но и способствовать увеличению грибных блюд в рационе.

ИЗУЧЕНИЕ МИКОФЛОРЫ ЗЕРНА КУКУРУЗЫ И ПРОДУКТОВ ЕЕ ПЕРЕРАБОТКИ

Львова Л.С., Кизленко О.И., Седова И.Б., Захарова Л.П.
ГНУ ВНИИЗ РАСХН
ГУ НИИ питания РАМН
Москва

Наибольшее распространение в зерне получили во всем мире микотоксины, продуцируемые грибами *Fusarium*. В кукурузе и продуктах ее переработки преобладают фузариотоксины фумонизины. Чаще других в природных условиях обнаруживают фумонизин В₁ (ФВ₁), реже – фумонизины В₂ и В₃ (ФВ₂ и ФВ₃), образуемые преимущественно микроскопическими грибами рода *Fusarium moniliforme* и *F. proliferatum*.

Целью данной работы было изучение поверхностной микофлоры и распространенности фумонизинов в зерне кукурузы и продуктах его переработки.

Поверхностную микофлору зерна и зернопродуктов определяли методом посева смывов с измельченных продуктов на агар Чапека и сусло-агар. Идентификацию грибов проводили по Пидопличенко (1953 г.), Нелсону и др. (1983 г.) и Бусу (1971 г.).

Количественное определение ФВ₁ и ФВ₂ было выполнено с помощью метода обращено-фазной ВЭЖХ, предел обнаружения для ФВ₁ и ФВ₂ – 0,01 и 0,04 мг/кг соответственно, разработанного в ГУ НИИ питания РАМН.

Анализ поверхностной микофлоры зерна кукурузы и продуктов ее переработки не выявил отличий по видовому составу от внутренней микофлоры, тем не менее, были установлены различия в соотношении разных групп грибов. *F. moniliforme* присутствовал во всех пробах зерна, крупы, муки и зародыша, на его долю приходилось 35,1% от общего числа грибов в зерне, 77,0% – в крупе, 40,4% – в муке и 29,0% – в зародыше (табл. 1). Доминирующей группой грибов в зерне и муке были пенициллы (38,1 и 47,1% от суммы грибов), в крупе преобладал *F. moniliforme* и только в зародыше – *A. flavus* (39,8%).

В крупе и муке вследствие процессов переработки численность *F. moniliforme* сокращалась примерно в 4 раза, в зародыше оставалась на уровне зерна. Крупа являлась наиболее «чистым» продуктом: численность грибов хранения в ней составляла всего 1,4 тыс. КОЕ/г (4,1% от микофлоры зерна). Зародыш по зараженности грибами хранения и *A. flavus* превышал зерно (116,1 и 241,3%, соответственно), поскольку ввиду своей высокой пищевой ценности и доступности поражается сапрофитными грибами в первую очередь (табл. 1).

Аналогично численности грибов изменялось в процессе переработки и содержание фумонизинов, т.е. наблюдалось их частичное обезвреживание по фумонизинам (табл. 1).

Импортированная кукуруза и продукты ее переработки были значительно слабее обсеменены *F. moniliforme* и грибами хранения (как и в

случае внутренней микофлоры) (табл. 2). Если в отечественной кукурузе численность *F. moniliforme* составляла в среднем 18,8 тыс. КОЕ/г, то в импортном зерне – всего 1,4 тыс. КОЕ/г. В крупе и муке разница была еще менее заметной (4,2 и 0,03 тыс. КОЕ/г).

В целом, *F. moniliforme* являлся одним из доминирующих грибов в микофлоре кукурузы. На его долю приходилось до 53,6% от общего числа грибов во внутренней микофлоре и до 35,1% – поверхностной микофлоре зерна. Высокие уровни загрязнения отмечены и в продуктах переработки кукурузы – крупе, муке и зародыше (4,2-16,2 тыс. КОЕ/г), что наряду с накоплением фумонизинов является дополнительным фактором токсикологического риска, т.к. *F. moniliforme* считается условно патогенным грибом.

Таким образом, гриб *F. moniliforme* являлся доминирующим видом грибов в микофлоре как зерна кукурузы, так и продуктов его переработки.

Показано, что отечественное зерно и продукты его переработки в большей степени поражены *F. moniliforme*, а также грибами хранения, чем импортные, что является показателем более совершенных технологий возделывания, хранения и переработки кукурузы за рубежом.

Таблица 1

Поверхностное поражение отечественного зерна кукурузы и продуктов его переработки *Fusarium moniliforme* и грибами хранения (тыс. КОЕ/г)

Продукт	Показатели*	<i>F. moniliforme</i>	Общее количество	Грибы хранения				Среднее содержание ФВ1+ФВ2, мг/кг
				<i>A. glaucus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Mucoraceae spp.</i>	
Зерно	М	18,8	53,6	2,1	9,2	20,4	1,9	1,98
	Sd	32,7	66,7	3,5	13,1	44,4	2,2	
	% проб	100	100	33	100	100	78	
Крупа	М	4,7	6,1	0	0,29	0,92	0,05	0,80
	Sd	8,4	8,4	-	0,38	1,53	0,06	
	% проб	100	100	0	85	89	70	
Мука	М	4,2	10,4	0,07	1,0	4,9	0,12	1,09
	Sd	4,0	7,0	0,09	1,2	3,1	0,08	
	% проб	100	100	50	83	100	83	
Зародыш кукурузный	М	16,2	55,8	0,17	22,2	8,2	1,8	6,55
	Sd	13,3	25,8	0,29	24,1	4,8	2,4	
	% проб	100	100	33	100	100	67	

* М – среднее содержание, Sd – среднеквадратичное отклонение; % проб – пораженность проб грибами.

Таблица 2

Поверхностное поражение импортного зерна кукурузы и продуктов его переработки *Fusarium moniliforme* и грибами хранения (тыс. КОЕ/г)

Продукт	Показатели*	<i>F. moniliforme</i>	Общее количество	Грибы хранения				Среднее содержание ФВ1+ФВ2, мг/кг
				<i>A. glaucus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Mucoraceae spp.</i>	
Зерно	М	1,4	2,2	0	0	0,77	0,05	0,83
	Sd	2,1	1,1	-	-	0,18	0,07	
	% проб	100	100	0	0	100	50	
Крупа и мука	М	0,03	0,55	0,01	0,02	0,39	0,03	0,30
	Sd	0,05	0,83	0,02	0,02	0,67	0,02	
	% проб	25	100	25	50	100	75	

* М – среднее содержание, Sd – среднеквадратичное отклонение; % проб – пораженность проб грибами.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКОСИСТЕМЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ МИКОТОКСИНОМ ФУМОНИЗИНОМ В1

Мартынова Е.А.¹, Иванченко О.Б.²

¹ГУ НИИ питания РАМН

Москва

² ГОУ ВПО Санкт-Петербургский Государственный Университет низкотемпературных и пищевых технологий Санкт-Петербург

Вторичные метаболиты микроскопических плесневых грибов оказывают существенное влияние на макроорганизм при употреблении в пищу продуктов, контаминированных микромицетами или их токсинами. Фумонизины – это вторичные метаболиты, продуцируемые микромицетами рода *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. nigramai*, *F. dlamini* и другими родственными видами, а также микромицетами *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*. Начиная с 1988 года, когда был открыт первый фумонизин В1, и до настоящего времени обнаружено около 20 различных фумонизинов, причем все они обладают дозо-зависимым цитотоксическим эффектом.

Фумонизин В1 наиболее распространен в природе и биологически наиболее активен среди всех известных токсинов этой группы. При

попадании в организм фузонин В1 всасывается и поступает в печень, где метаболизируется не более 1-2% от введенной дозы токсина, основное его количество в интактном виде выводится с желчными кислотами, меньшая часть выводится через почки. Попадая с желчью в кишечник, фузонин В1 оказывает выраженное влияние на все звенья микробиоценоза.

Экосистема кишечника представляет собой многокомпонентную систему, включающую в себя микробные сообщества, колонизирующие различные отделы толстой и тонкой кишки, локальную иммунную систему кишечника, эпителиальные клетки кишки, а также метаболиты макронутриентов, пассируемые по кишечному тракту. Между всеми компонентами экосистемы существует динамическое равновесие. Одним из молекулярных механизмов регуляции экосистемы кишки являются так называемые TLR рецепторы (Toll-like receptors). В клетках иммунной системы TLR рецепторы и их сигнальные пути являются регуляторным звеном между природным и адаптивным иммунитетом. TLR рецепторы на эпителиальных клетках кишечника проводят трофические сигналы от пробиотиков (непатогенных микроорганизмов, оказывающих положительное регуляторное влияние на макроорганизм), что способствует интегративным процессам в эпителии кишечника. Одновременно TLR рецепторы распознают экстраклеточные компоненты патогенных микроорганизмов, в частности, липополисахарид, флагеллин и другие, что вызывает секрецию ряда цитокинов клетками эпителия кишечника и оказывает регуляторное влияние на ассоциированную с кишечником лимфоидную ткань. Фузонин влияет на липиды плазматической мембраны клеток, в частности так называемые рафты или кавеолы, в которых сосредоточены рецепторы и рецептор-ассоциированные киназы и фосфатазы. Изменение липидного состава мембран влияет на экспрессию рецепторов и их сигнальные пути, что, в конечном счете, обуславливает изменение сигнала от мембраны к ядру и регулирует функциональную активность клетки.

В толстой кишке микроорганизмы ферментируют остаточные количества нутриентов, непереваренных в верхних отделах кишечника. Продуктируемые ими метаболиты, в том числе короткоцепочечные жирные кислоты, используются колоноцитами как источник энергии и биологически активных веществ. Слизистая оболочка кишечника, включая саму пристеночную слизь, эпителиоциты, клетки иммунной системы, свободно пенетрирующие слизистую оболочку, и их цитокины, регулирующие межклеточные взаимодействия в слизистой оболочке, создают многокомпонентную систему защиты. При контакте с экосистемой кишечника фузонин оказывает дезинтегрирующее влияние на все её компоненты.

Фузонин В1 оказывает дозо-зависимое цитотоксическое действие на эпителиальные клетки кишечника, повышая процент клеток, выходящих в апоптоз. Повышается скорость обмена клеточной массы эпи-

телиа, что, в конечном счете, приводит к атрофическим изменениям в кишечнике.

Фузонин В1 негативно влияет на все звенья иммунной системы. Как показано нашими многочисленными данными, фузонин ингибирует первичный и вторичный иммунный ответ на Т-зависимые антигены, негативно регулирует экспрессию рецепторов лимфоцитов, изменяет экспрессию молекул адгезии, что приводит в нарушению хоминга клеток иммунной системы в ткани к антигенам. Фузонин ингибирует синтез ДНК в нормальных клетках иммунной системы, активируя при этом синтез ДНК в малигнизированных и трансформированных клетках, что обуславливает развитие вторичного иммунодефицитного состояния.

Фузонин В1 оказывает дозо-зависимое влияние на рост культур клеток пробиотиков. Согласно нашим данным, фузонин в концентрации 10-5М существенно замедляет рост культур *Lactobacillus casei*, *Bifidobacteria bifidum*, *E. coli*. Окраска клеток пропидиумом иодидом (взаимодействующим с олигонуклеосомальными фрагментами ДНК) и последующий анализ на проточном цитометре выявил, что фузонин обуславливает распад ДНК и образование олигонуклеосомальных фрагментов различной длины. ДНК-повреждающий эффект фузонина коррелирует с фазами роста микроорганизмов. Нами также установлено генотоксическое действие фузонина В1 на клетках *E. coli* с использованием различных генотоксических тестов, включая ДНК-повреждающий тест со штаммами – мутантами.

Наиболее интересным нашим открытием последнего времени является индукция синтеза киллерных токсинов аскомицетами *Candida tropicalis*, а также сообществом дрожжей *Candida tropicalis* и *Rhodotorula spp.* под действием фузонина В1. Обработка дрожжей фузонин В1 приводит к синтезу токсических веществ, оказывающих киллерный эффект как на другие микроорганизмы экосистемы, так и на клетки иммунной системы. Взаимодействие нейтрофилов периферической крови с дрожжами вызывало гибель клеток иммунной системы. Подобная киллерная активность, хотя и в меньшей степени, проявляется в отношении макрофагов перитонеальной полости лабораторных животных. Процент гибели макрофагом и нейтрофилов под воздействием *Candida tropicalis* максимален при обработке дрожжей фузонин В1 в концентрации 10-5М.

Киллерная активность клеток *Candida tropicalis*, обработанных фузонин В1, также проявляется в отношении клеток *E. coli* и *Lactobacillus casei*. Культуральная жидкость, полученная от дрожжей, растущих в присутствии фузонина В1 в концентрации 10-5М, оказывала наиболее выраженный киллерный эффект в отношении исследуемых пробиотиков.

Многочисленными работами по влиянию пищевых полисахаридов на экосистему кишечника показано, что микроорганизмы, колонизи-

рующие желудочно-кишечный тракт, обладают избирательным приоритетом в отношении субстрата. Так, например, бифидобактерии предпочитают расти на олигофруктозе и инулине, а резистентные крахмалы регулируют рост лактобактерий. Пищевые полисахариды, в том числе инулин, одиглофруктоза, нативные и модифицированные крахмалы, оказывают выраженное влияние на рост пробиотиков, а также на локальный иммунный статус кишечника лабораторных животных. По нашим данным некоторые крахмалы, в том числе нативные и модифицированные картофельные крахмалы, обладают цитотоксическим и ДНК-повреждающим действием в отношении клеток *E. coli* в ДНК-повреждающем тесте с использованием штаммов, дефектных по генам репарации ДНК.

В отношении клеток иммунной системы, ассоциированной с кишечником, крахмалы оказывают избирательное влияние в зависимости от их физико-химических свойств. Проведенные исследования по влиянию фумонизина на процессы взаимодействия крахмалов с клетками иммунной системы показали, что фумонизин потенцирует негативное влияние некоторых крахмалов, в том числе картофельного, на клетки локальной иммунной системы желудочно-кишечного тракта.

Таким образом, фумонизин оказывает негативное влияние на все компоненты экосистемы кишечника, включая микробиоценоз, клетки иммунной системы и эпителиальные клетки кишечника.

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ СМЕШАННЫХ МИКОТОКСИКОЗАХ

Матвеева Е.Л., Иванов А.В., Тремасов М.Я.

*ФГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт
Казань*

Многие микроскопические грибы при благоприятных условиях могут продуцировать вторичные метаболиты, которые, попадая в организм, вызывают микотоксикозы. Возможно, неблагоприятное влияние на организм одновременно нескольких микотоксинов. Смешанные, спонтанные микотоксикозы зарегистрированы в Татарстане, в республиках Чувашии, Мордовии, Башкортостан, в Тверской, Калужской, Псковской областях и других регионах России. Описаны микотоксикозы с углублением тяжести интоксикации при одновременном воздействии Т-2 токсина, афлатоксина В1, охратоксина; экспериментально доказано развитие патологических изменений при сочетанном воздействии Т-2 и афлатоксина В1 в субтоксических дозах.

Для оценки морфологических изменений, возникающих в организме под воздействием смешанных микотоксикозов нами проведен эксперимент на 50 белых крысах массой 180-200 г. Подопытным животным внутрижелудочно вводили водно-спиртовые растворы Т-2 и афлатоксина в дозе 1/10 ЛД50 с интервалом 10 мин. Контрольным группам крыс вводили раствор только одного из вышеназванных микотоксинов, другой группе — аналогичный объем растворителя.

В качестве продуцентов использовали грибы *Fusarium sporotrichiella* штамм 2 м15 любезно, представленный А.М. Котиком, *Aspergillus flavus* и *A. ochraceus* из коллекции ФГНУ ВНИВИ. Подопытные и контрольные животные были убиты через 10 суток после эксперимента.

Отмечено, что после сочетанного введения Т-2 токсина и афлатоксина в указанных дозах клинические изменения характеризовались вялостью, взъерошенностью шерсти, отсутствием блеска волосяного покрова.

При патологоанатомическом исследовании обнаружены наиболее характерные изменения интоксикации в печени, почках, сердце, желудке и в тонком отделе кишечника. Так, слизистая оболочка дна желудка и тонкого отдела кишечника была в состоянии воспаления бледно-серого цвета, утолщена, покрыта густой катаральной массой. Печень окрашена неравномерно, от бледно-коричневого до коричневого цвета в состоянии дистрофии. Миокард дряблой консистенции, на поверхности разреза рисунок волокнистого строения сглажен. В почках наблюдались отдельные точечные кровоизлияния, селезенка без видимых изменений.

При микроскопическом исследовании в желудке обнаружено катаральное воспаление слизистой оболочки, в мышечной оболочке отек интерстициальной ткани с инфильтрацией мононуклеарных клеток, в желудке — разволокнение и отек интерстициальной ткани. В тонком отделе кишечника наблюдалась выраженная дистрофия эпителия слизистой оболочки, местами с десквамацией эпителия. Ворсинки инфильтрованы мононуклеарными клетками и отечны. В дуоденальных железах отмечалась слизистая дистрофия эпителия. В печени наблюдали зернистую, местами вакуольную дистрофию гепатоцитов с частичной деструкцией органа. В дольках нарушены радиальное расположение балок из-за округления, уменьшения печеночных клеток и расширения синусоидов. Мышечные волокна миокарда гомогенизированы, выражена зернистая дистрофия с отеком интерстициальной ткани. В почках отмечалась зернистая дистрофия эпителия извитых канальцев, в некоторых из них — пикноз, пролиферация эпителия капилляров почечных канальцев. В красной пульпе селезенки выражена гиперплазия лимфоидной ткани.

При введении подопытным крысам только афлатоксина или Т-2 токсина в исследуемой дозе в течение 10 суток (срок наблюдения) заметных изменений в общем состоянии животных не отмечено.

Паталогоанатомические изменения и морфологические проявления интоксикации паренхиматозных органов и желудочно-кишечного тракта менее выражены или же совсем отсутствовали.

Таким образом, результаты эксперимента свидетельствуют об усилении токсигенного действия Т-2 токсина и афлатоксина при сочетанном их поступлении в организм, чем при отдельном их введении.

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ АСПЕКТЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Монастырский О.А.

*Всероссийский НИИ биологической защиты растений, РАСХН
Краснодар*

Последние 20 лет во всем мире нарастает поражение токсиногенными грибами всех видов сельскохозяйственных растений, особенно зерновых и бобовых культур. Ежегодно фузариями поражается более 30 % всех посевов зерновых культур, а комплексом видов плесневых грибов – более 50 % хранящегося зерна. Во всех зерносеющих странах мира регистрируемые количества микотоксинов обнаруживаются в 25 % исследованных образцов товарных партий зерна и зерновых кормов. Эволюция видов токсиногенных грибов в агроценозах идет в направлении увеличения частоты штаммов-суперпродуцентов микотоксинов.

Ежегодные потери сельскохозяйственной продукции от поражения токсиногенными грибами и загрязнения микотоксинами оцениваются в мире в 16 млрд.долл., в США в 1 млрд. долл., в России – в 500 млн. руб. Микотоксины стали основным видом природных токсичных загрязнителей сельскохозяйственного пищевого сырья и кормов. По экспертным оценкам, ежегодно съедают разных микотоксинов в общем: страны Азии – 75 тонн, США – 60 тонн, страны ЕС – 50 тонн, Россия – 20 тонн.

Во всем мире быстро нарастает внимание к обнаружению, исследованию, регистрации и нормированию микотоксинов. Их содержание в пище и кормах в 1987 г. нормировали 56 стран, в 2003 г. – 99 стран. Созданы национальные системы информации о токсиногенных грибах и микотоксинах в США, Канаде, странах ЕС. Осуществляется ряд международных проектов по исследованию микотоксинов и микотоксикозов. Ни в одном из них Россия не участвует.

В XXI веке токсинообразующие грибы и микотоксины стали объектом биотехнологии и оружием биотерроризма, например, афлатоксины

и Т-2 токсин. Это обусловлено тем, что виды фузариев, аспергиллов, мукора и альтернарии, в природных популяциях которых доминируют штаммы-суперпродуценты микотоксинов, опасных для теплокровных, перекрестно поражают сельскохозяйственные культуры, сельскохозяйственных животных и человека. Штаммы некоторых видов фузариев, выделенные из организмов живых людей, заражали зерновые культуры и продуцировали микотоксины.

Экспериментальными исследованиями установлено, что ряд видов фузариев и аспергиллов могут не терять жизнеспособности в желудочно-кишечном тракте животных и выделяться с навозом. Учитывая отсутствие в стране в подавляющем большинстве хозяйств специально оборудованных навозохранилищ с обязательным его обеззараживанием, необходимо исследовать возможность их быть резервуарами видов токсиногенных грибов. Другим важным источником инокулюма токсиногенных грибов являются зернохранилища, поскольку, в основном, они представлены мехскладами и амбарами с плохой технологией обработки зерна.

Глобальное потепление климата приведет к усилению поражения токсиногенными грибами с.-х. культур и животных, загрязнению пищевых продуктов и кормов микотоксинами, что представляет реальную угрозу для человека, т.к. многие микотоксины обладают гентоксичностью и вызывают эрозию зародышевой плазмы, в частности – хромосомы человека.

В связи с этим, необходимо разработать и принять на уровне государственной политики национальную программу исследований роли токсиногенных грибов и микотоксинов в производстве с.-х. пищевой продукции, а также в нарушении здоровья человека, особенно, детей. Целью программы будет разработка практических мер минимизации экономического ущерба и противодействия использованию их в качестве оружия для биотеррористических атак.

НЕОТЛОЖНЫЕ МЕРОПРИЯТИЯ ПО УДАЛЕНИЮ ИЗ ОРГАНИЗМА ГРИБНОГО ТОКСИНА

Мусселиус С.Г.

*Госпиталь Главмосстроя
Москва*

Все отравления ядовитыми грибами в той или иной степени являются жизнеугрожающими. Учитывая отсутствие возможности идентифицировать вид грибного токсина лабораторным путем, лечебную тактику определяют клиническая картина отравления, анамнез, общеклинические лабораторные и инструментальные данные. В связи с этим врач

должен не только хорошо знать клинику отравления ядовитыми грибами, но и уметь провести дифференциальную диагностику с различными видами отравлений химической этиологии и инфекционными заболеваниями. От правильно поставленного диагноза зависит тактика лечения, объем консервативных и активных методов детоксикации. Выведение из организма грибного токсина является основным направлением в лечении больных. Одновременно проводится терапия по профилактике и лечению острого гастроэнтерита, сердечнососудистой и печеночно-почечной недостаточности, токсической энцефалопатии. В зависимости от условий проведения лечения методы детоксикации делят на консервативные и активные.

А. Консервативные методы детоксикации

1. Промывание желудка. Процедуру обязательно проводят, если больные госпитализируются в течение первых двух суток после употребления в пищу ядовитых грибов. Промывание желудка осуществляют во всех случаях, если сохраняются симптомы острого гастроэнтерита. При проведении процедуры из желудка выводится часть грибного токсина, поступившая с желчью при рвотных движениях в 12 перстную кишку. Удаление с промывной водой экзотоксина прерывает энтерогепатическую циркуляцию яда в организме.
2. Кишечный лаваж. Удаление остатков грибной массы из кишечника возможно только с помощью кишечного лаважа. Одновременно с поверхности слизистой кишечника смывается патогенная микрофлора. Процедура препятствует проникновению микроорганизмов в глубокие слои кишечника, защищает печень от воздействия на нее микробного токсина, купирует энтерит.
3. Гастроинтестинальная сорбция. Энтеросорбенты за счет процессов адсорбции, абсорбции и комплексообразования эффективно выводят грибной токсин из желудочно-кишечного тракта, снижают токсический эффект грибного и микробного токсина на печень.
4. Селективная деконтаминация кишечника. Проводится путем перорального (или через зонд) введения антибиотиков для подавления в кишечнике условно патогенных аэробов и особенно грамотрицательных бактерий, вырабатывающих эндотоксин.
5. Форсированный диурез. Выведение из организма грибного токсина, не связанного с белками плазмы, достигается проведением форсированного диуреза. Процедуру проводят при нормальных гемодинамических показателях и в условиях полного восстановления водно-электролитного состава. Объем предварительной гемодилюции и дозу салуретика устанавливают для конкретного больного. Критериями служат гемодинамические показатели, в частности ЦВД, минутный диурез.
6. Электрохимическое окисление крови. Раствор гипохлорита натрия является сильным окислителем. Реакционно активные ионы хлора и кислорода инактивируют и разрушают грибной токсин. Инфузию

0,05% раствора гипохлорита натрия осуществляют в центральную вену со скоростью 20 – 30 капель в минуту, в объеме не превышающем 1/8 ОЦК.

7. Ультрафиолетовое облучение крови. Существует мнение, что некоторые токсины ядовитых грибов подвергаются фотодеструкции, в связи с чем можно рассчитывать на разрушение чувствительных к ультрафиолету токсических соединений, содержащихся в ядовитых грибах. Кроме того, положительное влияние процедуры на иммунную систему больного способствует повышению резистентности организма в отношении микробного токсина, появление которого связано с острым энтеритом и дисбактериозом.

Б. Активные методы детоксикации

1. Гемосорбция. При перфузии крови через сорбент грибной токсин в виде свободной фракции или связанный с белком фиксируется на его поверхности. Вид сорбента, скорость кровотока, продолжительность процедуры, доза антикоагулянта и др. устанавливают в зависимости от вида грибного отравления и клинико-лабораторных показателей больного.
2. Диализно-фильтрационные методы. Вне зависимости от вида процедуры не связанная с белками плазмы фракция грибного токсина в той или иной степени выводится из кровяного русла. Скорость диффузии токсических веществ через полупроницаемую мембрану определяется градиентом концентрации этого вещества в крови относительно диализирующего раствора. Одновременно достигается коррекция нарушенного электролитного состава крови и КЩС.
3. Плазмаферез и плазмасорбция. При проведении этих процедур из крови больного (плазмаферез) и из плазмы (плазмасорбция) удаляется грибной токсин. При плазмаферезе выводится столько токсического вещества, сколько его распределено в удаляемом объеме плазмы. При проведении процедур фиксированная на эритроцитах часть токсина сохраняется в кровеносном русле. Плазмаферез, дополненный процедурой гемосорбции, в значительной степени увеличивает элиминацию грибного токсина из организма больного.
4. Лимфологические методы. В лимфатическую систему грибной токсин частично поступает из кишечника, а также за счет его перераспределения в жидких средах организма. Наружное дренирование грудного лимфатического протока позволяет длительное время осуществлять замещение токсичной лимфы кровезаменителями, а проведение таких процедур, как лимфосорбция и лимфолиз, «очищать» лимфу от грибного токсина и возвращать её внутривенно больному.
5. Перитонеальный диализ. При создании искусственного асцита специальными растворами электролитов за счет эффекта диффузии и конвекции происходит удаление из кровеносной и лимфатической

систем через брюшину свободной и, что очень важно, связанной с белками фракции грибного токсина. Простота и доступность метода дают ему преимущество перед другими активными методами детоксикации.

Таким образом, при отравлении или подозрении на отравление ядовитыми грибами показана срочная госпитализация пострадавших в отделение токсикологической или общей реанимации для интенсивного лечения и мониторингового наблюдения за витальными функциями.

Детоксикационные мероприятия относятся к срочной лечебной помощи. Все врачебные действия направлены на максимальное сокращение времени воздействия грибного токсина на организм пострадавшего. При массовом поступлении в стационар больных с отравлением ядовитыми грибами в первую очередь лечение проводят лицам со сниженными компенсаторными и адаптационными способностями организма – детям, беременным женщинам, людям пожилого и старческого возраста.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОДНОВРЕМЕННОМУ ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОХРАТОКСИНА А И ЦИТРИНИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

*Пименова В.В., Аксенов И.В.,
Аристархова Т.В., Эллер К.И.
ГУ НИИ питания РАМН
Москва*

Охратоксин А и цитринин принадлежат к микотоксинам, обладающим выраженной нефро- и гепатотоксичностью. Предполагается, что охратоксин А вместе с цитринином является одними из этиологических факторов распространенного в ряде европейских стран заболевания – Балканской эндемической нефропатии. Охратоксин А продуцируется грибами рода *Aspergillus* (в первую очередь *A. ochraceus*) и *Penicillium* (*P. verrucosum*). Цитринин также продуцируется грибами *Penicillium verrucosum*, кроме того его продуцентами являются *P.citrinum* и ряд других грибов рода *Penicillium*. Микроскопические грибы, продуцирующие цитринин, способны синтезировать и охратоксин А и поэтому в продуктах, контаминированных охратоксином А, часто обнаруживают и цитринин. Охратоксин А встречается повсеместно и в основном обнаруживается в зерновых продуктах, кофе, сухофруктах, специях, вине и фруктовых соках. В странах ЕС содержание охратоксина А в продовольственном сырье регламентируется на уровне 0,005 мг/кг.

Цитринин чаще всего встречается в рисе, пшенице, муке, ячмене, кукурузе, ржи, арахисе, фруктах и специях. Описано много случаев одновременного загрязнения этих продуктов и охратоксином А. Все вышеперечисленное обуславливает целесообразность разработки методики одновременного определения охратоксина А и цитринина.

Разработанная методика основана на высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с селективным флуориметрическим детектированием. При выборе этого подхода учитывалось сходство в естественной флуоресценции охратоксина А и цитринина: близкие максимумы длины волны возбуждения флуоресценции 300 – 330 нм и эмиссии (более 450 нм). Методика включала следующие этапы:

- экстракцию микотоксинов из размельченного образца смесью хлороформ – водная 0,5 М фосфорная кислота (10:1);
- очистка аликвоты экстракта с помощью колоночной хроматографии на полиамиде;
- разделение и количественное определение с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке с неподвижной фазой с силикагелем, химически связанном с октадецилсиланом (ODS-силикагель). Подвижная фаза: метанол-этилацетат-водная фосфорная кислота с рН 2,2 (55:10:35).

Разработанная методика позволяет определять микотоксины при их совместном присутствии на уровне до 0,0005 мг/кг (для охратоксина А) и 0,005 мг/кг (для цитринина). Различие в пределах обнаружения связано с большей интенсивностью флуоресценции охратоксина А условиях анализа. Апробация методики показала ее пригодность для одновременного определения охратоксина А и цитринина в специях, зерновых, кофе и сухофруктах.

ИЗУЧЕНИЕ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ ЗЕРНА КУКУРУЗЫ И ПРОДУКТОВ ЕЕ ПЕРЕРАБОТКИ ФУЗАРИОТОКСИНАМИ

*Седова И.Б., Захарова Л.П., Киселева М.Г., Львова Л.С.
ГУ НИИ питания РАМН. Россия
ГНУ ВНИИЗ РАСХН Россия
Москва*

Одно из важных мест среди природных загрязнителей пищевых продуктов принадлежит микотоксинам – вторичным метаболитам микроскопических грибов, отличающимся высокой токсичностью, наличием мутагенных, тератогенных и канцерогенных свойств. Микотоксины, продуцируемые грибами *Fusarium*, являются наиболее часто широко

распространенными в мире микотоксинами. Среди них своими токсическими свойствами и чрезвычайно широкой распространенностью выделяются дезоксиниваленон (ДОН) и зеараленон (ЗЛ) и фумонизины. Учитывая данные литературы о чрезвычайно высокой частоте загрязнения кукурузы и продуктов ее переработки фумонизинами, о результатах изучения их биологической активности, а также отсутствие каких-либо сведений о распространенности их в продуктах переработки кукурузы в России была определена цель работы – изучить распространенность фузариотоксинов ДОН, ЗЛ и фумонизинов в зерне кукурузы и продуктах ее переработки различного производства.

Количественное определение токсинов ФВ1 и ФВ2 проводили с помощью обращено-фазной (ОФ) ВЭЖХ, предел обнаружения для ФВ1 и ФВ2 – 0,01 и 0,04 мг/кг соответственно. Содержание ДОН определяли методом ОФ ВЭЖХ с использованием УФ-детектора, а ЗЛ – методом ОФ ВЭЖХ с применением флуориметрического детектора. Предел обнаружения составлял 0,05 мг/кг для ДОН и 0,05 мг/кг для ЗЛ.

Изучено содержание фумонизинов В1 и В2 (ФВ1, ФВ2) в 147 пробах кукурузы урожая 2000–2003 гг., полученных из Северо-Кавказского региона и по импорту, 113 проб кукурузной крупы и 10 проб кукурузной муки, 120 пробы продуктов детского питания (65 проб кукурузных хлопьев, 53 проб детских каш, 2 проб детских печений), отобранных на перерабатывающих предприятиях и приобретенных в торговой сети розничной торговли. При изучении ДОН и ЗЛ проанализировано 216 проб кукурузы урожая 2000–2003 гг., поступивших из Северо-Кавказского региона и по импорту, 150 пробах кукурузной крупы, 10 пробах кукурузной муки и 34 пробах продуктов детского питания, содержащих кукурузу в своем составе.

Согласно данным ВЭЖХ, 93% из 147 исследованных проб зерна кукурузы были загрязнены ФВ1 в количестве от 0,01 до 17,9 мг/кг, а в 59% проб был обнаружен ФВ2 в количестве от 0,04 до 8,50 мг/кг; среднее содержание ФВ1 составило 1,55 мг/кг, а ФВ2 – 0,40 мг/кг. Более детальное изучение загрязненности этими токсинами зерна урожая 4 лет, показало, что урожай зерна кукурузы 2002 года характеризуется 100% частотой обнаружения ФВ1 и самой высокой частотой обнаружения ФВ2 – 93%, а также наибольшими величинами среднего уровня (2,71 мг/кг ФВ1 и 0,65 мг/кг ФВ2), медианы – 1,62 и 0,56 мг/кг и 90% уровня – 5,20 и 1,56 мг/кг соответственно. Пробы кукурузы урожая 2003 года отличались наименьшей частотой обнаружения и самыми низкими уровнями загрязнения этими токсинами, так, 85% проб содержали ФВ1, максимальный уровень и величина среднего содержания ФВ1 как минимум в 3 раза ниже значений, полученных для зерна кукурузы урожая 2000–2002 годов. Данные по частоте обнаружения и уровням загрязнения фумонизинами урожая 2000 и 2001 годов характеризуются промежуточными значениями. При изучении частоты и уровней загрязнения фумонизинами кукурузной крупы, было показа-

но, что ФВ1 и ФВ2 присутствовали в 96% и в 44% исследованных проб и их концентрации были существенно ниже, чем в зерне (в 3,2 и 4,4 раз соответственно).

Все исследованные пробы муки были загрязнены ФВ1, в 50% проб содержали также ФВ2. Содержание ФВ1 в этих пробах варьировало от 0,07 до 1,77 мг/кг, средняя концентрация составила 0,61 мг/кг, что значительно меньше (в 3 раза), чем, средний уровень загрязнения для зерна. Среднее содержание ФВ2 в пробах кукурузной муки было в 4 раза ниже, чем в пробах зерна кукурузы.

Результаты наших исследований показали, что продукты детского питания и кукурузные хлопья были в меньшей степени загрязнены фумонизинами, по сравнению с основными продуктами переработки кукурузы, что связано с особенностями технологии производства этих продуктов. Фумонизины присутствовали лишь в 60% проб кукурузных хлопьев в крайне низких концентрациях: ФВ1 – 0,049 мг/кг, ФВ2 – в следовых количествах. Анализ других продуктов переработки кукурузы, представленных консервированной сладкой кукурузой, кукурузными палочками, колечками и тортиллами, показал, что в 6 из 10 исследованных проб был обнаружен только ФВ1 на низких уровнях загрязнения – от 0,01 до 0,05 мг/кг.

В 42% исследованных проб детского питания для детей до 3 лет был обнаружен ФВ1 в концентрации от 0,01 до 0,16 мг/кг. Отмечено, что несколько выше частота обнаружения ФВ1 в продуктах детского питания на молочной основе, 57% проб из которых содержали этот токсин, а среднее содержание составило 0,034 мг/кг по сравнению с кукурузными кашами, не содержащими в своей формуле молока, в этом случае 38% проб были загрязнены в средней концентрации 0,019 мг/кг ФВ1. Следует подчеркнуть, что в проведенных исследованиях ни в одной из изученных проб продуктов детского питания до 3 лет не был обнаружен ФВ2, но учитывая, что в природе и, как показали предыдущие исследования, соотношение ФВ1 и ФВ2 составляет 10:3 можно предположить, что если ФВ2 в пробах есть, то концентрации его ниже пределов обнаружения метода.

Согласно полученным результатам, 2,3% из 216 исследованных проб зерна кукурузы, были загрязнены ДОН в достаточно низких концентрациях – от 0,05 до 0,40 мг/кг, среднее содержание токсина в контаминированных пробах составило 0,14 мг/кг. Ни в одной из исследованных проб продуктов переработки кукурузы ДОН обнаружен не был.

Показана низкая частота обнаружения ЗЛ в одиночных партиях зерна кукурузы (3,2% случаев), в количествах, ниже предельно-допустимой концентрации, установленной для кукурузы на уровне 1 мг/кг. Изучение частоты и уровня контаминации ЗЛ продуктов переработки кукурузы показало, что ни одна из исследованных проб не была загрязнена этим токсином. Следует отметить, что в 8 из 147 проб зерна

кукурузы наряду с ДОН (4 пробы) и ЗЛ (4 пробы) были обнаружены фумонизины, и только одна проба содержала все 3 токсина.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали:

1. Высокую частоту обнаружения фумонизинов В1 и В2 в зерне кукурузы и основных продуктах его переработки (крупы, муки), при этом установлено, что средние уровни загрязнения крупы и муки значительно ниже уровней загрязнения фумонизинов в зерне кукурузы.

2. Относительно низкая частота загрязнения показана для продуктов детского питания и, в первую очередь, для продуктов питания детей до 3 летнего возраста, при этом обращают на себя внимание очень низкие концентрации ФВ1 в пробах.

3. Результаты проведенных исследований подтверждают существование постоянной вероятности загрязнения продовольственного зерна кукурузы и продуктов его переработки одним или более фузариотоксинами.

О СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ПИРЕТРОИДОВ И МИКОТОКСИНОВ

*Тремасов М.Я., Галютдинова Г.Г.,
Егоров В.И., Иванов А.В.*

*ФГНУ Всероссийский научно-исследовательский
ветеринарный институт
Казань*

В настоящее время, в связи с возрастающим антропогенным воздействием на окружающую среду, все чаще в кормах обнаруживаются токсиканты как природного, так и техногенного происхождения.

К природным экотоксикантам относят микотоксины, вырабатываемые микроскопическими грибами. Согласно статистическим данным около 25% всего производимого зерна поражено микотоксинами.

Среди микотоксинов опасным для животных является Т-2 токсин, который вырабатывается грибами рода *Fusarium*.

Одним из факторов увеличивающим степень загрязнения кормов микотоксинами является возможное сочетание их с пестицидами.

В последние годы все более широкое применение в сельском хозяйстве находят инсектициды, относящиеся к группе синтетических пиретроидов.

Однако потенциальную опасность пиретроидов сегодня явно недооценивают. Общепризнанно мнение, что это малотоксичные и быстро разлагающиеся в объектах окружающей среды, организме животных и человека соединения. Однако экспериментальные данные свидетельствуют о том, что лишь у насекомых быстро вырабатывается устойчи-

вость к этим препаратам. Для сельскохозяйственных животных и человека — они более опасны. Одним из наиболее распространенных ядов из группы пиретроидов является децис.

Выявлены случаи сочетанного действия микотоксинов и пиретроидов на животных.

В 2003 г. в одном из хозяйств Мамадышского района республики Татарстан был отмечен случай падежа крупного племенного рогатого скота в результате обработки посевов синтетическим пиретроидом-фьюри. Животные по разным причинам оказались подвержены контакту с обработанными растениями. Смерть у одних наступала в течение нескольких часов после начала пастьбы на обработанном поле, у других по истечении нескольких суток кормления кормом, контаминированным остатками инсектицидов. Наличие пиретроида — фьюри было установлено в растительных объектах и патматериале в количестве 0,08-1,5 мг/кг. В то же время в образцах вико-смеси, входившего в состав рациона животных, был обнаружен микотоксин — афлатоксин В1 в количестве 0,1 мг/кг, обладающий выраженным гепатотропным действием.

В клинической и патоморфологической картине интоксикации преобладала гепатотоксичность, анемия.

Система токсикологического контроля за безопасностью кормов при сочетанном их загрязнении микотоксинами и пиретроидами не разработаны.

С этой целью для разработки критериев оценки токсикологической безопасности кормов было изучено сочетанное действие Т-2 токсина и дециса на организм крыс.

В качестве исследуемого пиретроида использовали коммерческий препарат дельтаметрин, представляющий собой белый кристаллический порошок с Т.пл. 98оС. Водно-ацетоновый раствор дециса непосредственно вводили в желудок крысам. В качестве продуцентов микотоксинов использовали грибы *Fusarium sporotrichiella*, штамм 15м, предоставленный Котиком А.Н., и *Aspergillus flavus* из коллекции ФГНУ ВНИВИ (г. Казань). Введение микотоксинов осуществляли орально в виде 5%-го водноспиртового раствора.

При пероральном введении Т-2 токсина в сочетании с децисом в дозе ЛД50 отмечался синергизм в действии токсических веществ и гибель всех животных, взятых в опыт, происходила в течение 48 часов, в отличие от контрольных, где погибало только 50% крыс.

Опыты показали, что при однократном комбинированном введении внутрь Т-2 токсина и дециса в дозах ЛД50 клиническая картина интоксикации была следующая: возбуждение быстро сменялось угнетением, отказ от корма, вялость, усиление легочного дыхания. По мере развития клинической картины у крыс наблюдали мышечную слабость, шаткость походки и парез, преимущественно, задних конечностей. Затем возникали парезы и передних конечностей, и судороги. В этот период

у них обнаруживали резко выраженные признаки легочной недостаточности, проявляющиеся одышкой и гибелью в стадии судорог.

При патологоанатомическом вскрытии в брюшной и грудной полостях обнаружена несвернувшаяся кровь темно-коричневого цвета. Слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта усеяны многочисленными кровоизлияниями. Печень, темно-вишневого цвета, увеличена в объеме, легко рвется при надавливании, края притуплены. Полости сердца кровонаполнены, в области миокарда геморрагические инфаркты. В головном мозге отек и кровоизлияния.

В процессе субхронической интоксикации определяли активность аспаратаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) при пероральном введении Т-2 токсина и дециса в дозе 1/10 ЛД50 в течение недели. Активность АСТ на 2-й, 3-й и 4-й день в результате ежедневного введения дециса повышалась на 27, 22 и 14% соответственно и нормализовалась на 5-й день, а активность АЛТ на 2-й день от начала введения дециса была повышена на 52%, на 3-й и 4-й день на 33 и 28%. При введении Т-2 токсина активность АСТ возрастала на 3-й, 4-й и 5-й день на 12, 23 и 46% соответственно, активность АЛТ на 25, 77%.

Повышение активности аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы при отравлении децисом и Т-2 токсином может быть результатом ускорения процессов синтеза, повышения проницаемости мембран, вызывающих изменения биохимических показателей печени.

При сочетанном воздействии Т-2 токсина с децисом в дозах 1/10 ЛД50 происходило потенцирование токсического эффекта, что характеризовалось наибольшим снижением массы тела, более выраженными гематологическими изменениями, нарушениями биохимических показателей крови, чем при отравлении животных этими ядами в отдельности.

При раздельном введении Т-2 токсина, дециса и при их сочетании в дозе 1/10 ЛД50, прирост живой массы белых крыс был на уровне интактных животных.

Наблюдалось уменьшение на 17 и 20% количества гемоглобина на 10 и 20 сутки при затравке Т-2 токсином, децисом – на 16 и 9%, при сочетанном воздействии – на 11 и 17%. Аналогичное уменьшение происходит и в количественном содержании эритроцитов. В целом сочетанное воздействие токсикантов незначительно усугубляло отрицательное действие на гематологические показатели при раздельном их применении, существенно не влияло на содержание общего белка и белковых фракций, лишь к 20 дню в третьей группе зафиксировано достоверное снижение глобулинов. Следует отметить увеличение СОЭ во всех группах.

При совместном введении Т-2 токсина и дециса в дозе 1/10 ЛД50 в течение 20 дней происходил падеж 16% животных, в группе с Т-2 токсином падежа крыс не было. В целом, при совместном введении Т-2

токсина и дециса происходило ухудшение общего состояния животных, некоторых гематологических и биохимических показателей.

Таким образом, Т-2 токсин и децис при сочетанном введении усугубляют токсическое действие друг друга, проявляя синергизм, что следует учитывать при лечении и профилактике интоксикаций, вызываемых одновременным поступлением их в организм, разработке нормативных документов по качеству и безопасности сельскохозяйственной продукции.

ВЛИЯНИЕ ГИПОХЛОРИТА НАТРИЯ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ОБЩЕГО БЕЛКА, АЛЬБУМИНА И АКТИВНОСТЬ АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЦЫПЛЯТ ПРИ Т-2 ТОКСИКОЗЕ

Труфанова В.А.¹, Костюк О.О.²

¹ *Институт птицеводства Украинской академии аграрных наук
пос. Борки, Харьковская обл., Украина*

² *Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина
Харьков, Украина*

В последние годы в связи с интенсивным развитием животноводческой отрасли сельского хозяйства увеличился уровень производства и потребления кормов на основе зерна и зернопродуктов. Контаминация кормов плесневыми грибами и их токсичными вторичными метаболитами, микотоксинами, является проблемой мирового масштаба [Bennett J. W., Klich M., 2003]. В Украине чаще всего регистрируют случаи контаминации зерна Т-2 токсином, который является одним из наиболее опасных представителей группы трихотеценовых микотоксинов [Котик А. Н., 1999; Труфанова В. А., 2004]. Т-2 токсин ингибирует синтез белка в эукариотической клетке, связываясь с 60S-субъединицами рибосом [Hobden A. N., Cundliffe E., 1980]. Одним из основных симптомов Т-2 токсикоза является некротическое поражение слизистых оболочек ротовой полости. Также наблюдается задержка роста, снижение продуктивности, нарушение функций иммунной системы и увеличение смертности. В сыворотке крови отмечают повышение активности аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, креатинкиназы и лактатдегидрогеназы, а также снижение концентрации общего белка [Roffe T. J. et al., 1989].

Существуют различные подходы к профилактике микотоксикозов, которые заключаются в мониторинге содержания микотоксинов в кормах, а также в применении препаратов, снижающих их концентрацию. В качестве таких препаратов используют сорбенты [Kubena L. F., 1997] и

ферментативные препараты [Gardner P. et. al., 1992]. Одним из перспективных методов профилактики Т-2 токсикоза является применение препарата гипохлорита натрия [Труфанова В. А. и др., 2001; 2004]. В основе его профилактического действия при Т-2 токсикозе лежат несколько механизмов: гипохлорит натрия окисляет Т-2 токсин, что приводит к снижению его токсичности; являясь донором активного кислорода, гипохлорит натрия активизирует процессы микросомального окисления ксенобиотиков, в том числе Т-2 токсина; благодаря бактерицидным свойствам, гипохлорит натрия нормализует состояние микрофлоры кишечника; гипохлорит натрия воздействует на некоторые сигнальные пути клеток, что лежит в основе его проапоптотического действия.

Целью данной работы было изучение влияния препарата гипохлорита натрия на концентрацию общего белка, альбумина и активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови цыплят при экспериментальном Т-2 токсикозе.

Опыт проводили на цыплятах породы род-айленд в течение 45 дней с суточного возраста. Цыплята были разделены на пять групп по шестнадцать голов в каждой. Первая группа – контрольная, цыплята второй-пятой групп получали корм с содержанием Т-2 токсина 4 мг/кг корма. Раствор гипохлорита натрия выпаивали цыплятам третьей-пятой групп в концентрации 5, 10 и 15 мг/л соответственно.

Скармливание цыплятам корма, содержащего 4 мг/кг Т-2 токсина, приводило к снижению концентрации в плазме крови общего белка и альбумина, а также повышению активности аланинаминотрансферазы. Выпаивание цыплятам гипохлорита натрия в концентрации 5 и 15 мг/л нормализовало содержание общего белка и альбумина и активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови. Эти данные согласуются с результатами проведенных ранее исследований, касающихся профилактического действия растворов гипохлорита натрия при Т-2 токсикозе цыплят [Труфанова В. А., Котик А. Н., 2004].

КОНТАМИНАЦИЯ МИКОТОКСИНАМИ КОРМОВ ДЛЯ ПТИЦЫ

Труфанова В.А., Котик А.Н., Чорна А.В.

*Институт птицеводства Украинской академии аграрных наук
пос. Борки, Харьковская обл., Украина*

В течение восьми лет (1996–2003) в лаборатории микотоксикологии Института птицеводства УААН был проведен анализ 1129 образцов различных видов кормов из птицеводческих и комбикормовых предприятий двенадцати областей Украины и АР Крым. Из них 499 (44,2%) содержали микотоксины. В 181 (16%) образце обнаружен Т-2 токсин в

концентрациях 20–600 мкг/кг и в 318 (28,2%) – неидентифицированные микотоксины (НИМТ) в концентрациях, эквивалентных 20–400 мкг/кг Т-2 токсина (НИМТ – микотоксины, проявляющие антибиотическую активность относительно тест-микроорганизма *Candida pseudotropicalis* 44 пк, чувствительного к трихотеченовым микотоксинам типа А и нафтохиноновым соединениям). В двух образцах пшеницы и образце ячменя обнаружили зеараленон (120 мкг/кг), дезоксиниваленон (170 мкг/кг) и аурофузарин (80–100 мкг/кг), соответственно; в образце соевого шрота обнаружен флатоксин В1 (20 мкг/кг). Из 399 исследованных образцов комбикормов 214 были контаминированы микотоксинами. Каждый пятый образец содержал Т-2 токсин и каждый третий – НИМТ. Наиболее часто Т-2 токсин обнаруживали в образцах кукурузы, ячменя и овса, а НИМТ – в образцах овса и подсолнечного шрота. Максимальные концентрации Т-2 токсина (660 и 600 мкг/кг) были обнаружены в комбикорме и овсе, а НИМТ (440 и 400 мкг/кг) – в подсолнечном шроте и овсе, соответственно. Большая часть образцов содержала Т-2 токсин (92%) и НИМТ (97,1%) в концентрации до 200 мкг/кг.

В случаях контаминации корма Т-2 токсином у птицы наблюдалось снижение сохранности и значительное ухудшение продуктивности. В большинстве случаев наличие Т-2 токсина в корме сопровождалось массовыми проявлениями некротического стоматита (у 60–100 % поголовья). Необходимо отметить значительное увеличение регистрации случаев Т-2 токсикоза у птицы в течение 1996–2003 годов (14 случаев), по сравнению с периодом с 1973 по 1995 гг. (7 случаев).

Высокая частота случаев контаминации кормов микотоксинами и регистрации Т-2 токсикоза птицы характерна не только для Украины. Результаты наших наблюдений согласуются с данными, полученными другими исследователями. В период с 1987 по 92 год было проведено исследование 272 образцов овса из юго-западных районов Германии (Muller H. M. et al., 1998). Уровень контаминации Т-2 токсином (20–244 мкг/кг) достигал 27–61%. Во Всероссийском научно-исследовательском ветеринарном институте с 1990 по 1997 год было исследовано более 1500 образцов кормов и зернопродуктов, поступивших из 35 областей России, Украины, Казахстана, Беларуси, а также из США, Канады и других стран. В 12,5% проб был обнаружен Т-2 токсин (Тремасов М.Я. и др., 1997). В России в отдельных регионах центральных областей и на Урале загрязненность проб свежесобранного зерна Т-2 токсином (30–200 мкг/кг) достигала 80%. Достаточно часто Т-2 токсин обнаруживали в жмыхах и шротах (Смирнов А.М. и др., 1999).

О значимости проблемы не только для Украины, но и для большинства европейских стран, свидетельствует осуществленная в течение 1999–2002 гг. совместная акция ЕС “Мероприятия по контролю качества в производстве, направленные на снижение контаминации продовольственного и фуражного зерна фузариотоксинами” (Scholten O.E., 2002).

Глава 6.

ГРИБНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ – ЭПОХА НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ШТАММОВ *GANODERMA LUCIDUM* (CURT.: FR.) P. KARST

Автономова А.В., Завьялова Л.А.,
Гарибова Л.В., Краснополская Л.М.
ГУ НИИНА имени Г.Ф. Гаузе РАМН

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова
Москва

Трутовик лакированный, *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst., называемый в Японии Рейши, а в Китае и Корее Линг Цзи, обладает выраженным иммуномодулирующим действием, показывая противоопухолевую, гепатопротекторную, противовирусную активности. Существует несколько способов получения биологически активных субстанций из грибов. Во-первых, в настоящее время основным поставщиком биологически активного материала являются плодовые тела *G. lucidum*. Во-вторых, в медицинских целях используют вегетативный мицелий *G. lucidum*, который получают методом погруженного культивирования. При этом важным этапом и в погруженном культивировании, и в выращивании плодовых тел является поддержание культур на плотных агаризованных средах. Нельзя забывать и об этапе выбора штамма гриба, который является ключевым моментом в процессе получения максимального количества биологически активного материала в наиболее сжатые сроки. Поэтому для разработки получения эффективных лечебных средств необходимо, имея коллекцию штаммов лекарственного гриба, всесторонне изучить физиологию штаммов.

В нашей работе были исследованы десять штаммов *G. lucidum* различного происхождения из коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных соединений НИИ по изысканию новых антибиотиков РАМН и кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова. Изучали физиологические особенности питания, скорость роста и морфологию штаммов *G. lucidum* при выращивании на различных твердых агаризованных средах и жидких средах в погруженной культуре.

Для получения целостной картины морфологических особенностей штаммов *G. lucidum* морфология колоний была изучена на 7 натуральных и полусинтетических плотных средах, в которых был подобран широкий спектр источников питания. На всех исследованных средах обнаружены штаммовые различия по морфологии колоний, и колонии одного и того же штамма на разных средах зачастую имели морфологические различия. Однако каждый из штаммов имел один или несколько признаков, которые можно было обнаружить сразу на нескольких средах. Штаммы 1, 6 и 7 практически на всех средах очень быстро образовывали желтый

пигмент в центре колонии, причем в центре колоний штаммов 6 и 7 достаточно быстро образовывалась твердая корка. Штамм 3 на твердых средах образовывал неровный, «рваный» край. Штамм 5 образовывал незональную колонию, быстро превращающуюся в очень плотную, кожистую пленку, которую сложно разрезать. Аналогичную пленку с возрастом образовывали все исследованные штаммы. Колонии штамма 10 на всех средах в центре были прижатыми. Штаммы 2 и 4 зачастую образовывали сходные зональные колонии порошистые в центре с прижатым мицелием, к краю приподнятые ворсистые или нитчато-ворсистые, однако зональность у них проявлялась на разных средах. Штамм 8 формировал незональные колонии на всех средах, кроме одной. Штамм 9 образовывал колонии, которые имели, как правило, к краю отчетливую ворсистую текстуру.

Питательные потребности штаммов оценивались по скорости роста и морфологии колонии на предложенных плотных средах. Максимальный рост всех штаммов был отмечен на натуральных средах. Для большинства штаммов лучшие показатели скорости роста были выявлены на средах сусло-агар и пшеничный агар с кукурузным экстрактом. Результаты, полученные при выращивании на плотных средах, позволили разделить изученные культуры *G. lucidum* на две группы: быстро- и медленнорастущих штаммов. Данные опытов показывают, что соотношение скоростей роста штаммов на разных средах незначительно изменилось только в пределах выделенных групп быстро- и медленнорастущих штаммов. Однако на некоторых средах, демонстрируя достаточно высокую линейную скорость роста, штамм 3 занимал промежуточное положение между этими двумя группами.

Проведение сравнительной характеристики скорости роста и накопления биомассы штаммов *G. lucidum* в погруженной культуре осуществляли на полусинтетической среде. В результате опытов были получены результаты, позволяющие говорить о том, что разделение штаммов на медленно- и быстрорастущие является актуальным и для выращивания в погруженной культуре. Практически все штаммы, которые были отнесены нами в разные группы по скорости роста на плотных средах, сохраняли свое положение и при выращивании в погруженной культуре. Однако, штамм 8, находящийся в группе быстрорастущих штаммов при выращивании на плотных средах, в погруженной культуре оказался среди штаммов медленнорастущих. Штамм 3, занимающий промежуточное положение по скорости роста на плотных средах между быстро- и медленнорастущими штаммами, в погруженной культуре имел высокую скорость роста. Штаммы 4 и 5, являющиеся лидерами по скорости роста на плотных средах, сохраняли свое положение и при погруженном культивировании.

В целях исследования пищевых потребностей штаммов *G. lucidum* в погруженной культуре были изучены шесть ферментационных сред,

различающиеся сочетанием двух источников углерода и трех источников азота. Критерием оценки пищевых потребностей гриба служило накопление биомассы.

Результаты проведенного эксперимента показали, что существуют штаммовые различия в пищевых потребностях *G. lucidum*. У штаммов 1, 2, 9 и 10 накопление биомассы в большей степени зависело от источника углерода. Накопление биомассы штаммов 2 и 9 очень незначительно зависело от источников азота. Штаммы 1 и 10 отдавали предпочтение только одному источнику азота. Накопление биомассы штаммов 6 и 8 находилось в зависимости в зависимости от источников азота. Штамм 6 не рос или очень плохо рос на средах содержащих в качестве источника азота – пептон. У штаммов 3, 4 и 7 обнаружена зависимость накопления биомассы в большей степени от источников азота, в меньшей – от источников углерода. Накопление биомассы штамма 5 проходило в зависимости от сочетаний источников углерода и азота.

Изучение физиологических характеристик штаммов *G. lucidum* позволило отобрать наиболее перспективные штаммы для разработки методов культивирования в целях получения биологически активного материала.

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ *LAETIPORUS SULPHUREUS* НА МОДЕЛИ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС

Агафонова С.В., Боровский Г.Б.,
Пензина Т.А., Яковлев А.Ю., Лепихова С.А.
СИФИБР СО РАН
ГУ НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН
Иркутск

Высшие базидиальные грибы в настоящее время применяются для получения биологически активных препаратов, обладающих широким спектром терапевтического действия. В настоящее время приоритетным является направление по изучению процессов, связанных с регуляции физико-биохимических процессов в период формирования грибного организма.

Экспериментально доказано, что абиотические факторы внешней среды оказывают прямое воздействие на увеличение активности биоантиоксидантов высших растений (*Physiologia Planterum*, 2004). Подобный факт широко изучен на примере низших эукариот, а также микромицетов. Известно, что такие факторы как световое излучение и его интенсивность, влажность, газовый состав воздуха оказывают как угнетающее так и стимулирующее действие на какие-либо фазы разви-

тия грибного организма или меняют его физиологические и биохимические показатели. Однако действие факторов среды на интенсивность биосинтеза биологически активных веществ у высших макромицетов все еще остается мало изученным.

Известно, что *Lartiporus sulphureus* является продуцентом целого спектра углеводов, обладающих антиокислительной и гензащитной способностью.

В начале исследования была поставлена задача изучить уровень антиоксидантной активности экстракта из плодовых тел *Lartiporus sulphureus*. Плодовые тела были собраны в природных ландшафтах Прибайкалья с контрастными параметрами экологических факторов – в эксперименте были использованы грибы из лесостепи, средней и темнохвойной тайги.

Для приготовления экстракта высушенные плодовые тела *Lartiporus sulphureus* растирались в ступке до состояния пудры. Полученную консистенцию заливали dd H₂O в пропорции 25 г порошка на 1000 мл выдерживали при комнатной температуре два часа. Полученный экстракт центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость стерилизовали путем ультрафильтрации. Поскольку из многих литературных источников известно, что действующим началом многих медицинских препаратов грибного происхождения оказывались моно- и полисахара, в полученных экстрактах определяли суммарное количество сахаров (табл.1).

Таблица 1. Суммарное количество сахаров в экстрактах из плодового тела *Laetiporus sulphureus*

Экстракт из плодового тела <i>Laetiporus sulphureus</i>	Суммарное количество сахаров г/100г
№1 – лесостепь	12,3-13,0
№2 – средняя тайга	24,0-24,6
№3 – темнохвойная тайга	46,3-46,6

Антиоксидантную способность изучали на крысах-самцах линии Wistar весом 210-260 г. Животных разделяли на следующие группы: 1-ая – животные, получавшие СС14 (патология); 2-ая – опытные животные получавшие на фоне гепатита экстракт №1 из плодового тела *Lartiporus sulphureus*; 3-я – опытные животные получавшие на фоне гепатита экстракт №2 из плодового тела *Lartiporus sulphureus*; 4-ая – на фоне гепатита экстракт №3 из плодового тела *Lartiporus sulphureus*; 5-ая – интактные животные.

Окислительный стресс вызывали токсическим поражением печени путем подкожного введения СС14(концентр), доза СС14 составила 0,5мл/100 г массы животного. Экстракт из плодовых тел *Lartiporus*

sulphureus вводили внутривенно в дозе 1мл/100г живого веса через 1.5 часа после введения СС14. Декапитацию животных и забор крови проводили на третьи сутки после введения экстракта. Для оценки влияния экстрактов на протекание окислительных процессов в организме крысы были использованы методики определения метаболитов радикальных реакций: малоновый диальдегид МДА в сыворотке крови. В результате исследования было показано снижение количества МДА под воздействием всех трех видов экстракта из плодового тела *Laetiporus sulphureus*. Содержание МДА в крови животных получавших экстракт № 3 снижалось в 2,5 раза в сравнении с экстрактом №1 и в 1,6 раз с экстрактом № 2.

Таблица 2. Количество МДА в сыворотке крови экспериментальных животных

Группа животных	Воздействия на животных	Количество МДА мкмоль/л
1	СС14+экстракт №1 – лесостепь	33,4-33,8
2	СС14+экстракт №2 – средняя тайга	21,6-22
3	СС14+экстракт №3 – темнохвойная тайга	13,4-13,6
4	Интактные животные	4.5-4.8
5	СС14	40.1-41.3

Все приведенные данные исследования АОА экстракта плодовых тел *Laetiporus sulphureus* выявили различие степени физиологической активности, а также строгой зависимости между степенью АОА, суммарным количеством сахаров и местом произрастания гриба.

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ PLEUROTUS OSTREATUS (JACQ. FR.) KUMM., АРОМАТИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ ГРИБА

*Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А.,
Осадчая О.В., Рожкова З.А.*
Институт микробиологии НАН Беларуси
Минск, Беларусь

Оценку окислительных свойств экстракта плодовых тел и глубинного мицелия проводили на модели окисления линолевой кислоты и восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола. Концентрация

сухих веществ (СВ) спиртовых экстрактов составляла 0,005 и 0,01%. Экстракты плодовых тел обладали высоким антиоксидантным действием даже при введении их в модельную систему в очень низкой концентрации (0,005% в пересчёте на СВ). Увеличение концентрации СВ до 0,01% не вызвало изменений в уровне антиокислительной активности. Несколько иная картина наблюдается при использовании в качестве биоантиоксидантов экстрактов мицелия гриба. Повышение концентрации СВ до 0,01% способствует более активному накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Спиртовые экстракты гриба *P. ostreatus* проявляют высокую антиокислительную активность и на модели 2,6-дихлорфенолиндофенола. Самая высокая активность отмечена у экстрактов из плодовых тел. Их эффект приближается к действию таких биологических препаратов, как аскорбиновая и никотиновая кислоты.

При экстрагировании в экстракт переходят соединения, относящиеся к различным классам веществ: белки, углеводы, низкомолекулярные SH- и NH₂-соединения, фенолы, липиды и др. В экстрактах *P. ostreatus* в большом количестве присутствуют, как показали наши исследования, фенольные соединения и соединения липидной природы. Важную роль в механизмах антиокислительной защиты играют липидорастворимые антиоксиданты, при этом сами липиды грибов чаще обладают сильными проантиоксидантными свойствами. По нашим данным, экстракты, очищенные от липидов хлороформом, проявляли более высокую антиокислительную активность. Прооксидантные свойства липидов плодовых тел проявлялись в меньшей степени, чем липидов мицелия. Можно полагать, что эти различия обусловлены как составом компонентов, входящих в жироподобную фракцию, так и некоторыми различиями в её жирно-кислотном составе. Спирторастворимые липиды исследуемых штаммов вешенки представлены на 79,6-83,2% ненасыщенными жирными кислотами, среди которых содержание С18:2 достигало в плодовых телах и глубинном мицелии 60,47 и 76,25%.

Исследование антиокислительной активности отдельных фракций спиртового экстракта (кислотной, фенольной, щелочной и нейтральной) показало, что наибольшим её уровнем обладала фенольная фракция.

Фенольные соединения являются классическими антиоксидантами. Антиокислительное действие их в значительной степени обусловлено способностью нейтрализовать активные формы кислорода и обрывать цепные свободно-радикальные реакции. Другой механизм антиокислительного действия может быть обусловлен способностью фенолов связывать ионы железа. Сравнительное изучение накопления фенольных соединений в плодовых телах и глубинном мицелии гриба *P. ostreatus* показало наибольшее их количество (1660 мг%) в плодовых телах. В фенольной фракции плодовых тел гриба методом двумерной хроматографии установлено наличие 7, мицелия – 5 веществ. Предварительная

идентификация соединений заключалась в определении их подвижности в ряде систем растворителей, регистрации цвета пятен в видимом и УФ- свете, изменения флуоресценции в УФ-свете после обработки специфическими реактивами.

В УФ свете все эти соединения давали окраску от голубой до фиолетовой, что характерно для соединений с ароматическим кольцом. Способность этих веществ давать цветные реакции с реактивами на фенольные соединения (диазотированная сульфоновая кислота, хлорное железо, хлористый алюминий, железоаммонийные квасцы, фосфорномолибденовая кислота, уксуснокислый свинец, раствор Вильсона) также дала основание отнести их к фенолам, и, в частности, к флавонам.

О принадлежности исследуемых соединений к группе фенолов мы судили и на основании спектральных характеристик. Все фенольные соединения обладают интенсивным поглощением в УФ- области спектра. Выделенные из плодовых тел и глубинного мицелия соединения имели минимумы поглощения в УФ- области при 238,3-261,5 нм, максимумы – при 257,5-278,2 нм, что характерно для о-гетероциклических соединений – флавоноидов [1,2].

ИК- спектроскопия подтвердила полученные результаты. Известно, что скелетным колебаниям бензольных колец флавоноидов соответствуют две полосы поглощения при 1600 и 1500 см⁻¹. Однако, полоса при 1600 см⁻¹ сильная у всех флавоноидов, полоса же при 1500 см⁻¹ сильная только у соединений из класса флавонов. Наличие сильной полосы при 1500 см⁻¹ позволяет рассматривать соединения, синтезируемые *P. ostreatus*, как флавоны.

Таким образом, нами показано, что в плодовых телах и глубинном мицелии *P. ostreatus* кроме известных физиологически активных соединений (белок, углеводы, полисахариды, минеральные элементы, витамины) содержатся низкомолекулярные фенольные соединения – флавоны. Многочисленными исследованиями доказано, что такие соединения используются для профилактики хронических процессов, вызываемых воздействием постоянно присутствующих во внешней среде радикализирующих факторов, таких как минеральная пыль, ксенобиотики, радиация [3,4]. Биологическая активность флавоноидов определяется наличием в их молекулах реактивных гидроксильных и карбонильных групп. Антиоксидантное действие флавоноидов в значительной степени обусловлено способностью перехватывать активные формы кислорода и другие свободные радикалы. Эти соединения являются эффективными антирадикальными агентами и ловушками анион- радикала кислорода. Тот факт, что флавоноиды могут связывать ионы металлов непосредственно в крови и тканях, а образующиеся металлокомплексы обладают ещё более выраженными по сравнению с исходными лигандами антирадикальными и цитопротекторными свойствами, позволяет заключить, что флавоноиды являются уникальными природными соединениями,

которые могут быть использованы как основа для создания антиоксидантных препаратов. Следовательно, гриб *P. ostreatus* (как плодовые тела, так и глубинный мицелий), содержащий уникальный комплекс биологически активных веществ, в т.ч. соединений фенольной природы, может быть использован для получения лечебно-профилактических препаратов широкого спектра действия.

Литература

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. – М.: Наука, 1993. – 272с.
 2. Бабицкая В.Г., Щерба В.В. Вещества фенольной природы некоторых базидиомицетов // Микробиология. – 1999. – Т. 68, № 1. – С. 70-73.
 3. Потапович А.И., Владыковская Е.Н., Костюк В.А. Флавоноиды как основа для создания антиоксидантных пищевых добавок // Национальная политика здорового питания в республике Беларусь: Материалы межд. конф., Минск, 26-27 апр. 2001. / МЗ РБ, 2001. – С. 271-275.
- Скворцова М.М., Горшина Е.С. Новые антиоксидантные и иммуномодулирующие препараты из культивируемых грибов // Физиология и биохимия культивируемых грибов: Материалы межд. науч. конф., Саратов, 6-8 июня 2002 г. / РАН. Ин-т биохимии и физиол. растений и микроорганизмов. – Изд. Саратов. университета, 2002. – С. 25-26.

ГЛУБИННЫЙ МИЦЕЛИЙ ГРИБА *PLEUROTUS OSTREATUS* – ОСНОВА НОВЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

*Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А.,
Осадчая О.В., Филимонова Т.В.*
Институт микробиологии НАН Беларуси
Минск, Беларусь

В настоящее время из-за ухудшения общей экологической ситуации сбор дикорастущих грибов ограничен. Именно поэтому во многих странах мира стали культивировать «одомашненные» виды: шампиньон, вешенку, кольцевик, опенок летний и другие.

Более прогрессивным способом получения грибов (биомассы) является их погруженное культивирование, к которому активно переходят в развитых странах мира. Вместе с тем, для дальнейшего продвижения в производство этого ценного способа важны исследования по сравнительному изучению химического состава глубинного мицелия и плодовых тел, т.к. по имеющимся данным в составе глубинного мицелия могут быть выявлены ценные соединения, отсутствующие в клетках при твердофазном культивировании.

Исследование химического состава глубинного мицелия 4-х штаммов гриба вешенка показало, что белок составляет 32,0-35,0%, в плодовых телах — 20,0-26,0%. Белок мицелия всех штаммов идентичен по аминокислотному составу. В нём в значительных количествах присутствуют лизин, треонин, валин, тирозин. Лимитирующими биологическую ценность оказались аминокислоты с разветвленной цепочкой — лейцин и изолейцин. Сравнительный анализ показал, что погруженное культивирование способствует повышению в белке лизина, валина, метионина. В глубинном мицелии, по сравнению с плодовыми телами, возрастает отношение незаменимых аминокислот к заменимым. Сумма незаменимых аминокислот также увеличилась с 30,8 до 42,6%. Как и в плодовых телах, в белке глубинного мицелия преобладают наиболее ценные и сбалансированные по аминокислотному составу альбумины, достигающие 74,5%.

Изучение жирно-кислотного состава общих липидов, выделенных из глубинного мицелия гриба р. Вешенка, выявило общую закономерность: значительное преобладание диеновой кислоты C18:2 и достаточно высокую степень ненасыщенности липидов. Сравнительный анализ состава липидов плодовых тел и глубинного мицелия показал следующее: глубинное культивирование способствует снижению в липидах насыщенных жирных кислот (C15:0, C16:0 и C18:0) с одновременным повышением ненасыщенных (C18:1 и C18:2). Количество кислоты C18:2 в плодовых телах составляет 52,0-62,0%, в глубинном мицелии — 58,0-65,0%. Сумма насыщенных жирных кислот — 20,4-31,1% и 15,2-20,8%, ненасыщенных — 69,0-79,6% и 79,2-84,8% (плодовые тела и глубинный мицелий соответственно).

В глубинном мицелии содержится больше липидов (7,0-8,0% против 4,2-5,7%) и фенольных соединений. Хитин-глюкановый комплекс присутствует в достаточно высоких количествах как в плодовых телах, так и в мицелии, хотя глубинное культивирование приводит к снижению этого показателя.

Проведенные исследования показали, что глубинный мицелий по всем важнейшим показателям (белок, липиды, ароматические соединения) превосходит плодовые тела.

В последнее время особую значимость приобретают углеводы ксилотрофных базидиомицетов, поскольку именно они — основа многих лекарственных препаратов. Кроме этого, углеводы цитозоля клеток грибов выполняют и множество других функций: резервную, осморегулирующую, регуляторную и протекторную.

Исследование углеводных компонентов грибов р. *Pleurotus* показало следующее: общее содержание углеводов в плодовых телах составляет 60,8- 62,0%, в глубинном мицелии — 52,1-56,8%. Глубинное культивирование приводит к снижению с 26,0-26,7% до 22,3-25,5% свободных углеводов цитозоля (водная фракция+водорастворимый полисахарид), структурных полисахаридов (с 34,1-36,0 до 29,8-31,3%) и хитина. Вме-

сте с тем в глубинном мицелии повышается количество водорастворимых полисахаридов — важнейшей составляющей углеводов.

Структурные полисахариды клеточной стенки плодовых тел и глубинного мицелия гриба *P. ostreatus* (кислотная и первая щелочная фракция) оказались гетерогликанами, II-я щелочная фракция углеводов как плодовых тел, так и глубинного мицелия — гомополисахаридом — глюканом. Водорастворимые полисахариды плодовых тел и глубинного мицелия гриба *P. ostreatus* являются гетерогликанами, основной мономер их — глюкоза. Вместе с тем, в полисахаридах плодовых тел установлено наличие ксилозы, в полисахаридах глубинного мицелия — маннозы и галактозы.

Гриб *P. ostreatus* синтезирует до 5-6 г/л экзополисахаридов, которые являются гетерогликанами с основным мономером глюкозой, также входит манноза и галактоза.

Сравнительный анализ углеводного состава глубинного мицелия и плодовых тел гриба показал, что в плодовых телах общее содержание углеводов несколько выше, однако по количеству структурно-функциональных полисахаридов, обуславливающих лечебно-профилактические свойства, глубинный мицелий превосходит последние более чем в 2 раза.

Близкий углеводный состав полисахаридов глубинного мицелия и плодовых тел дает основание полагать, что они имеют одинаковую структуру и будут проявлять аналогичный эффект.

В мицелии содержится значительное количество минеральных веществ, витаминов. Ценно и то, что он обладает сорбционной активностью.

Эксперименты по токсико-гигиеническому изучению сухого порошка глубинного мицелия выполнены на 4 видах лабораторных животных: белые мыши, белые крысы, морские свинки-альбиносы, кролики.

Установлено, что внутрижелудочное введение животным 5% водного раствора порошка в максимально возможных дозах (1,5-5 г/кг) не вызывает их гибели и каких — либо проявлений интоксикации. Глубинный мицелий не обладает раздражающим кожу и слизистые оболочки свойствами, сенсibiliзирующей активностью и является аллергобезопасным продуктом. В процессе 60 суточного эксперимента отмечено статистически значимое увеличение темпов прироста массы тела у опытных животных. Сдвиг в морфо-функциональном статусе сердечно-сосудистой системы не обнаружено. Не зарегистрировано существенных сдвигов со стороны красных клеток крови. Так, содержание гемоглобина в периферической крови и её цветной показатель у опытных животных не отличались от таковых у контрольных. Не отмечено также изменений в количестве эритроцитов, различий относительных коэффициентов массы селезёнки как одного из основных анатомо-функциональных депо эритроцитов, что может свидетельствовать об отсутствии возможного влияния порошка гриба на гемопоэтиче-

ские процессы в организме. Подострая интоксикация сухим порошком гриба вешенка характеризуется отсутствием сдвигов в количественном морфологическом статусе лейкоцитов периферической крови. Длительное внутрижелудочное введение сухого порошка вешенки не влияет на функциональное состояние печени подопытных животных. При этом не выявлено сдвигов в ферментативном статусе печени, характеризующем цитолитический синдром интоксикации (активность аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы сыворотки крови) в коэффициентах массы печени. Глубинный мицелий вешенки не включается в водно-солевой обмен организма и не вызывает изменений в функциональном статусе почек, не изменяет диурез, рН мочи, уровни белка в моче, не вызывает сдвиги в обмене мочевины и хлорид ионов. Содержание хлорид-ионов и мочевины в сыворотке крови на протяжении всего опыта у контрольных и опытных животных не имеет между собой статистически значимых различий.

Полученные результаты являются основанием рекомендовать глубинный мицелий гриба вешенка в качестве основы функциональных препаратов, которые могут использоваться для повышения биологической ценности продуктов питания по принципу обогащения и улучшения их вкусовых качеств.

АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЕ И ГЕНОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ *INONOTUS OBLIQUUS* И *PHELLINUS ROBUSTUS*

*Бабицкая В.Г.¹, Щерба В.В.¹, Иконникова Н.В.¹,
Бисько Н.А.², Митропольская Н.Ю.², Билай В.Т.²*

¹ Институт микробиологии НАН Беларуси
Минск, Беларусь

² Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины
Киев, Украина

Исследовали эндо- и экзо меланины, выделенные путем щелочной экстракции из биомассы грибов *Inonotus obliquus* и *Phellinus robustus*, которые были выращены на питательной среде в глубинных условиях. Изучение элементного состава выделенных и очищенных меланинов вышеупомянутых видов показало, что по содержанию в них углерода, азота и водорода они близки между собой. Аналогичная закономерность наблюдалась и в отношении количества метоксильных, алифатических и фенольных групп. По содержанию же карбоксилатов выявлены некоторые отличия: во внеклеточном меланине *I.obliquus* количество

карбоксильных групп составило 0,50, во внутриклеточном – 1,40%, у *Ph.robustus* – 0,66 и 1,28% соответственно. Анализ ИК-спектров экзо- и эндомеланинов показал присутствие в них одних и тех же полос поглощения. В составе внутри- и внеклеточных меланинов обнаружено значительное количество азота (4,90-5,90%).

Для изучения природы соединений, содержащих азот, эндо- и экзо- меланины подвергали кислотному гидролизу. Гидролизаты меланиновых пигментов содержали 17 аминокислот: лизин, гистидин, аргинин, аспарагиновую и глутаминовую кислоты, треонин, серин, пролин, глицин, аланин, валин, цистин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин. Сумма их в экзомеланине *I.obliquus* составила 36,40%, в эндомеланине – 32,20, у *Ph.robustus* – 24,68 и 27,39% соответственно. Таким образом, можно заключить, что экзо- и эндомеланины исследованных грибов незначительно отличаются между собой по физико-химическим свойствам и являются меланопротеидами. Гель-хроматография экзо- и эндомеланинов показала, что молекулярная масса меланинов *I.obliquus* составляла 35-50 кДа, *Ph.robustus* – 40-60 кДа.

Меланины, изолированные из обоих видов грибов проявляли антиокислительное и гепатопротекторное действие. Так, меланины *I.obliquus* и *Ph.robustus* при концентрации 20 мг/мл ингибировали реакцию пероксидазного окисления аминобифенолов. В качестве окисляемых продуктов были использованы бензидин и его метильные производные. Было установлено, что способность меланина, изолированного из *Ph.robustus*, ингибировать окисление о-дианизидина была ниже, чем у меланинов *I.obliquus*.

Наши данные показывают, что в условиях *in vitro* меланины исследованных видов ингибируют процесс метаболической активации о-дианизидина по пероксидазному пути окисления и проявляют антиокислительные свойства.

С целью изучения гепатопротекторных свойств меланинов *I.obliquus* и *Ph.robustus*, было исследовано влияние пигмента на процесс повреждения ДНК фага γ продуктами пероксидазного окисления о-дианизидина.

Полученные результаты свидетельствуют, что меланины, изолированные из *Ph.robustus* и *I.obliquus*, в концентрациях 3,1 мг/мл и 6,0 мг/мл соответственно, приводили к двукратному уменьшению повреждения ДНК, а в концентрации 8 и 20 мг/мл, соответственно, полностью ингибировали этот процесс.

Таким образом, установленные антиокислительные и гепатопротекторные свойства меланинов из *Ph.robustus* и *I.obliquus* свидетельствуют о перспективности использования их для создания новых антираковых препаратов.

СКРИНИНГ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ КОПРИНОИДНЫХ ГРИБОВ

Бадалян С.М.¹, Кьюз У.², Аветисян Г.К.¹

¹ Ереванский государственный университет, кафедра ботаники
Ереван, Армения

² Джордж-Август Университет Гёттингена, Институт лесной ботаники, Секция молекулярной биотехнологии древесины
Германия

Для преодоления негативного воздействия окислительного стресса на здоровье человека, приводящего к развитию онкологических заболеваний, сердечно-сосудистым патологиям, аллергии и другим болезням, необходимо получение эффективных препаратов, которые понижают или предохраняют ткани от процессов свободно-радикального перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Различные группы организмов (бактерии, грибы, водоросли, растения) способны синтезировать соединения с антиокислительным действием. Это придает важное значение поиску среди них новых источников природных антиоксидантов (Феофилова, 1994).

Известно, что антиокислительная способность обуславливается наличием антиоксидантов с ярко проявляющейся способностью к обрыву цепи свободно-радикального окисления, а также наличием защитных соединений препятствующих стрессовым воздействиям на мембраны. Защита живых клеток от активных форм кислорода осуществляется присутствием ряда ферментов – супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, наличием некоторых низкомолекулярных и фенольных соединений, эндогенных тиолов и полимерных пигментов меланина.

Грибы, в частности ксилотрофные макромицеты в свою очередь способны к инициации реакций ПОЛ и свободнорадикальной деградации лигнина. Они обладают также механизмами антиоксидантной защиты, что имеет большое адаптационное значение для этих грибов (Капич, 1993).

Существующие сведения об антиоксидантной активности (АОА) коприноидных грибов немногочисленны. Способность подавления реакции ПОЛ отмечается лишь у некоторых видов, таких как *Coprinus comatus*, *Coprinus disseminatus* и *Coprinus micaceus* (Pan, Ye; 1997; Badalyan, 2003). Это и определило выбор в качестве объектов для наших исследований 7 штаммов пяти видов коприноидных грибов: 3 штамма *C. comatus* (1С, 108С, 53С) и по одному штамму *C. disseminatus* (30), *Coprinus domesticus* (72С), *Coprinus micaceus* (10) и *Coprinus radiatus* (22С). Три штамма (*C. comatus* 1С, *C. micaceus* и *C. disseminatus*) были выделены из плодовых тел, собранных на территории Армении, а остальные – получены из коллекции культур Гёттингенского университета (Германия).

Мицелиальные культуры исследованных видов выращивались на жидком 7^о неохмеленном пивном сусле, разбавленном водой (1:4) с рН=5.5 в течение 28 суток при температуре 25°C. Часть мицелиальной биомассы (МБ), отделенная фильтрованием от культуральной жидкости (КЖ), высушивалась после трехкратного промывания дистиллированной водой. Оставшаяся часть мицелия экстрагировалась этанолом. При тестировании использовали водный раствор сухого мицелиального экстракта (МЭ) и водную суспензию МБ. Образцы КЖ были взяты в концентрации 0.1 мл, а образцы МБ и МЭ в двух концентрациях – 5 и 10 мг/мл.

Активность изученных грибных образцов в качестве антиоксидантов проверялась на 7, 14, 21 и 28 сутки роста мицелия.

Степень АОА определялась по скорости ПОЛ в Fe+2-индуцируемой системе в гомогенате мозга самца крысы (Kitazawa, Iwasaki, 1996). По интенсивности окраски триметилового комплекса, содержащего одну молекулу малонового диальдегида (МДА) – конечного продукта ПОЛ и две молекулы тиобарбитуровой кислоты, рассчитывали АОА в процентном соотношении (Бадалян и др., 2003).

Анализ образцов КЖ, МБ и МЭ, полученных на 7 и 14 сутки роста мицелия показал полное отсутствие в них АОА. Активность определялась лишь в образцах 21 и 28 суток.

Согласно результатам опытов наиболее высокие показатели АОА (до 44%) были выявлены у образцов МЭ исследованных грибов. Высокий уровень активности (31-44%) был отмечен у *C. disseminatus*. Для двух исследованных штаммов *C. comatus* (1С и 53С) в тестированных концентрациях МЭ, в частности у образцов полученных на 21 сутки культивирования мицелия зарегистрировались относительно высокие показатели АОА – 42 и 44%, соответственно при 5 и 10 мг/мл. Однако, высокая активность (42%) штамма 108С была отмечена начиная с 28 суток роста при концентрации 5мг/мл. Повышение концентрации до 10 мг/мл не действовало на уровень активности образцов 21 суток, тогда как на 28 сутки это приводило к снижению уровня АОА. Среди штаммов *C. comatus* высокой активностью выделился армянский штамм 1С. Незначительная активность отмечалась у *C. radiatus* (23-28%), а у *C. micaceus* она вовсе отсутствовала. МЭ *C. domesticus* был тестирован только на 28 сутки роста. Он проявил 39% АОА при 5 мг/мл.

Активность была очень низкой или отсутствовала у образцов МБ всех тестируемых видов.

Сравнительно высоким уровнем АОА обладали образцы КЖ видов *C. domesticus* (32%), *C. radiatus* (30%) и *C. disseminatus* (24%). Между тем, у *C. micaceus* уровень активности не превышал 16.2%. АОА почти не была обнаружена в КЖ трех штаммов *C. comatus*. Исключение составил тот же армянский штамм *C. comatus* 1С, у которого на 28 сутки роста в дозе 10 мг/мл была отмечена 50% АОА.

Таким образом, апробированные мицелиальные образцы некоторых коприноидных грибов в качестве антиоксидантов обладали определенной активностью. Она была сравнительно высокой у образцов ЭМ. При этом, не проявлялось значительных различий в степени АОА между образцами, полученными на 21 и 28 сутки культивирования. Не выявилась определенная корреляция между уровнем АОА и испытанными концентрациями антиоксиданта. Однако, можно сказать, что при концентрации 5 мг/мл показатели АОА были сравнительно высокими.

Итак, учитывая приведенные данные, из исследованных коприноидных видов *C. comatus*, *C. disseminatus*, *C. domesticus* и *C. radiatus* являются перспективным источником антиоксидантов и их можно рекомендовать для дальнейших, более детальных исследований с целью получения биопрепаратов или пищевых добавок с антиоксидантным действием.

Работа была выполнена при поддержке Министерство образования и науки Армении (номер гранта 0104), а также грантов NATO (# FEL. RIG. 980764), DAAD (# 548.104401.174), ANSEF (# 04-NS-biotech-814-73). Проф. У. Кьюз (U. Kües) выражает благодарность Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU) за финансовую поддержку.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ ГРИБОВ ИЗ ПОРЯДКА APHYLLOPHORALES

Бадалян С. М., Сакеян К.З.

Ереванский государственный университет, кафедра ботаники
Ереван, Армения

Поиск новых природных источников физиологически активных соединений с целью получения эффективных и безопасных биотех-продуктов является одной из важнейших задач современной биотехнологии. Лекарственные грибы (макромицеты), наряду с лекарственными растениями, представляют огромный потенциал в качестве источника биологически активных и химически ценных метаболитов, а также ферментов. Среди них выраженной физиологической активностью особенно отличаются дереворазрушающие грибы – возбудители белой и бурой гнили древесины *Fomes fomentarius* (L.) Fr., *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst., *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, *Pleurotus ostreatus* (Jack.: Fr.) Kumm., *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Karst., *Trametes versicolor* (Fr.) Qu l., *Schizophyllum commune* Fr.: Fr. и др. Многие из этой группы грибов способны к синтезу различных биоактивных вторичных метаболитов (полисахариды, терпеноиды, стероидные соединения и др.), обладающих широким спектром терапевтического действия (иммуномодулиру-

ющее, антибактериальное, антифунгальное, гипогликемическое, цитотоксическое, антиоксидантное и др.).

С точки зрения биотехнологического культивирования эти организмы являются весьма перспективными. Они легко выделяются, быстро растут и образуют плодовые тела в культуре. Сведения об их использовании в традиционной медицине в качестве лекарственных (противовоспалительное, болеутоляющее, ранозаживляющее, тонизирующее и др.) средств в виде эликсиров, порошков и экстрактов встречаются в старинных рукописях и рецептах во многих странах мира (Китай, Япония, Северная и Центральная Америка, Африка).

Результаты современных мико-фармакологических исследований установили огромный потенциал лекарственных грибов для получения новых препаратов и пищевых биодобавок. Целью начатого нами проекта является изучение лекарственных свойств и био-экологических особенностей культур некоторых базидиальных афиллофоровых макромицетов с оценкой их биотехнологического потенциала.

В нашу скрининговую программу были включены мицелиальные культуры видов *Daedalea quercina* (L.) Pers., *Fomes fomentarius* (L.) Fr., *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murr., *Piptoporus betulinus* (Bull. : Fr.) Karst из семейства *Coriolaceae* и *Ganoderma lucidum* (Curt. : Fr.) Karst., *G. applanatum* (Pers.) Pat. из семейства *Ganodermataceae* порядка *Aphyllphorales*. Среди них наиболее многочисленными являются сведения о лекарственных свойствах видов рода *Ganoderma* (*G. lucidum*, *G. applanatum*, *G. pfeifferi*, *G. resinaceum*). Эти грибы издавна используются в народной медицине в качестве болеутоляющего и жаропонижающего, седативного и тонизирующего средства при различных острых и хронических заболеваниях, для усиления жизненной активности и т. д.

Лакированный трутовик – *G. lucidum* (Рейши, Линг Зи) относится к числу наиболее известных и хорошо исследованных лекарственных грибов. Более 2000 лет в Китае и других азиатских странах его считают «Грибом бессмертия», «Эликсиром жизни» или «Императорским грибом». В традиционной медицине *G. lucidum* широко используется при гепатопатии, хроническом гепатите, нефрите, гипертензии, артритах, невралгии, бронхите, астме, при желудочных язвах, нарушениях функции печени и т.д. Есть сведения о том, что экстракт *G. lucidum* предотвращает опасность окисления клеточной ДНК.

Научные исследования показали, что фармакологические свойства *G. lucidum* присваиваются различным соединениям, таким, как полисахариды, тритерпены, стеролы, протеины, стероиды, алкалоиды и др.

Полисахариды (β -D-глюканы), выделенные из этого гриба обладают антиопухоловой и иммуномодулирующей активностью. Есть данные о том, что модификация D-глюкозиловой группы латеральной цепи этих глюканов приводит к повышению их антиопухоловой активности.

Из *G. lucidum* было изолировано около 100 тритерпенов, включая тритерпены ланостанового типа (ганодероиды, ганодереноиды, луциде-

новая и ганолуциденовые кислоты). Они оказывают адаптогенное и антигипертензивное, а также антиаллергическое, гепатопротективное, противовирусное, антибактериальное, антифунгальное и антиоксидантное действие. Иммуномодулирующими и антиаллергическими свойствами, а также митогенным эффектом обладает выделенный из *G. lucidum* протеин LZ-8.

Антиопухолевые и противовоспалительные свойства *G. lucidum* ассоциируются с его иммуномодулирующей активностью. Активные метаболиты стимулируют макрофаги, NK- и T- клетки, приводящие к продукции цитокинов (интерфероны, интерлейкины и α -фактор некроза опухоли).

Другой исследуемый нами вид из рода *Ganoderma* является *G. applanatum* (Трутовик плоский) также обладает антиревматической, антиопухолевой и иммуномодулирующей активностью. Известно, что стероидные соединения этого гриба оказывают антибактериальное и противовирусное действие. Причем, экстракт *G. applanatum* проявляет большую активность в отношении грамположительных бактерий.

Что касается лекарственных особенностей и фармакологического действия видов *F. fomentarius* (Трутовик настоящий), *L. sulphureus* (Трутовик серно-желтый), *P. betulinus* (Березовая губка) и *D. quercina* (Дубовая губка), то они сравнительно немногочисленны. Эти грибы имеют древнюю историю использования в лечении и предотвращении многих болезней, о чем свидетельствует находка в Альпах плодовых тел *F. fomentarius* и *P. betulinus* вместе с телом Снежного человека.

В современной научной литературе сообщается об иммуномодулирующей, антифунгальной, антиопухолевой, антибактериальной и противовирусной активности *F. fomentarius*, *L. sulphureus* и *P. betulinus*. По некоторым данным, белое кристаллическое вещество, выделенное из культуральной жидкости *L. sulphureus* обладает антибактериальным свойством в отношении *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *B. pumilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Comamonas terrigena* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Выявлено, что мицелий гриба *L. sulphureus* содержит разные фракции каротиноидов, обладающих антиоксидантным, радиопротекторным и противовирусным свойствами. Активные метаболиты *L. sulphureus* обладают также галюциногенным эффектом.

Отмечена способность *F. fomentarius* ингибировать рост *P. aeruginosa* и *Serratia marcescens*. Помимо этих бактерий Березовая губка подавляет также рост *S. aureus*, *B. subtilis* и *Mycobacterium smegmatis*. Последний является родственным видом патогенной бактерии *Mycobacterium tuberculosis*.

По сравнению с другими видами данные о лекарственных свойствах *D. quercina* весьма скудны. Сообщается лишь о ее иммуномодулирующей активности. Сообщается также об инсектицидном действии *D. quercina* и *F. fomentarius*.

Таким образом, дальнейшее исследование биотехнологического потенциала отмеченных лекарственных грибов, налаживание процессов их культивирования является перспективным с целью получения новых грибных биопрепаратов и пищевых добавок.

Работа была выполнена при поддержке грантов Министерства образования и науки Армении (#0104), NATO (#FEL. RIG. 980764), DAAD (#548.104401.174) и ANSEF (#04-NS-biotech-814-73). Авторы выражают свою благодарность этим организациям.

БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИГНОТРОФНЫХ МЕДИЦИНСКИ ЗНАЧИМЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Белова Н.В., Яковлева Н.С.

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

Хорошо известные медицински значимые базидиомицеты, такие как *Pleurotus spp.*, *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Trametes spp.* и многие другие, относятся к группе ксилотрофных грибов, образующих белую гниль древесины. Эти виды грибов являются активными деструкторами древесины за счет деградации лигнина. Макромицеты, вызывающие белую гниль древесины, представляют гетерогенную в таксономическом отношении группу грибов с выраженной трофической приуроченностью к лигнинсодержащим субстратам, благодаря чему они способны утилизировать различные сельскохозяйственные и промышленные отходы. В то же время, поскольку мицелий и плодовые тела многих видов лигнотрофных базидиомицетов отличаются высокими пищевыми и целебными достоинствами, это создает условия для их промышленного получения при выращивании на различных отходах.

Начиная с середины XX века проводятся культурально-морфологические и биохимические исследования лигнотрофных базидиомицетов, благодаря установлению их способности к росту в и на различных субстратах, а также в связи с возможностью сохранения и поддержания их изолятов на вегетативной стадии в условиях коллекций чистых культур.

Возможность использования лигнинразрушающих базидиомицетов для создания профилактических и лечебных средств, стала реальной после многолетних фундаментальных исследований процессов их жизнедеятельности, характера и механизмов метаболической и ферментативной активности.

Многочисленные биохимические исследования лигнотрофных базидиомицетов позволили выявить их метаболические особенности. Были

выделены и изучены различные низкомолекулярные соединения, образующиеся в результате окислительных реакций на путях вторичного метаболизма у базидиомицетов. Присутствие этих веществ определяет запах, пигментацию и биологическую активность мицелия и плодовых тел у многих грибов белой гнили. Результаты этих исследований создали возможности для практического применения ряда видов базидиомицетов. В настоящее время некоторые виды лигнотрофных грибов используют для приготовления оздоровительных напитков, а также в ароматерапии (*Gloeophyllum odoratum*, *Marasmius* spp., *Lentinula edodes*). Установление характера биологической активности терпеноидных метаболитов у таких базидиомицетов как *Ganoderma lucidum*, *Inonotus obliquus*, *Oudemansiella mucida* и др. позволило предложить эти виды для создания лекарственных препаратов различного назначения на основе ганодерманов, инотодиола, муцидина.

К числу вторичных метаболитов лигнинразрушающих базидиомицетов относятся и их полисахаридные метаболиты. В настоящее время полисахаридные комплексы, нативные или в смеси с пептидами, из *Lentinula edodes*, *Trametes* spp., *Pleurotus* spp и ряда других видов лигнотрофов составляют основу фармацевтических препаратов, имеющих широкий спектр применения как в форме профилактических, так и лечебных средств.

Значительный интерес вызывает ферментативная активность лигнотрофных базидиомицетов. Для них характерен синтез различных внеклеточных гидролитических и окислительных ферментов. Секретируемые специфические протеазы с фибринолитической активностью отмечены у базидиомицетов из родов *Flammulina* и *Coprinus*; ферменты с молокосвертывающей активностью обнаружены у *Mycena pura*, *Irpex lacteus*, *Sparassis crispa*.

Известно, что среди гем-, флавин- и медь-содержащих окислительных ферментов лигнотрофных грибов, ведущая роль в деградации лигнинов принадлежит лигнин- и марганец пероксидазам и лакказам. Изучение оксидоредуктаз у ряда видов сем. Coriolaceae, Ganodermataceae и Strophariaceae показало, что большинство исследуемых видов продуцируют эти ферменты при поверхностном и погруженном культивировании. У грибов рода *Trametes* активность окислительных ферментов отмечается при глубинном выращивании уже на третьи сутки роста, и по мере расходования сахаров активность возрастает, при этом среда значительно закисляется. Виды рода *Ganoderma* в зависимости от способа культивирования образуют различные комплексы оксидоредуктаз. Среди базидиомицетов рода *Pholiota* выявлены как лигнотрофные виды – *Pholiota adiposa*, *Pholiota aurivella* var. *cerifera*, *Pholiota nameko*, образующие окислительные ферменты, определяемые по бензидину и синрингалдазину при поверхностном и погруженном культивировании, так и виды, не продуцирующие окислительные ферменты при различных условиях выращивания – *Pholiota flammans*, *Pholiota aurivella*. Установ-

лено присутствие лакказ, которые варьируют по физико-химическим характеристикам и структурным особенностям у базидиомицетов из различных таксонов, в результате исследования внеклеточных оксидаз у видов сем. *Coriolaceae* (*Cerrena* spp, *Coriolopsis* spp, *Trametes* spp).

Интерес к возможности практического применения окислительных комплексов лигнотрофных базидиомицетов связан с их способностью к электронному восстановлению кислорода до перекиси водорода или воды с одновременным окислением ароматических, преимущественно фенольных соединений, до соответствующих радикалов или хинонов, что чрезвычайно востребовано в настоящее время в различных отраслях промышленности и медицине.

Таким образом, направленные исследования медицински значимых лигнотрофных базидиомицетов наряду с их практическим использованием в качестве продуцентов различных метаболитов и ферментов для медицины позволяют изучать механизмы протеолиза и вторичного биосинтеза, характерные для грибных организмов в целом.

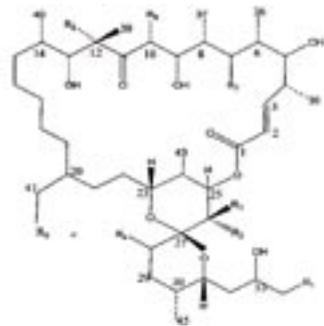
Исследования по сохранению лигнотрофных базидиомицетов *ex situ* поддержаны РФФИ, грант 3-04-49604; биохимические исследования базидиомицетов и их окислительных ферментов поддержаны ИНТАС, грант 03-51-5889.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ ОЛИГОМИЦИНОВ

Бибикова М.В., Грамматикова Н.Э., Спиридонова И.А., Даниленко А.Н., Катлинский А.В.

ФГУП “Государственный научный центр по антибиотикам”
Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова
Москва

В процессе поиска макролидных антибиотиков с антигрибной активностью нами были отобраны три культуры рода *Streptomyces*, продуцирующих различные комплексы антибиотиков олигомициновой группы. Штамм *Streptomyces* sp.14 продуцирует комплекс олигомицинов А, В и С, в соотношении 80 : 15 : 5. Штамм *Streptomyces* sp.17 является продуцентом комплекса олигомицинов – олигофуспина и олигомицина G в соотношении 90 : 10. Штамм *Streptomyces* sp.31 продуцирует комплекс олигомицинов – олигомицина А, В и F в соотношении 72 : 6 : 22 соответственно. Ниже приведена структура олигомицинов А-G и олигофуспина, которая показывает структурные отличия изучаемых соединений.



Олигомицин	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
A	H	CH ₃	H	H	OH	CH ₃	O	CH ₃
B	H	CH ₃	H	OH	OH	CH ₃	O	CH ₃
F	CH ₃	H	H	H	OH	H	O	CH ₃
G	H	CH ₃	H	H	OH	CH ₃	O	CH ₃
олигофуцин	H	CH ₃	H	H	OH	CH ₃	OH	H

Рис. 1. Химическая структура олигомицинов А-Г и олигофуцина.

При изучении антибиотической активности выделенных нами антибиотиков – аналогов олигомицина было установлено, что их МПК в отношении *Aspergillus niger 137a* составляют в мкг/мл для олигомицина А – 0,5, для В – 1,0, для F- 0,01, для олигофуцина – 0,5. В отношении *Candida albicans ATCC 885653* МПК составили 10 мкг/мл для олигомицина А и 0,1 мкг/мл для олигомицина F. Олигомицин В и олигофуцин не проявили активности в отношении *C. albicans*. Представляет интерес, что на среде без глюкозы МПК олигомицинов А и F в отношении *C. albicans* составляют 0,1 и 0,05 мкг/мл соответственно. Известно, что у дрожжевых культур количество митохондрий резко меняется при росте на различных субстратах. Их количество возрастает в присутствии глицерина, этанола и резко снижается при росте на глюкозе. Олигомицины, как ингибиторы АТФазы митохондрий, видимо в условиях ограниченного количества митохондрий проявляют повышенную активность. Более того, что на фоне глюкозы дрожжевые культуры образуют достаточное количество коэнзима Q, а без глюкозы его биосинтез ограничен. Можно предположить, что изучаемые антибиотики могут блокировать и биосинтез коэнзима Q. При этом олигомицин F проявляет более выраженную активность.

Для определения антибактериальной активности использовали культуры *Staphylococcus aureus ФЕСС 29213*, *Staphylococcus aureus 6538*, *Staphylococcus aureus 209P*, *Escherichia coli ATCC 25922*, *Bacillus subtilis*

ATCC 6633, *Bacillus subtilis Var Л2*, *Bacillus cereus Var mycoides НВ*, *Bacillus cereus Var mycoides luteus 537*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilis NCTC 8241*. Было установлено, что олигомицины А и В не проявляют антибактериальной активности. Олигофуцин подавляет рост этих штаммов в МПК более 50 мкг/мл. Значительная антибактериальная активность установлена у олигомицина F: МПК в отношении *B. subtilis* составила 10 мкг/мл, в отношении *B. cereus* и *B. pumilis* – 0,5-1,0 мкг/мл.

Изучаемые антибиотики изучались на наличие гипополипидемической активности, на модели гиперхолестеринемии кроликов. В условиях эксперимента, наиболее интересным оказался олигофуцин. Препарат-сырец не только снижал уровень холестерина в крови кроликов, но и значительно увеличивал количество липопротеидов высокой плотности в дозе 0,04 мг/кг. Олигомицин F, проявлял меньшую активность, олигомицины А и В в условиях *in vivo* не изучались.

Все препараты обладали выраженной иммунодепрессивной активностью, подавляя стимулированную ФГА бласттрансформацию лимфоцитов здоровых доноров в концентрациях 1-100 нг/мл. Олигофуцин стимулировал апоптоз трансформированных клеток и не оказывал влияние на покоящиеся.

Таким образом, небольшие структурные отличия между аналогами олигомицинов определяют значительные отличия их биологического действия.

ДРОЖЖЕПОДОБНЫЕ ГРИБЫ – ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК

Волчатова И.В., Медведева С.А.,
Беловежец Л.А.¹, Коломиец Э.И.²

¹Иркутский институт химии имени А.Е. Фаворского СО РАН
Иркутск

²Институт микробиологии НАН Беларуси
Минск, Беларусь

В качестве продуцентов лекарственных препаратов и биологически активных веществ грибы используются давно. Изучению лечебных свойств и способов культивирования высших грибов для биотехнологических целей посвящены десятки сообщений, представленных в 2004 г. на Втором Всероссийском конгрессе по медицинской микологии и Международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии». Подавляющее число работ при этом проведено с базидиальными грибами. Аскомицеты в качестве объекта такого изучения используются довольно редко. Целью данной

работы явилось исследование культуральных фильтратов двух штаммов дрожжеподобного гриба *Trichosporon cutaneum*.

Для исследований были взяты штаммы *Trichosporon cutaneum* (DeBeurm. et al.) Ota D-46 и *Trichosporon cutaneum* (DeBeurm. et al.) Ota 5. Культуры выращивали на жидкой минеральной среде в течение 5 суток. Биомассу отделяли фильтрованием.

Анализ культуральных фильтратов, проведенный на автоматическом анализаторе аминокислот ААА 339, выявил присутствие в них практически всех незаменимых аминокислот, в том числе дефицитных – лизина и метионина (табл.). Штамм *T.cutaneum* 5 отличался более широким набором свободных аминокислот и почти вдвое большей их концентрацией. Наибольший удельный вес пришелся на аланин (35,4-37,8% от общего содержания, в зависимости от штамма), цистин (18,2-18,3%), γ -аминомасляную кислоту (9,1-12,5%), валин (8,6-11,8%), глицин (6,3-7,8%).

Содержание аминокислот (нмоль/мл) в культуральных фильтратах грибов

	<i>T.cutaneum</i> D-46	<i>T.cutaneum</i> 5
Цистеиновая кислота	38,73	59,17
Глицин	92,59	126,98
Аланин	422,08	757,58
α -аминомасляная кислота	41,26	69,62
Валин	140,98	171,76
Цистин	218,18	363,64
Метионин	4,83	37,40
Изолейцин	19,11	57,33
Лейцин	13,23	44,97
Тирозин	29,59	53,25
Фенилаланин	22,06	52,95
γ -аминомасляная кислота	149,31	182,49
Орнитин		3,50
Лизин		16,39
Гистидин		5,97

Полученные результаты о количественном составе свободных аминокислот в культуральных фильтратах дрожжеподобных грибов могут стать предпосылкой к созданию новых функциональных препаратов, сочетающих питательную и лечебно-оздоровительную ценность, в частности, для парентерального питания.

СОРБЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ БИОМАССЫ МЕЛАНИНСИНТЕЗИРУЮЩЕГО БАЗИДИОМИЦЕТА *Phellinus robustus* M-10

Иконникова Н.В., Гончарова И.А., Ровбель Н.М.
Институт микробиологии НАНБ
Минск, Беларусь

Гриб *Phellinus robustus* (Karst.) Bourd. et Galz. (ложный дубовый трутовик) известен способностью накапливать в биомассе значительное количество пигмента меланина, обладающего антиоксидантными, генопротекторными, радиопротекторными, иммуномодулирующими, гепатопротекторными и другими лечебно-профилактическими свойствами. Штамм *Ph. robustus* M-10 хорошо рос в поверхностной и глубокой культуре на различных субстратах. Основная часть меланина (60-75%) легко выделялась из мицелия при щелочном гидролизе, образуя темно-коричневый осадок при подкислении гидролизата до pH 1,5-2,0. Основу непрогидролизованного остатка биомассы составлял меланин-хитиновый комплекс. При выращивании в колбах на качалке с глюкозо-пептонной средой цвет мицелия варьировал от светло-бежевого до темно-коричневого, а содержание в нем щелочерастворимого меланина колебалось от 1,5 до 16,3 %.

На оптимизированной питательной среде с добавлением ионов меди в условиях интенсивного аэрирования выход биомассы составлял 8-9 г/л, содержание меланина доходило до 29%. Гриб характеризовался способностью накапливать до 2 г/л меланина и в культуральной среде.

В поверхностной культуре на агаризованных питательных средах *Ph. robustus* M-10 синтезировал меланин более стабильно. Наибольшее количество пигмента накапливалось в мицелии при выращивании на свету (27-35%), в то время как в темноте грибок рос быстрее. После перенесения на свет чашек Петри с грибной культурой, выросшей в темноте, содержание меланина в биомассе возросло.

Меланин *Ph. robustus* M-10 представляет собой биополимер, основу которого составляют полифенольные структуры, связанные с пептидными цепями. Он обладает большим разнообразием функциональных групп (фенольные и алифатические гидроксилы, карбонильные, карбоксильные, метоксильные и аминогруппы), способных связывать ионы тяжелых металлов.

Сорбция ионов тяжелых металлов биомассой гриба с высоким содержанием меланина из растворов с низкой концентрацией (0,25 мМ) убывала в ряду: $Cd^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Pb^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+}$. Селективность связывания металлов была не столь велика, как у слабопигментированного мицелия была выше, чем и биомассы с высоким содержанием меланина. Сорбционная емкость последнего по отношению к катионам кадмия была лишь в 1,5 раза ниже, чем по отношению к катионам марганца. В низкой селективности извлечения тяжелых металлов ме-

ланинсодержащая грибная биомасса проявляла сходство с лигниновым энтеросорбентом «Полифепан», но величине сорбционной емкости превосходила его в 2,0-2,5 раза.

Меланинсодержащий мицелий *Ph. robustus* М-10 отличался высокой активностью связывания ионов трехвалентного железа. Коэффициент распределения (Kd) в системе мицелий – Fe³⁺ достигал 4000 мл/г, что было в 10–15 раз выше, чем Kd для двухвалентных катионов тяжелых металлов.

Сорбционная чистого меланина по отношению к изученным металлам на 25-40 % превосходила данный параметр нативного мицелия гриба. Из компонентов биомассы *Ph. robustus* М-10 наибольшую сорбционную активность проявлял щелоченерастворимый меланин-хитиновый комплекс, остающийся после извлечения из биомассы меланина. Сорбционная емкость данного комплекса по отношению к ионам меди превосходила сорбционную емкость чистых меланина и хитина в 2,3 и 4,7 раза соответственно.

Механизмы связывания тяжелых металлов грибными меланинами до сих пор остаются не до конца выясненными из-за сложности и многоплановости данного вопроса. Определенную информацию об изменениях химической структуры меланинов, происходящих в результате взаимодействия с металлами, можно получить, используя метод ИК-спектроскопии. Меланиновые пигменты, полифенольная природа которых обуславливает наличие системы полисопряжения с парамагнитными свойствами, и комплексы меланинов с ионами меди, железа и марганца могут быть исследованы также с помощью метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Сравнительный анализ ИК- и ЭПР-спектров чистого меланина (Н-форма) и пигмента, связанного с ионами меди до насыщения (Cu-форма) позволил сделать некоторые предположения о механизмах связывания тяжелых металлов меланином *Ph. robustus* М-10.

ИК-спектры Н-формы меланина изученного гриба характеризовались наличием интенсивных полос поглощения в области 1650-1600 см⁻¹, вызванных валентными колебаниями сопряженных двойных связей полифенолов, а также сильными пиками поглощения карбоксильных групп (1710-1210 см⁻¹).

Данные ИК-спектроскопии Cu-формы пигмента выявили существенную роль карбоксильных групп в сорбции ионов меди. В ИК-спектре меланина, связанного с ионами меди, наблюдалось изменение положения полос поглощения, характерное для образования металлоорганических соединений с участием карбоксилатов: уменьшение интенсивности полос поглощения валентных колебаний карбоксильных групп и увеличение поглощения в области 1600 и 1400 см⁻¹, свидетельствующее о присутствии карбоксилат-ионов, образующихся при замещении ионов водорода карбоксильных групп ионами металлов. Анализ ИК-спектров меланинсодержащей биомассы *Ph. robustus* М-10 до и пос-

ле сорбции меди также свидетельствовал об образовании карбоксилат-ионов, хотя изменения спектра биомассы после связывания меди были не столь очевидны и характерны, как у Cu-формы чистого меланина.

Данные ИК-спектроскопии Н- и Cu-форм пигмента позволяют судить о том, что механизмы сорбции тяжелых металлов грибным меланином кроме ионной включают координационную связь с образованием комплексов типа хелатов. В спектрах Cu-формы пигмента по сравнению с Н-формой выявлено уменьшение интенсивности поглощения –С=О амидной группировки (1660 и 3120-3060 см⁻¹), что может быть обусловлено эффектом связывания металла с азотом амидной группы посредством координационной связи. Появление сильных полос поглощения в области 1570-1510 и 1270 см⁻¹ также характерно для координационной связи металлов с гидроксильными и другими кислородсодержащими функциональными группами.

Грибные меланины дают настолько характерный сигнал ЭПР, что в некоторых случаях их можно изучать методом ЭПР-спектроскопии непосредственно в составе нативной биомассы. Основные характеристики ЭПР-спектра пигментированной биомассы гриба *Ph. robustus* (g-фактор, Н) находились в пределах, характерных для меланинов. В Cu-форме биомассы *Ph. robustus*, как и у изолированного меланина, сигнал меди полностью гасил сигнал органических ПМЦ, свидетельствуя о связи металла с ароматическими структурами. В то же время интенсивность сигнала меди в биомассе была в 7,6 раза ниже, чем у меланина гриба, что несомненно связано с более низкой концентрацией центров, способных к комплексообразованию. Кроме того на основании сравнительного анализа ЭПР-спектров пигментированного мицелия и выделенного из него пигмента можно предположить, что определенная часть сорбированной меланином меди связана с функциональными группами, которые находятся в некотором отдалении от ароматических колец, вероятнее всего, с пептидными цепями.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ И ПРООКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Кануч А.Н.

*Международный государственный экологический университет имени
А.Д. Сахарова
Минск, Беларусь*

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) является нормальным физиологическим процессом. Вместе с тем развитие многих патологических состояний сопровождается изменением интенсивности процессов

ПОЛ в организме. Активация ПОЛ приводит к увеличению числа высокоактивных свободных радикалов, которые способны вызывать повреждение разнообразных биомолекул, в первую очередь мембранных липидов и белков. Такие повреждения, в свою очередь, ведут к потере или нарушению функции этих биомолекул, что вызывает нарушение в свойствах биологических мембран и функционировании клеток. В конечном итоге это может приводить к развитию того или иного патологического состояния. В зависимости от результата действия химических соединений на скорость ПОЛ их разделяют на прооксиданты и антиоксиданты. Антиоксиданты тормозят ПОЛ, тогда как прооксиданты его ускоряют. Открытие молекулярного механизма развития различных патологических состояний на основе активации ПОЛ послужило теоретическим основанием для использования антиоксидантов в качестве лекарственных средств.

В последнее время большое внимание исследователей привлекает возможность использования грибов для получения антиоксидантных препаратов. Особый интерес в этом отношении представляют так называемые лекарственные грибы, традиционно применяемые в народной медицине. Среди этих грибов большинство составляют ксилотрофные базидиомицеты. Широко известно, например, применение в народной медицине восточных славян таких грибов как *Inonotus obliquus* (березовый гриб, чага), *Fomitopsis officinalis* (лиственничная губка), *Fomes fomentarius* (настоящий трутовик). Особой популярностью пользуются дереворазрушающие базидиальные грибы в восточной народной медицине в таких странах, как Китай и Япония, а также в странах Юго-Восточной Азии. Наиболее часто здесь используют такие грибы, как *Lentinus edodes* (сиитаке), *Ganoderma lucidum* (лакированный трутовик), *Grifola frondosa* (разветвленный трутовик) и некоторые другие. Именно поэтому в последнее время среди ксилотрофных базидиомицетов проводится поиск продуцентов новых биологически активных веществ, а также разрабатываются все новые комплексные препараты в виде экстрактов и разнообразных порошков. На основе этих грибов создаются также новые пищевые биологически активные добавки. Для получения таких препаратов используют как плодовые тела, так и мицелий этих грибов, выращенный в глубоинной культуре на жидких питательных средах.

Наши исследования показали, что экстракты мицелия и плодовых тел многих ксилотрофных базидиомицетов обладают высокой антиокислительной активностью. На основании этих исследований было сформулировано представление о повышенном антиоксидантном статусе грибов белой гнили как биохимической адаптации, обеспечивающей их выживание в условиях окислительного стресса, связанного со свободнорадикальными реакциями, протекающими в процессе деструкции лигнина этими грибами. Ксилотрофные базидиомицеты способны образовывать разнообразные вещества, обладающие антиоксидантными свойствами. Среди низкомолекулярных водорастворимых

веществ наиболее выраженными антиоксидантными свойствами обладают вещества фенольной природы, особенно полифенолы и флавоноиды. Эти вещества в больших количествах содержатся в плодовых телах грибов порядка *Aphylllophorales*, что, по-видимому, связано с тем, что эти грибы способны расщеплять лигнин и вовлекать в метаболизм промежуточные продукты его деструкции. Вместе с тем, фенольные соединения могут накапливаться в мицелии базидиальных грибов при росте в поверхностной и глубоинной культуре, особенно в тех случаях, когда их культивируют на средах содержащих лигноцеллюлозные субстраты. Именно фенольные соединения обеспечивают высокую антиокислительную активность, обнаруженную нами в водных экстрактах чаги, а также в спиртовых экстрактах мицелия *Fomes fomentarius*. Выраженными антиоксидантными свойствами обладают аминотиоловые соединения, в частности серосодержащие аминокислоты и их производные. Эти соединения могут вносить значительный вклад в проявление антиоксидантных свойств, обнаруженных нами в спиртовых экстрактах мицелия грибов *Schizophyllum commune*, *Lentinus tigrinus* и *Ganoderma lucidum*. Следует подчеркнуть, что в целом уровень антиокислительной активности в экстрактах мицелия ксилотрофных базидиомицетов коррелирует с содержанием в них свободных аминокислот. Антиоксидантные свойства, обнаруженные в экстрактах плодовых тел и мицелия *Ganoderma lucidum*, обеспечиваются также присутствием в них уникальных тритерпеновых соединений. Важную роль в проявлении антиоксидантных свойств экстрактов мицелия ксилотрофных базидиомицетов могут играть синергические взаимодействия между отдельными химическими соединениями, обладающими антиоксидантными свойствами. Существенный вклад в суммарную антиокислительную активность спиртовых экстрактов мицелия вносят такие липофильные соединения, как фосфолипиды и стеринны. Данные о содержании в экстрактах мицелия таких классических биоантиоксидантов, как токоферолы, и в частности α -токоферола, весьма противоречивы. По-видимому, токоферолы не оказывают существенного влияния на суммарную антиокислительную активность, обнаруживаемую в спиртовых экстрактах мицелия ксилотрофных базидиомицетов. Дискуссионным также остается вопрос о способности ксилотрофных базидиомицетов к биосинтезу каротиноидов. Ранее предполагалось, что высокая антиокислительная активность в спиртовых экстрактах и липидах мицелия гриба *Laetiporus sulphureus* обусловлена присутствием кетокаротиноидных кислот. Однако, возможно, что главную роль здесь играет недавно обнаруженный уникальный полиеновый пигмент — лаеитиновая кислота. На основании проведенных исследований разработаны способы получения комплексных препаратов, обладающих высокой антиокислительной активностью, которые проявляют радиозащитные и иммунокорректирующие свойства.

Грибы способны проявлять не только антиоксидантные, но и прооксидантные свойства. В результате проведенных исследований нами впервые установлено, что культуральные жидкости некоторых ксилотрофных базидиомицетов белой гнили, в частности *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta* и некоторых других, способны инициировать перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот, таких, как линолевая кислота. В результате образуются высокоактивные липидные радикалы, которые способны окислять самые разнообразные химические соединения. Разработан новый метод для определения прооксидантной активности в культурах грибов. Установлено, что основными прооксидантами ксилотрофных базидиомицетов являются пероксидазы, и в частности ключевую роль в инициировании ПОЛ играет марганец пероксидаза. Прооксидантными свойствами обладают и сами липиды грибов белой гнили. В связи с выявлением прооксидантных свойств в культурах грибов возникает вопрос, могут ли патогенные грибы инициировать перекисное окисление липидов *in situ*, подобно ксилотрофным базидиомицетам, и таким образом оказывать патогенетическое действие на организм человека. До сих пор такой механизм патогенности у грибов не рассматривался.

СИСТЕМА СКРИНИНГА ЭКСТРАКТОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Краснопольская Л.М.¹, Белицкий И.В.¹, Автономова А.В.¹,
Соболева Н.Ю.¹, Усов А.И.², Исакова Е.Б.¹,
Либензон А.В.¹, Бухман В.М.¹

ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе РАМН
² Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН
Москва

Профилактика и терапия онкологических заболеваний являются одной из наиболее значимых областей возможного практического применения препаратов на основе лекарственных базидиальных грибов. Накоплен существенный экспериментальный материал о способности базидиомицетов синтезировать метаболиты, проявляющие антиканцерогенный эффект, обладающие противоопухолевым действием за счет цитостатического и/или иммуностимулирующего действия, ингибирующие процесс метастазирования. На наш взгляд, на сегодня одна из важнейших задач состоит в разработке системы скрининга грибных противоопухолевых препаратов одновременно по двум направлениям,

а именно по эффективности и стоимостным характеристикам. Настоящая работа представляет собой первый этап исследований в этом направлении.

Объектами исследования служили штаммы *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst., *Hericium erinaceus* (Bull.:Fr.) Pers., *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilat объединенные близостью таксономического положения и принадлежностью к группе ксилосапротрофов, вызывающих белую гниль благодаря способности утилизировать лигнин.

Изучали действие экстрактов вегетативного мицелия, получаемого при погруженном культивировании базидиальных грибов, плодовых тел (базидиом) и базидиоспор. Базидиомы были выращены на грибоводческих предприятиях России и Китая.

Погруженное культивирование осуществляли в ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе РАМН. С этой целью была разработана стратегия создания способов погруженного культивирования изучаемых видов грибов, позволяющая максимально сократить затраты за счет использования возможностей штаммового разнообразия, сокращения длительности процессов в 2-4 раза и увеличения выхода биомассы. Способы погруженного культивирования были разработаны применительно к каждому из изучаемых объектов и включали штамм гриба данного вида, состав жидкой питательной среды, значение ее исходного pH, условия аэрации и освещения, температурный режим и длительность процесса.

Полученные образцы мицелия и базидиом исследуемых грибов подвергали различным методам экстракции. В ряде случаев проводили фракционирование экстрактов и определяли моносахаридный состав выделенных полисахаридов.

Противоопухолевое действие полученных материалов исследовали в опытах *in vivo* на перевиваемой асцитной и солидной Т лимфоме EL-4 на мышах-гибридах (C57Bl/6J DBA/2)F1 (B6D2F1) при внутрибрюшинном и пероральном введении, соответственно. В отдельных группах мышам, привитым опухолью, однократно вводили циклофосфамид (ЦФ) в низкой, угнетающей супрессоры дозе. Контролировали общее состояние мышей, изменение массы тела, прививаемость и динамику роста опухоли, выживаемость мышей. В случае гибели мышей по совокупности данных и результатам вскрытия определяли основную причину гибели.

Изучение противоопухолевой активности ряда экстрактов *G. lucidum* показало, что наибольшей активностью обладали экстракты погруженного мицелия по сравнению с экстрактами базидиом и базидиоспор российского и китайского происхождения. Внутрибрюшинное введение водного экстракта мицелия *G. lucidum* тормозило рост асцитной лимфомы у молодых мышей. У старых 9-месячных мышей этот экстракт не оказал существенного самостоятельного влияния на рост асцитной

лимфомы, однако достоверно усилил эффект ЦФ. Аналогичный эффект наблюдали у «пожилых» (5-месячных мышей) при пероральном введении объединённого экстракта мицелия *G. lucidum*. Таким образом, была показана зависимость противоопухолевого эффекта грибных экстрактов от возраста лабораторных животных. Были подобраны добавки к экстрактам мицелия *G. lucidum*, усиливающие их противоопухолевый эффект. Наибольшую самостоятельную противоопухолевую активность продемонстрировали при пероральном введении изучаемые полисахаридные фракции мицелия, различающиеся количественным соотношением одного и того же состава моносахаридов.

При использовании модели солидной лимфомы экстракт погруженного мицелия *H. erinaceus*, в отличие от экстракта базидиомицета, проявил самостоятельное противоопухолевое действие при его пероральном введении, что, в частности, выразилось, в торможении роста опухоли. Эффект резко потенцировался предварительным однократным введением ЦФ в низкой дозе.

Изучение экстрактов *L. edodes* с применением данной модели не выявило существенного различия в противоопухолевой активности погруженного мицелия и плодовых тел. Пероральное введение экстрактов гриба существенно тормозило рост подкожной лимфомы. Эффект потенцировался предварительным однократным введением ЦФ в низкой дозе 50 мг/кг. Предложена методика ускоренного получения экстракта погруженного мицелия *L. edodes*, обладающего высокой противоопухолевой активностью.

При внутрибрюшинном введении водного экстракта погруженного мицелия гриба *T. versicolor* было показано торможение развития асцитной лимфомы. В опытной группе на 27 сутки опыта было достоверно по критерию χ^2 ($p = 0,03$) больше живых мышей, чем в группе не получавших лечения.

Суммируя полученные данные, следует подчеркнуть принципиальные выводы. Вопрос о выборе сырья для получения лекарственных препаратов, биологически активных добавок или иных функциональных продуктов следует решать применительно к отдельному виду базидиомицета. Целесообразность химической очистки действующих веществ зависит от наблюдаемого эффекта. Так, в наших опытах была показана необходимость фракционирования исходного экстракта *G. lucidum* для получения четко выраженного противоопухолевого действия. В то же время результаты изучения *L. edodes* дают основания для практического применения грубого экстракта. При этом следует иметь в виду зависимость получаемых результатов от используемой лабораторной модели и от направленности клинических испытаний. В настоящее время дискутируется вопрос о предпочтительном выборе вида базидиального гриба для лечения определенного вида онкологического заболевания. На наш взгляд, не менее важной является проблема специфики противоопухо-

левого действия отдельных видов лекарственных базидиомицетов на пациентов различных возрастных групп.

ГРИБЫ КАК ИСТОЧНИК ПОЛИПРЕНОЛОВ

Кукина Т.П., Горбунова И.А., Баяндина И.И.
Новосибирский институт органической химии СО РАН
Центральный сибирский ботанический сад СО РАН
Новосибирск

Накопление длинноцепочечных полипренолов было впервые описано 50 лет назад. Полипренолы были найдены в ряде видов покрытосеменных и голосеменных растений [1]. Эти соединения имеют широкий спектр физиологической активности. Долихолы – это частично гидrogenизированные полипренолы. Физиологическая активность долихолов в несколько раз выше, чем у полипренолов [2]. Долихолы встречаются в тканях млекопитающих и дрожжах, они также найдены в некоторых растениях [3, 4]. Цель химиков-синтетиков – это химическое преобразование полностью ненасыщенных растительных полипренолов в «долихолоподобные» молекулы, в которых ОН-конечный изопреновый остаток гидrogenизирован. Недостатком большинства синтетических методов является то, что в результате синтеза получается смесь из 3S- и 3R-изомеров. Общеизвестно, что 3R-изомеры показывают обратную активность в некоторых биологических тестах. Так как природные долихолы (в отличие от синтетических) содержат только 3S-изомеры, они более эффективны при использовании их в медицинских целях [5]. В бактериях найдены бактопренолы, а данные о «фунгопренолах» отсутствуют в научной литературе.

Полипренолы были выделены нами из грибов, собранных в Новосибирской области: *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm., *Fomes fomentarius* (L.) J. J. Kickx, *Tricholoma populinum* J. E. Lange, *Lycoperdon perlatum* Pers., *Suillus luteus* (L.) Gray. Образцы свежих грибов экстрагировались смесью гексана и изопропанола в отношении 1:1. Добавление воды к полученному экстракту приводило к разделению жидкости на два слоя. В гексановой фракции содержатся неполярные соединения, а спиртовая фракция содержит ряд полярных соединений. Эти фракции можно исследовать отдельно. Образцы экстрактов изучались с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с эфиром токоферола в качестве внутреннего стандарта. ВЭЖХ осуществлялась как описано ранее [4] для плантопренолов из листьев облепихи. Выход экстрактивных веществ из этих образцов и содержание полипренолов в экстрактах представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Накопление полипренолов в разных видах грибов

Виды	Выход гексанового экстракта (% от сухого веса)	Содержание полипренолов в гексановом экстракте	Выход спиртового экстракта (% от сухого веса)	Содержание полипренолов в спиртовом экстракте
<i>Armillaria mellea</i>	3.0	3.2	10.2	Следы
<i>Fomes fomentarius</i>	0.7	0.2	12.0	Следы
<i>Tricholoma populinum</i>	2.5	2.0	8.2	Следы
<i>Lycoperdon perlatum</i>	0.7	1.1	4.0	Следы
<i>Suillus luteus</i>	2.5	0.5	30.0	Следы

Компонентное соотношение полипренолов в свободной и этерифицированной форме представлено в Таблице 2. Анализ хроматографических данных позволяет сделать вывод, что полипренолы существуют в разных формах. *Armillaria mellea*, *Lycoperdon perlatum* и *Tricholoma populinum* содержат главным образом ацетилированные полипренолы. Полипренолы *Suillus luteus* изучались после омыления, так как они этерифицированы жирными кислотами. *Suillus luteus* содержит, вероятно, небольшие количества долихолов. В *Fomes fomentarius* и *Suillus luteus*

Таблица 2. Компонентное соотношение полипренолов у разных видов грибов

Виды	Общее содержание полипренолов (% от свежего веса)	Содержание компонентов (%)							
		14	15	16	17	18	19	20	21
<i>Armillaria mellea</i>	0.01								
Свободные	0.003	5.2	10.5	17.5	32.5	32.6	8.4		
Ацетилированные	0.007	6.3	17.0	35.7	27.4	9.7	3.8		
<i>Fomes fomentarius</i>	0.0005		+	+	+	+			
<i>Tricholoma populinum</i>	0.007								
Свободные	0.0024	9.3	15.6	26.7	26.0	22.2	Tr.		
Ацетилированные	0.0056	13.5	21.7	32.7	28.5	3.6			
<i>Lycoperdon perlatum</i>	0.007								
Ацетилированные	0.007					11.8	52.9	23.5	11.8
<i>Suillus luteus</i>	0.00007			+	+	+	+		

полипренолы найдены в небольшом количестве, что не позволило осуществить их компонентный анализ.

Это предварительное исследование позволяет считать грибы новым перспективным источником полипренолов.

Литература

1. T. Chojnacki, T. Vogtman. Occurrence and Seasonal Distribution of C50–C60-Polyprenols and C100- and Similar Long-Chain Polyprenols in Leaves of Plants. //Acta Biochim. Polon. – 1984. – V. 31 – p. 115–126.
2. N. Y. Grigor'eva, A. M. Moiseenkov. Physiological Activity of Polyprenoids. //Khim.-Pharm. Zh. – 1989. – No. 2 – p. 145–155.
3. Patent 5 306714 (US) Cl. A61K31/66 C07 19/113 (S)-2,3-Dihydropolyprenyl, Monophosphate and Agents for Inhibiting the Metastasis of Cancers /Y. Okamoto et al., Apr 26, 1994. Appl. Jun 21, 1993.
4. T. P. Kukina, L. I. Demenkova, V. A. Raldugin et al. Polyprenols and Dolichols of Sea Buckthorn Leaves. //Sib. Khim. Zh. – 1991. – No. 6 – p. 89–93.
5. T. Mankowski, W. Jankowski, T. Chojnacki and P. Franke. C55-Dolichol Occurrence in Pig Liver and Preparation by Hydrogenation of Plant Undecaphenol. //Biochemistry. V. 15. – No. 10. – 1976. – p. 2125–2130.
- E. Swieżewska, W. Sasak, T. Mankowski, W. Jankowski, T. Vogtman, I. Krajewska, J. Hertel, E. Skoczylas, T. Chojnacki. The search for plant polyprenols.// Acta Biochim. Polon. – 1994. – V. 41 – p. 221-260.

МЕХАНИЗМ СОРБЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ГРИБНЫМИ МЕЛАНИНАМИ

¹Курченко В.П., Сушинская Н.В., Кукулянская Т.А.,

²Горовой Л.Ф., ³Сенюк О.Ф.

¹ Белгосуниверситет

Минск, Беларусь

² Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Киев, Украина

³ Институт проблем безопасности атомных электростанций НАН Украины
Чернобыль, Украина

На фоне широкого использования соединений природного происхождения в качестве сорбентов тяжелых металлов особое внимание специалистов обращено на меланиновые пигменты грибов. Очищенные меланины из базидиомицетов могут служить эффективным средством связывания тяжелых металлов и, тем самым, способствовать

снижению их токсического действия. К числу наиболее токсичных для человека металлов относятся кадмий, ртуть, свинец и другие тяжелые металлы. При попадании в организм через желудочно-кишечный тракт в больших количествах они могут приводить к тяжелой интоксикации. Например, при интоксикации медью и ее солями возможны функциональные расстройства нервной системы, нарушение функции печени и почек, изъязвление и перфорация носовой перегородки.

Целью нашей работы являлось изучение влияния меланиновых пигментов на токсичное действие солей тяжелых металлов при их совместном внутрижелудочном введении мышам, а также выявление механизма сорбции металлов рядом меланинов из базидиомицетов.

Проведенные исследования показали, что меланин из *Inonotus obliquus* (трутовика скошенного, чаги) образует комплексы с металлами и снижает их токсическое действие при совместном внутрижелудочном введении растворов солей и меланина животным.

Таблица 1.

Выживаемость мышей при совместном внутрижелудочном введении солей металлов и меланина из *Inonotus obliquus*

Вводимая доза	Выживаемость мышей
CdCl ₂ 94 мг/кг	50 %
CdCl ₂ 94 мг/кг + меланин 200 мг/кг	60 %
CdCl ₂ 94 мг/кг + меланин 1000 мг/кг	80 %
CuCl ₂ 200 мг/кг	50 %
CuCl ₂ 200 мг/кг + меланин 90 мг/кг	70 %
CuCl ₂ 200 мг/кг + меланин 180 мг/кг	90 %
CuCl ₂ 200 мг/кг + меланин 360 мг/кг	100 %

Как видно из полученных результатов при совместном введении CdCl₂ в дозе, равной LD₅₀ и меланина из *Inonotus obliquus* в дозе 1000 мг/кг выживаемость мышей увеличивалась на 30%. Для снижения токсического действия CdCl₂ до 80 % выживаемости требовалось введение значительно большего количества меланина, чем при интоксикации CuCl₂. При совместном внутрижелудочном введении хлорида меди в дозе 200 мг/кг (LD₅₀) и меланина из *Inonotus obliquus* в дозе 180 мг/кг массы через сутки погибло не более 10% животных, а при совместном введении хлорида кадмия (100 мг/кг) и меланина (200мг/кг) – 20%.

Увеличение выживаемости животных при интоксикации солями тяжелых металлов при совместном введении их с меланином обусловлено его энтеросорбционным действием. При этом взаимодействие меланинов с металлами ведет к образованию устойчивых комплексов и выпадению их в осадок. Устойчивость образующихся комплексов ме-

ланин-металл была исследована по способности ЭДТА разрушать образующийся комплекс. Было установлено, что разрушение комплексов металлов с меланином из *Inonotus obliquus* происходило при добавлении к реакционной смеси ЭДТА в количествах, превосходящих содержание меланина в 5 раз для Zn²⁺-меланин, в 10 раз – Cd²⁺-меланин, в 15 раз – Pb²⁺- и 20 раз Cu²⁺-меланин. Полученные результаты свидетельствуют о том, что хелатирующая способность исследованных меланиновых пигментов значительно превышает сорбционные свойства ЭДТА и зависит от свойств ионов металлов. На основании полученных результатов было рассчитано, что меланин из *Inonotus obliquus* имеет 25 центров связывания ионов Cd²⁺ и Zn²⁺.

При комплексообразовании различных меланинов с металлами происходит освобождение протонов и снижение pH среды. Агрегация меланина и выпадение его в осадок начинаются на конечной стадии титрования, когда значение pH не меняется (Рис.).

Анализ результатов показывает, что взаимодействие ацетата свинца с большинством меланинов из исследованных базидиомицетов происходит преимущественно по ионному механизму взаимодействия.

Одним из уникальных свойств природных меланиновых пигментов является парамагнетизм. Очевидно, что взаимодействие меланинов из различных видов трутовых грибов с ионами металлов будет определяться особенностями физико-химических свойств пигментов связанных со специфичностью вторичных метаболитов субстратов на которых они произрастали. В связи с этим уместно предположить существенные отличия в парамагнитных свойствах комплексов ионов свинца с меланинами различных видов трутовых грибов.

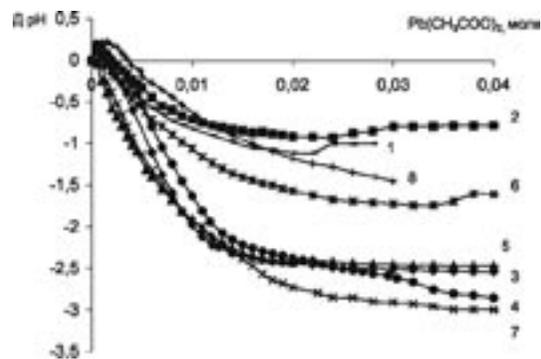


Рис. Изменение pH при комплексообразовании различных меланинов (образец 20 мг) с ацетатом свинца:

1 – *Fomes fomentarius*, трутовик настоящий (паразитирующий на березе);
2 – *Inonotus obliquus*, трутовик скошенный (паразитирующий на березе);
3 – *Fomitopsis pinicola*, трутовик окаймленный (паразитирующий на березе);

4 – *Fomitopsis pinicola*, трутовик окаймленный (паразитирующий на ели);

5 – *Ganoderma applanatum*, трутовик плоский (паразитирующий на осине);

6 – *Phellinus igniarius*, трутовик ложный (паразитирующий на осине);

7 – *Phellinus igniarius*, трутовик ложный (паразитирующий на маньчжурском орехе);

8 – *Phellinus robustus* трутовик ложный дубовый (паразитирующий на дубе);

Таблица 2
Характеристика ЭПР сигналов комплексов меланинов
из трутовиков со свинцом

№	Источник меланина, субстрат произрастания гриба	ΔH , Гс	g-фактор	[ПМЦ], 1017спин/г
1	Трутовик настоящий <i>Fomes fomentarius</i> , береза Комплекс с Pb^{2+}	6 10,3	2,0043 2,0009	6 9,7
2	Трутовик скошенный <i>Inonotus obliquus</i> , береза Комплекс с Pb^{2+}	5,5 12	2,0042 2,0010	4 102
3	Трутовик окаймленный <i>Fomitopsis pinicola</i> , береза Комплекс с Pb^{2+}	6 12,5	2,0043 2,0019	4 10,1
4	Трутовик окаймленный <i>Fomitopsis pinicola</i> , ель Комплекс с Pb^{2+}	6 11	2,0042 2,0028	3 4,1
5	Трутовик плоский <i>Ganoderma applanatum</i> , осина Комплекс с Pb^{2+}	6,3 11	2,0045 2,0021	9 19,3
6	Трутовик ложный <i>Phellinus igniarius</i> , осина Комплекс с Pb^{2+}	5,3 13	2,0040 2,0016	3 65,2
7	Трутовик ложный <i>Phellinus igniarius</i> , орех манчжурский Комплекс с Pb^{2+}	5,5 12	2,0043 2,0016	16 43
8	Трутовик дубовый ложный <i>Phellinus robustus</i> , дуб Комплекс с Pb^{2+}	6 13,5	2,0043 2,0004	5 14,9

Данные спектроскопии электронного парамагнитного резонанса меланинов из различных источников и их комплексов с ионами свинца свидетельствуют о том, что комплексообразование приводит росту количества парамагнитных центров ([ПМЦ]). Поскольку парамагнитные свойства меланинов являются следствием присутствия в структуре неспаренных электронов, т.е. свободнорадикальных мономеров как ранее установлено феноксильной и бензосемихинонной природы, то, очевидно, в хелатировании ионов металлов принимают участие гидроксильные и карбонильные группы. В результате такого взаимодействия в молекулах полимеров меланиновых пигментов происходит перераспределение электронной плотности и образование более стабильных структур. Об этом свидетельствуют существенное снижение g-фактора. Наиболее прочное взаимодействие с ионами свинца характерно для меланинов из *Fomes fomentarius*, *Inonotus obliquus*, *Phellinus robustus*. При

этом наблюдается существенный рост парамагнитных центров для меланина из *Inonotus obliquus*.

Таким образом, нами было установлено, что меланиновые пигменты предотвращают гибель животных при интоксикации солями кадмия и меди. Это обусловлено их способностью связывать ионы металлов с образованием комплексов металл-меланин. Сорбция меланинами металлов приводит к существенным изменениям их физико-химических свойств, которые определяются особенностями их видового происхождения и субстратом произрастания гриба.

ПОИСК ГРУППСПЕЦИФИЧНЫХ ЛЕКТИНОВ ГРИБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

*Никитина В.Е., Цивилева О.М.,
Степанова Л.В., Лощинина Е.А.*

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
Саратов*

Повышенный интерес исследователей вызывают углеводсвязывающие белки – лектины. Эти соединения, имеющие широкий спектр биологической активности, участвуют во внутриклеточных и межклеточных взаимодействиях, выступают в роли иммуномодуляторов и триггеров, широко используются в разных областях биологии, медицины. В то же время лектины высших ксилотрофных грибов малоизучены.

Для обнаружения лектинов чаще всего используют тест на агглютинацию эритроцитов животных и человека. Изучение распространения лектинов в природе в значительной мере имело своей целью выявление и получение группоспецифичных препаратов, обладающих свойством избирательно агглютинировать эритроциты определенной группы крови человека. Группоспецифичные лектины сыграли важную роль в установлении химической структуры детерминант изоантитенов эритроцитов [1]. Однако из всех известных группоспецифичных лектинов подавляющее большинство принадлежит к токсичным лектинам растительного происхождения, почти все остальные – к лектинам животного происхождения; получение и тех, и других связано со значительными технологическими трудностями [2]. В настоящее время среди грибных лектинов известно небольшое их количество со специфичностью анти-О(Н), анти-А, анти-В, анти-(А+В), анти-(В+Н). Единичны случаи специфичности, описанные в связи с другими системами (Dd, MN, Ii). Весьма ограничены данные по группоспецифичным лектинам ксилотрофных базидиомицетов. Сведения о групповой специфичности лектинов культур, представленных в настоящей работе, нами не обнаружены.

Мы исследовали гемагглютинирующую активность и углеводную специфичность агглютининов базидиальных ксилотрофов, принадлежащих к разным систематическим группам. Использовали культуры базидиомицетов: *Armillariella mellea* 0738, *Armillariella mellea* 1346, *Flammulina curum* 0105, *Flammulina velutipes* 0535, *Ganoderma applanatum* 0154, *Ganoderma lucidum* 1315, *Grifola frondosa* 0917, *Grifola umbellata* 1622. Культуры были любезно предоставлены музеем коллекции высших грибов Ботанического института имени Комарова, Санкт-Петербург, а также коллекцией высших грибов лаборатории микробиологии и микологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов.

Изучение гемагглютинирующей активности проводили в процессе роста и развития грибов при 26°C в темноте на жидких и агаризованных средах, синтетических (на основе D-глюкозы и L-аспарагина) и комплексных (на основе пивного сусла). Растворы лектинов представляли собой пробы культуральной жидкости при глубинном культивировании и экстракты из мицелия при выращивании на плотных средах. Экстрагентом служил фосфатно-солевой буфер (PBS, pH 7.2). С целью обнаружения агглютининов в пробах использовали реакцию гемагглютинации, проводимую с 2%-ной суспензией нативных и трипсинизированных эритроцитов. Углеводную специфичность агглютининов определяли методом ингибирования реакции гемагглютинации некоторыми углеводами и гликопроизводными [1]. Углеводсвязывающую способность агглютининов выражали минимальной концентрацией углевода, ингибирующей реакцию гемагглютинации.

Гемагглютинирующие свойства растворов лектинов проверяли на нативных и обработанных трипсином эритроцитах человека всех групп крови. Показано наличие гемагглютинирующей активности на стадии дикариотического мицелия у всех взятых в эксперимент культур. Степень проявления этой активности (величина титра гемагглютинации) имела как общие для всех культур особенности, так и некоторые различия, обусловленные, вероятно, индивидуальными характеристиками каждого базидиомицета. Максимальные величины титров гемагглютинации у всех объектов отмечены на агаризованных средах, при взаимодействии с нативными эритроцитами. Анализ проб мицелия с агаризованного пивного сусла показал наличие стабильно высокой гемагглютинирующей активности на протяжении всего периода выращивания. Максимумы проявления активности приходились на первую половину культивирования, за исключением штаммов *A. mellea*, у которых отмечен самый высокий титр на 15-е сут, т.е. во второй половине указанного периода. При росте культур на агаризованной синтетической среде динамика гемагглютинирующей активности была несколько иной: в начале культивирования (до 9 сут) наблюдали резкое повышение титра, затем достаточно быстрое снижение активности, которая к концу изучаемого периода характеризовалась очень низкими величинами

нами титра гемагглютинации. Исключение вновь составили штаммы *A. mellea*, у которых пик активности приходится на 15-е сут. Возможно, максимальное проявление гемагглютинирующей активности в общем случае связано с началом активной колонизации среды (фазы экспоненциального роста). *A. mellea* формирует морфологически особые мицелиальные структуры – ризоморфы. Смещение пика исследуемой активности у *A. mellea* 0738 и *A. mellea* 1346 может объясняться тем, что скорость роста этих штаммов гораздо ниже, чем остальных исследуемых культур в тех же условиях.

Экстракты из мицелия *F. curum*, *F. velutipes*, *G. lucidum*, *Gr. umbellata*, выращенного на сусло-агаре, обнаруживали достаточно выраженную реакцию гемагглютинации с трипсинизированными эритроцитами человека группы крови O; титр гемагглютинации при этом изменялся от 16 (*Gr. umbellata* 1622) до 128 (*G. lucidum* 1315). Трипсинизированные эритроциты человека всех других групп крови агглютинировали при взаимодействии с мицелиальными экстрактами трех из только что перечисленных культур: *F. curum*, *F. velutipes*, *G. lucidum*. Титры гемагглютинации были примерно одинаковы для групп крови B и AB, чуть ниже – для группы A у *F. curum* и *G. lucidum*, но интервал указанных величин был достаточно узок: от 16 до 64. Трипсинизированные эритроциты человека ни одной из групп крови не агглютинировали под воздействием мицелиальных экстрактов *A. mellea* 0738, *A. mellea* 1346, *G. applanatum*, *Gr. frondosa*. Группоспецифичность (анти-N(O)) агглютининов *Gr. umbellata* также нельзя констатировать ввиду не только относительно низкого титра гемагглютинации в реакции с трипсинизированными эритроцитами (см. выше), но и проявляющейся, хотя и слабо, агглютинацией эритроцитов группы AB. Нативные эритроциты оказались «предпочтительнее» при характеристике агглютинирующих свойств культур, способствовали проявлению более дифференциального поведения их в отношении эритроцитов разных групп крови человека. По результатам экспериментов в варианте твердофазного культивирования агглютинины *A. mellea* 1346 отмечены нами как N(O)-специфичные. При титре гемагглютинации 256 с эритроцитами этого типа сколько-нибудь заметной гемагглютинации при использовании мицелиальных экстрактов этой культуры и эритроцитов других групп крови не наблюдалось.

В качестве общей закономерности следует отметить тот факт, что предпочтительной агглютинации трипсинизированных эритроцитов человека по сравнению с нативными не наблюдалось ни для одного из вариантов эксперимента. Общим для всех изученных грибных культур при культивировании на жидких средах и использовании нативных эритроцитов человека явилась также гораздо более низкая степень проявления гемагглютинирующей активности в сравнении с плотными средами; существенные отличия наблюдались и в динамике. На жидкой синтетической среде практически у всех культур максимальный

титр гемагглютинации обнаружен при возрасте 1 сут, далее гемагглютинирующая активность снижается, у некоторых культур в первой половине периода выращивания выходит на стационар. Во второй половине периода культивирования у всех объектов наблюдается повышение активности, к 21-м сут снова отмечается снижение. То есть явно имеют место два максимума гемагглютинирующей активности. Ранее нами исследована взаимосвязь активности лектинов *Lentinus edodes* с ростовыми характеристиками, отмечено значительное увеличение лектиновой активности при использовании сред, неблагоприятных для роста мицелия [3]. Полученные результаты дали возможность сделать предположение об участии лектинов в адаптации культуры к неблагоприятным факторам внешней среды. Возможно, повышение активности во второй половине периода выращивания изучаемых в настоящей работе культур связано с накоплением вторичных метаболитов на фоне неблагоприятных изменений состава среды – истощения питательных ресурсов (началом фазы отмирания).

На жидкой синтетической среде наблюдали стабильный титр гемагглютинации всех культур при взаимодействии с нативными эритроцитами группы крови О. Нативные эритроциты группы крови А агглютинировали под воздействием культуральной жидкости шести из восьми изученных штаммов, группы В – пяти. Нативные эритроциты типа АВ проявляли заметные результаты реакции гемагглютинации только с внеклеточными агглютинидами *F. velutipes*. Культуры *A. mellea* 0738 и *G. lucidum* обнаруживали очень слабую, но избирательную агглютинацию нативных эритроцитов типа О, однако эти гемагглютинины вряд ли можно считать Н(О)-специфичными – титр не превышает 8.

Агглютинация трипсинизированных эритроцитов человека группы крови О и В культуральной жидкостью наблюдалась только в случае *F. velutipes*, группы АВ – *F. velutipes* и *A. mellea* 1346. Отсутствовали заметные результаты реакции агглютинации эритроцитов группы А внеклеточными агглютинидами какой-либо из изученных культур. Однако агглютинины культуральной жидкости *A. mellea* 1346 нельзя считать АВ-специфичными, так как титр гемагглютинации при использовании трипсинизированных эритроцитов крови этой группы низок.

Обнаружено отсутствие взаимодействия между агглютинидами экстрактов из мицелия изучаемых культур и следующими углеводами и гликопроизводными в диапазоне концентраций от 0 до 100 мМ: D-галактоза, D-глюкоза, D-манноза, D-мальтоза, D-фруктоза, L-рамноза, L-фукоза, L-арабиноза, L-галактоза, D-лактоза, D-целлобиоза, D-меллибиоза, N-ацетил-D-глюкозамин, N,N-диацетилхитобиоза, 2-дезоксид-галактоза, D-галактозамин, D-глюкозамин. Для некоторых культур нами выявлены ингибиторы реакции гемагглютинации в указанных минимальных концентрациях: *G. applanatum* 0154 – 12,5 мМ N-ацетил-D-галактозамин, *Gr. umbellata* 1622 – 6,25 мМ D-галактуроновая кислота, *A. mellea* 1346 – 12,5 мМ фенил-β-D-галактопиранозид.

Проводили сравнительное исследование влияния на гемагглютинирующую активность таксономических особенностей грибов, способа культивирования (твердофазное, жидкофазное), состава питательной среды и типа эритроцитов в реакции гемагглютинации. По критерию проявления изучаемой активности в процессе роста на сусло-агаре культура *Gr. frondosa* более схожа с *G. applanatum*, чем с *Gr. umbellata*. Далее, *Gr. umbellata* и *G. lucidum* при одном и том же составе агаризованной среды выращивания агглютинировали трипсинизированные эритроциты человека (группа Н(О)) с титрами до 128, а для представителей тех же родов *Gr. frondosa* и *G. applanatum* агглютинация этого типа эритроцитов не проявлялась совсем. Еще пример: при культивировании на агаризованной синтетической среде возраст культур, приходящийся на максимум гемагглютинирующей активности двух штаммов *A. mellea*, один и тот же, величины пиков незначительно отличаются между собой, но отличаются от величины пика указанной активности и возраста культуры *G. lucidum*. Однако на жидкой синтетической среде и степень выраженности, и динамика исследуемой активности мицелия всех трёх культур мало отличаются. То есть при переходе к другому способу культивирования различия в плане гемагглютинирующей активности, обусловленные систематическим положением, в значительной степени сглаживаются. Также очень схожи по характеристике гемагглютинирующей активности культуры разной систематической принадлежности, выращенные на жидких средах совершенно разного состава, но в отношении одного и того же типа эритроцитов. Таким образом, различие таксономических характеристик и состава среды выращивания грибных культур – представителей ксилотрофных базидиомицетов оказывает на активность их гемагглютининов гораздо меньшее влияние, чем агрегатное состояние питательной среды и тип эритроцитов в реакции гемагглютинации. Результаты изучения гемагглютинирующей активности и углеводной специфичности агглютининов базидиальных грибов разных систематических групп дают основание считать, что одним из перспективных направлений поиска продуцентов группоспецифических лектинов могли бы стать ксилотрофные базидиомицеты.

Список литературы

1. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. Львов: Вища школа, 1981. 156 с.
2. Никитина В.Е., Богомолова Н.В. Использование бактериальных лектинов для решения некоторых проблем гематологии: Научно-информационное пособие. Саратов: Изд-во Саратовского государственного медицинского университета, 2000. 28 с.
3. Никитина В.Е., Цивилева О.М., Гарибова Л.В. // Биотехнология. 2004. № 3. С. 49-54.

ПУТИ СОЗДАНИЯ НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ МИКРО- И МАКРОМИЦЕТОВ

Огарков Б.Н., Огаркова Г.Р.,
Самусенок Л.В.

НИИ биологии при Иркутском государственном университете
Иркутск

Высшие грибы не только ценный пищевой продукт, велико их значение как продуцентов биологически активных веществ, тонизирующих и укрепляющих средств. Еще в глубокой древности как лекарственное средство гриба использовались в народной медицине Китая и Японии, несколько позднее – в странах Европы. Есть несколько видов грибов, которые чаще всего используются как в странах Востока, так и в странах Европы. Это прежде всего, сиитакэ (*L. edodes*), трутовик лакированный (*Ganoderma lucidum* (Leyuss) P. Karst), трутовик разноцветный (*Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pil.), кордицепс китайский (*Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc.), иудино ухо (*Auricularia auricula* (Hook) Underw), трутовик разветвленный (*Grifola frondosa* (Dicks. Fr.) S. F. Gray).

Чаще всего используются 14 видов грибов в форме чая, спиртовых и водных экстрактов или выделенных чистых веществ типа полисахаридов, пептидов, гликозидов, антибиотиков. Препараты из макромицетов обладают противовоспалительными, антиоксидантными, противоопухолевыми свойствами. Они способны нормализовать кровяное давление, холестерин и сахар крови. Усиливают иммунитет и повышают тонус печени и почек. Несомненным лидером среди лекарственных грибов являются *G. lucidum* и *C. sinensis*, обладающие лекарственными свойствами полифункционального характера.

Нами в технологических культурах изучаются 7 видов микро- и макромицетов, как продуценты ряда биологически активных веществ таких, как меланин, который по разработанной технологии получаем в форме пигмента определенной чистоты, и спиртовых и водных экстрактов из грибов с высоким содержанием полисахаридов, пептидов, жирных ненасыщенных кислот и других веществ.

Интересными являются исследования по созданию комбинированных грибных препаратов, которые имеют то или иное ярко выраженное свойство, например, антиоксидантную активность. Меланин, полученный из *A. carbonarius*, и спиртовый экстракт из *G. lucidum* обладают высокой антиоксидантной активностью.

Основу грибного препарата составляют биологически активные вещества трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst и *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom. Главными элементами трутовика лакированного являются стероидные соединения, флавоноиды, сапонины, аминокислоты, алколоиды, полисахариды, водорастворимые

белки и микроэлементы. Микромицет *A. carbonarius* отобран из природных источников (пораженные грибом насекомые) как продуцент меланина.

По фармакологическому действию ганодерма многофункциональна – препарат повышает сопротивляемость организма к различным заболеваниям, оказывает успокаивающее действие на ЦНС, снимает боль, оказывает противокашлевое и отхаркивающее действие, способствует расслаблению гладкой мускулатуры в бронхах и кишечнике, усиливает работу сердца, снижает уровень холестерина в крови, нормализует артериальное давление, повышает неспецифический иммунитет, улучшает функцию печени. Обладает тонизирующими свойствами, значительно активизирует функцию Т-лимфоцитов, увеличивает количество лейкоцитов в периферической крови, обладает интерфероноподобным и антиоксидантным действием.

В условиях Иркутской области встречаются представители рода ганодерма (*G. applanatum* (Walr.) Pat. на остатках срубленного вяза в городской черте Иркутска), внешне сходные с некоторыми грибами из семейств полипоровых и гименохетовых. Ганодермовые грибы имеют обычно плоские шляпки, но в основном отличаются от грибов других семейств микроскопическим строением: у них очень характерные скелетные гифы, а споры имеют двойную оболочку, включающую окрашенный шиповатый или бородавчатый эндоспорий и бесцветный гладкий эписпорий.

Для исследования биологически активных веществ *G. lucidum* взята культура, полученная от Т.В. Тепляковой (Новосибирск).

В качестве активного вещества *G. lucidum* использован 40 % спиртовый экстракт размолотой сухой пленки гриба, выращенной на жидкой питательной среде, и сухого мицелия с зерновой среды.

Предварительно подобраны оптимальные твердые и жидкие питательные среды. В качестве твердых сред использованы ячмень, ячмень с осиновыми опилками, пшеница, лузга подсолнечника, рис. Жидкими средами были неохмеленное пивное сусло и отвары из вышеперечисленных зерновых культур с различными добавками микроэлементов и кальция.

Максимальный выход биомассы гриба *G. lucidum* получен на твердых питательных средах: ячмень, ячмень с опилками (1:2), пшеница, проростки проса с проростками овса (1:1).

Из жидких питательных сред для производства мицелия *G. lucidum* можно рекомендовать отвар ячменя (биомасса гриба 8,2 г/л), отвар пшеница с добавлением раствора микроэлементов и кальция 1 г/л (биомасса 8,5 г/л), неохмеленное пивное сусло в разведении 1:3 (биомасса 12,5 г/л). Культивирование проводили в стационарных условиях.

G. lucidum – известный лекарственный гриб поддерживается в форме мицелия на агаризованной питательной среде. Для получения плодовых

тел был использован твердый питательный субстрат, состоящий из опилок осины, пропитанных неохмеленным пивным суслом в разведении 1:3 (суточная экспозиция), простерилизованный при 1 атм в течение 1,5 ч. Субстрат засыпали в полиэтиленовые пакеты объемом 2000 см³. Засев субстрата осуществлялся зерновым (ячмень) мицелием.

Заращение субстрата происходило в течение 60 дней в условиях повышенной влажности и повышенного содержания углекислого газа при температуре 20-24°C.

Плодовые тела появились на третьем месяце культивирования и представляли собой наросты темно-коричневого цвета (олений rog) с блестящей поверхностью.

В качестве второй составляющей в комбинированном препарате использован меланин, полученный из *A. carbonarius*, как внутриклеточный, так и внеклеточный. Штамм выделен из имаго большой вошиной моли (*Galleria mellonella* L.).

Меланины – собирательное название для группы высокомолекулярных черных и коричневых пигментов. Они образуются при окислительной полимеризации фенолов в живой клетке. Меланины – единственные природные полимеры с сильно развитой системой полисопряжения. Ее характерная особенность: специфическая реакционная способность, обусловленная действием многочисленных парамагнитных центров. Он приостанавливает старение организма, активизирует иммунитет, защищает от ультрафиолетового излучения. Меланин является самым сильным естественным антиоксидантом, известным в природе.

Научное описание грибов рода *Cordyceps* было составлено ранее других грибов – в начале XVIII столетия. На различных континентах, в лесных экотопах встречаются *C. militaris* и *C. clavulata*, которые считаются перспективными агентами микробиометода защиты растений. Различные анаморфы рода *Cordyceps* (типа *Cephalosporium*, *Paecilomyces*, *Hirsutella* и т.п.) нашли практическое применение для подавления численности популяций насекомых в естественных биоценозах и в условиях закрытого грунта.

Кордицепс и его анаморфа *Cephalosporium militare* представляют большой интерес в фармакологическом отношении. В древней китайской и тибетской медицине *C. sinensis* считался одним из ценнейших лекарственных средств для лечения почек, легких, одышки, хронических бронхитов.

Не менее ценен и другой кордицепс – *C. militaris*, из которого сравнительно недавно получен антибиотик кордицепин, подавляющий злокачественные новообразования, усиливающий иммунитет человека.

Современная китайская медицина на основе кордицепсов разработала различные лекарственные препараты, один из которых “Линчжикордицепс” обладает общеукрепляющими, тонизирующими свойствами, улучшает работу мозга.

Нами на основе грибов родов *Cephalosporium* и *Paecilomyces* разработано несколько биологических препаратов для борьбы с нестадными саранчовыми, тепличной белокрылкой и тлями. Грибы рода *Cordyceps* представлены двумя видами *C. militaris*, который выделен из сибирского шелкопряда и волнянки ивово́й, и *C. acicularis*, изолированный из большого соснового долгоносика.

Если грибы рода *Cordyceps* представляют большой интерес в фармакологическом плане, то насколько анаморфы будут отвечать требованиям лекарственных грибов? Наиболее интересны в этом отношении анаморфы *C. militaris* – микромицет *Cephalosporium militare* и *C. lecanii* (= *Verticillium militare*, *V. lecanii*).

Токсикологические эксперименты по определению патогенности (вирулентности, токсичности, токсигенности) грибов проводили на половозрелых беспородных белых мышах и крысах с исходной массой тела 25-30 и 100-140 г соответственно. Низкая летальность подопытных животных после массивного воздействия грибов, продуктов их жизнедеятельности и деструкции позволяет утверждать, что исследованные культуры грибов безопасны для млекопитающих, т.к. не проявляют в выраженной степени вирулентность, токсичность и токсигенность.

Безопасность анаморф *Cordyceps* для млекопитающих открывает возможность их использования не только как препаратов для защиты растений от вредных насекомых, но и препаратов фармакологического направления.

Трамета бабочковидная (*T. versicolor*) среди лекарственных грибов выделяется как продуцент различных антибиотиков и других биологически активных веществ. Гриб является продуцентом протогликанкрестина, а также полисахаридпептида, которые используются как иммуномодуляторы и противоопухолевые препараты при лечении различных форм рака. Из различных штаммов кариола разноцветного в Японии получают препарат “крестин”, в Китае – ПСП.

В условиях Восточной Сибири *T. versicolor* довольно часто встречается на плодовых деревьях – яблоне, груше, сливе, абрикосе. Гриб быстро заселяет трещины и срезы на месте сучков.

Мицелиальная культура из тканевых изолятов получена на питательных средах: сусло-агаре, среде Чапека с дрожжами, отварах корнеплодов и зерновых культур. Настой из плодовых тел, а также культуральная жидкость мицелиальной культуры *T. versicolor* способна сдерживать рост ряда фитопатогенных грибов из родов *Sclerotinia* *Fuck*, *Helminthosporium* *L. exFr.*, *Fusarium* *L. exFr.* Планируется создание технического антибиотика для борьбы с этими возбудителями.

Макромицет *Lycoperdon perlatum* заинтересовал нас оригинальным способом получения лекарственного средства из плодовых тел, описанным в книге “Лекарственные растения в монгольской медицине”. Плодовые тела сжигали в герметически закрытом сосуде до образования

густой черной массы, которая используется для лечения ран, ожогов, кровеносных сосудов.

Полученная таким образом биомасса содержит меланин, который можно затем получить в чистом виде путем щелочного гидролиза с последующим осаждением меланина осаждением в кислой среде и очисткой. По реакционной активности меланин из *L. perlatum* приближается к меланину из *A. carbonarius*.

КОМБИНИРОВАННЫЙ ГРИБНОЙ ПРЕПАРАТ С ВЫСОКОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Огарков Б.Н., Теплякова Т.В.,
Огаркова Г.Р., Самусенок Л.В.

НИИ Биологии при Иркутском государственном университете
Иркутск

Государственный Научный Центр Вирусологии и Биотехнологии
«Вектор»

Наукоград Кольцово, Новосибирская обл.

Основу грибного препарата составляют биологически активные вещества трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* (Fr.) Kast и *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom. Главными элементами трутовика лакированного являются стероидные соединения, флавоноиды, сапонины, аминокислоты, алколоиды, полисахариды, водорастворимые белки и микроэлементы.

По фармакологическому действию ганодерма многофункциональна – препарат повышает сопротивляемость организма к различным заболеваниям, оказывает успокаивающее действие на ЦНС, снимает боль, оказывает противокашлевое и отхаркивающее действие, способствует расслаблению гладкой мускулатуры в бронхах и кишечнике, усиливает работу сердца, снижает уровень холестерина в крови, нормализует артериальное давление, повышает неспецифический иммунитет, улучшает функцию печени. Обладает тонизирующими свойствами, значительно активизирует функцию Т-лимфоцитов, увеличивает количество лейкоцитов в периферической крови, обладает интерфероподобным действием.

Исследования биологически активных веществ *G. lucidum* начаты с культурой, полученной нами от Пола Стейметса (Paul Stamets) из США.

В качестве активного вещества *G. lucidum* использован 40 % спиртовый экстракт размолотой сухой пленки гриба, выращенной на жидкой питательной среде, и сухого мицелия с зерновой среды.

Предварительно для роста гриба были подобраны оптимальные твердые и жидкие питательные среды. В качестве твердых сред использованы ячмень, ячмень с осиновыми опилками, пшеница, лузга подсолнечника, рис. Жидкими средами были неохмеленное пивное сусло и отвары из вышеперечисленных зерновых культур с добавками микроэлементов и кальция.

Максимальный выход биомассы гриба *G. lucidum* получен на твердых питательных средах: ячмень, ячмень с опилками (1:2), пшеница, проростки проса с проростками овса (1:1).

Из жидких питательных сред для производства мицелия *G. lucidum* можно рекомендовать отвар ячменя (биомасса гриба 8,2 г/л), отвар пшеницы с добавлением раствора микроэлементов и кальция 1 г/л (биомасса 8,5 г/л), неохмеленное пивное сусло в разведении 1:3 (биомасса 12,5 г/л).

Для получения плодовых тел был использован твердый питательный субстрат, состоящий из опилок осины, пропитанных неохмеленным пивным суслом в разведении 1:3 (суточная экспозиция), простерилизованный при 1 атм в течение 1,5 ч. Субстрат засыпали в полиэтиленовые пакеты объемом 2000 куб. см, где были сделаны прорезы. Засев субстрата осуществлялся зерновым (ячмень) мицелием.

Заращение субстрата происходило в течение 60 дней в условиях повышенной влажности и повышенного содержания углекислого газа при температуре 20-24°C.

Плодовые тела появились на третьем месяце культивирования и представляли собой наросты темно-коричневого цвета (олений рог) с блестящей поверхностью.

В качестве второй составляющей в комбинированном препарате использован меланин, полученный из *A. carbonarius*, как внутриклеточный, так и внеклеточный. Штамм выделен из имаго большой вошинной моли (*Galleria mellonella* L.).

Меланины – собирательное название для группы высокомолекулярных черных и коричневых пигментов. Они образуются при окислительной полимеризации фенолов в живой клетке. Меланины – единственные природные полимеры с сильно развитой системой полисопряжения. Ее характерная особенность – специфическая реакционная способность, обусловленная действием многочисленных парамагнитных центров.

Меланин также возможно получить из растительного сырья – из оболочек темных сортов винограда, гречневой лузги.

Нами разработана технология получения меланина из гифальных грибов и гречневой лузги.

Полученные препараты охарактеризованы по ряду физико-химических показателей и исследованы методом оптической спектроскопии (табл.1).

Препараты грибного меланина и водорастворимого из лузги гречихи посевной могут быть использованы в качестве биостимуляторов роста растений, повышения радиорезистентности животных и человека. Известны исследования по применению грибных меланинов в качестве противораковых препаратов, ингибиторов перекисного окисления липидов (антиоксидантов), для защиты теплокровных от ультрафиолетового облучения.

Таблица 1.
Характеристика некоторых физико-химических показателей меланинов грибного и растительного происхождения

Показатели	Меланин (пигмент) из гифальных грибов	Меланин (пигмент) водорастворимый гречишный
Элементарный состав (%)	C – 40,85 H – 5,56 N – 2,40	C – 42,36 H – 5,56 N – 2,01
Ширина линии ЭПР	$\Delta H = 5,17$	$\Delta H = 5,17$
g-фактор	2.0047	2.0047
Форма линии ЭПР	асимметричная	асимметричная
Концентрация парамагнитных центров	$6 \cdot 10^{18}$ спин/г	$8 \cdot 10^{17}$ спин/г

Высокая концентрация парамагнитных центров ($6 \cdot 10^{18}$ спин/г) свидетельствует о высокой антиоксидантной активности грибного меланина. Поскольку при исследовании антимуtagenного действия полученного растительного меланина нами ранее установлено, что пигмент способен существенно снижать повреждающее действие мутагена при различных режимах введения, это указывает на перспективу дальнейшей разработки исследованного меланинового пигмента гриба *Aspergillus carbonarius* в качестве пищевой добавки, сочетающей свойства антимутагена и красителя. Это могут быть созданные на его основе безалкогольные лечебно-профилактические напитки, защищающие наследственность человека от неблагоприятных воздействий мутагенов окружающей среды, и другие препараты.

Обе составляющие данного комбинированного препарата работают как выраженные антиоксиданты, защищая организм человека от неблагоприятных воздействий окружающей среды.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ *FOMITOPSIS OFFICINALIS* (VILL.: FR.) BOND. ET SING.

*Ооржак У.С., Шариков А.М.¹,
Громовых Т.И., Ушанова В.М.*

*Сибирский государственный технологический университет
¹ Красноярская государственная медицинская академия
Красноярск*

В настоящее время наблюдается заметный интерес к созданию на основе высших грибов биологически активных веществ, действие которых направлено на укрепление и усиление иммунной защиты организма. Источником для их производства могут служить ксилотрофные базидиомицеты, способные синтезировать широкий комплекс веществ углеводной, белковой, ароматической природы, липидов, а также витаминов. Биомасса базидиомицетов, за счет этих соединений является не только ценным продуктом, но и обладает противоопухолевым, антисклеротическим, иммунокорректирующим действием [1].

Одним из перспективных грибов является ксилотрофный базидиомицет трутовик лекарственный – *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) Bond. et Sing., проявляющий кровоостанавливающее, седативное действие, благотворно действующий на легкие и желудок [2]. Однако вследствие малой изученности его химического состава и отсутствия технологии переработки он до сих пор не находит применения в нашей стране.

В пищевой и фармацевтической промышленности для переработки используют плодовые тела базидиомицетов и их мицелий, выращенные в искусственной культуре. Современные способы переработки высших базидиальных грибов основываются на выделении их физиологически активных соединений в виде экстрактов, биологически активных добавок и лечебных препаратов [3-5].

Целью настоящего исследования являлось изучение биохимического состава и определение бактерицидной активности экстрактов, выделенных из *F. officinalis* в отношении *Bacillus anthracis*.

Объектами исследования служили углекислотные и водные экстракты, полученные из плодовых тел природного гриба *F. officinalis*,

произрастающего на лиственнице сибирской в лесорастительной зоне Тывы (интервале 95–930 в.д. и 50–530 с.ш.). При отборе лекарственного сырья была обеспечена необходимая представительность проб, позволяющая получить достоверные результаты [6].

В ходе исследования был изучен химический состав экстрактов. Установлено, что углекислотный экстракт из плодовых тел *F. officinalis* имеет характерный запах и состоит из эфирного масла (10,82%), ненасыщенных жирных кислот (47,41 %), каротиноидов (3,8 мг%), витаминов Е (14,3 мг%) и А (0,85 %). Углекислотный экстракт представлен в концентрированном виде и может храниться длительное время без изменения качественного состава, на основании чего можно рекомендовать его в состав фармацевтических и косметических препаратов.

В водных экстрактах содержание углеводов составляет 6,84 %, водорастворимых витаминов: В1 – 1,2 мг%, В2 – 7,97 мг%, В6 – 0,58 мг%, Р – 0,072 мг%, полифенольных соединений – 0,28 %. Полученные водные экстракты прозрачны, бледно-желтого цвета, без характерного запаха.

Оценку бактерицидной активности исследуемых экстрактов осуществляли методом лунок [7]. Испытывали серийные разведения углекислотных и водных экстрактов с различными концентрациями. В качестве тест-объектов использовали музейные культуры *Bacillus anthracis*.

Из полученных результатов следует, что наиболее выраженную бактерицидную и бактериолитическую активность проявляет водный экстракт *F. officinalis*, вызывающий зоны подавления роста и лизиса клеток $25 \pm 4,5$ мм. Углекислотный экстракт не имеет бактерицидной и бактериолитической активности. Благоприятный биохимический состав экстрактов из *F. officinalis* дает предпосылки для дальнейших исследований на определение их биологической активности в отношении других условно-патогенных микроорганизмов.

Библиографический список:

1. Белова Н.В. Базидиомицеты – источники биологически активных веществ // Растительные ресурсы. – 1991. – Вып. 2. – С. 8 – 17.
2. Кьюсов П.А. Полный справочник лекарственных растений. – М.: Эксмо, 2002. – 992 с.
3. Рыжова Г.Л., Кравцова С.С., Матасова С.А. и др. Химические и фармакологические свойства сухого экстракта чаги // Химико-фармацевтический журнал. – 1997. – 31. 10. – С. 44 – 47.
4. Горшина Е.С., Скворцова М.М., Бирюков В.В. Технология получения биологически активной субстанции лекарственного гриба кориола опущенного // Биотехнология. – 2003. – № 2. – С. 45 – 53.
5. Пучкова Т.А., Бабицкая В.Г., Щерба В.В. Биологически активная добавка на основе глубинного мицелия гриба шиитакэ (*Lentinus edodes* (Berk. Sing.) // Химия и биотехнология получения биологически активных веществ, пи-

- щевых продуктов и добавок. Экологически безопасные технологии. Материалы международной конференции. Тверь, 2003. – С. 17 – 18.
6. Зайцев Г.Н. Математический анализ биологических данных. М., 1991.
 7. Егоров Р.С. Основы учения об антибиотиках. М.: МГУ, 1994 511 с.

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ВЕРИФИКАЦИЯ КУЛЬТУР МАКРОМИЦЕТОВ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИХ ИНТЕРЕС ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

Псурцева Н.В.

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

В последние десятилетия культуры макромицетов находят все большее применение в медицине в качестве продуцентов биологически активных соединений для производства лекарственных препаратов и биологически активных добавок. Использование генофонда макромицетов, сохраняемого в коллекциях культур, повышает эффективность и надежность такого производства, так как поддержание культур макромицетов в специализированных коллекциях дает возможность сохранения их в биологически активном состоянии за счет создания оптимальных условий поддержания и постоянного контроля. Работа с коллекционными культурами также уменьшает риск, связанный с ошибками как при идентификации исходных образцов грибов, из которых были получены культуры, так и при получении самих культур, поскольку, и идентификация исходных образцов, и выделение в культуру, как правило, проводится профессиональными микологами – специалистами в области таксономии и культуральных исследований.

Примером такой специализированной коллекции является Коллекция Культур Базидиомицетов Ботанического института имени В.Л. Комарова РАН – ЛЕ (БИН). В настоящее время в ее фонде насчитывается 1325 штаммов 482 видов из 185 родов, 50 семейств и 21 порядков агарикоидных, афиллофороидных и гастероидных базидиомицетов по системе, представленной в 8м издании Словаря грибов Айнсворта и Бисби (1995). Культуры фонда имеют широкий географический и экологический охват. Основной объем коллекционного фонда составляют оригинальные штаммы, выделенные сотрудниками Коллекции во время ежегодных полевых работ. Выделение культур макромицетов, представляющих интерес для медицины, является одним из приоритетных направлений развития Коллекции. В настоящее время в коллекции ЛЕ (БИН) поддерживаются культуры таких видов, как *Dictyophora duplicata* (3), *Flammulina velutipes* (24), *Fomes fomentarius* (17), *Fomitopsis*

officinalis (2), *Fomitopsis pinicola* (24), *Ganoderma lucidum* (14), *Grifola frondosa* (4), *Hericium erinaceum* (3), *Heterobasidion annosum* (6), *Hypholoma fasciculare* (7), *Hypsizygos ulmarius* (8), *Inonotus obliquus* (13), *Laetiporus sulphureus* (14), *Lampteromyces japonicus* (3), *Lentinula edodes* (12), *Lenzites betulina* (6), *Panellus mitis* (1), *Phellinus igniarius* (17), *Piptoporus betulinus* (7), *Pleurotus ostreatus* (26), *P. pulmonarius* (42), *Pycnoporellus fulgens* (2), *Pycnoporus cinnabarinus* (6), *Shizophyllum commune* (14), *Trametes hirsuta* (11), *T. suaveolens* (2), *T. versicolor* (3). 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. В последние годы Коллекция пополнилась новыми штаммами базидиомицетов из родов *Flammulina*, *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Trametes* и некоторых других перспективных для медицинских исследований. Была выделена культура аскомицета *Cordyceps militaris*.

Таксономическая идентификация и верификация культур, поддерживаемых в коллекциях, имеет огромное значение. Особенно это важно для культур, используемых в биотехнологии. Известны случаи, когда были потрачены силы и средства на изучение продуктивных штаммов якобы базидиомицетов и на попытку их внедрения в производство, а потом выяснялось, что культуры, с которыми велась работа, принадлежали к низшим грибам. Значение корректной идентификации еще более возрастает, когда культура используется для медицинских целей. Эту проблему можно рассматривать в двух аспектах. Во-первых, штамм может быть выделен из неверно идентифицированного плодового тела, или идентификация может быть проведена в соответствии с устаревшей системой. В этой связи 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. Особое внимание уделяется таксонам, имеющим медицинское значение. Примером могут служить таксономические исследования *Flammulina* и *Pleurotus*, проведенные в мире в течение последних лет и позволившие пересмотреть таксономический состав этих родов. В связи с этим нами были предприняты усилия по верификации коллекционных культур в соответствии с биологической концепцией вида. Для уточнения видовой принадлежности штаммов *Flammulina* и *Pleurotus* из Коллекции ЛЕ (БИН) в лабораторных условиях были получены их плодовые тела. Из базидиоспор были выделены монокарионы этих штаммов и проведено их скрещивание с тест-культурами. Было показано, что р. *Flammulina* представлен в Коллекции не только штам-

мами *F. velutipes*, как предполагалось ранее, но и *F. ononidis*, *F. rossica*, *F. populicola* и *F. fennae*. Под *Pleurotus* представлен в Коллекции штаммами *Pleurotus calypttratus*, *P. cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. dryinus*, *P. eryngii*, *P. ostreatus* и *P. pulmonarius*. Важным результатом проведенной работы явился вывод, что *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 продуцентами тех или иных биологически активных веществ.

Другой проблемой, с которой можно столкнуться при работе с коллекционными штаммами, является замещение культуры базидиального гриба мицелием другого вида, чаще всего из группы несовершенных грибов. Это может произойти как во время выделения культуры, так и в процессе пересевов. Часто это случается при культивировании медленно растущих видов, особенно, при работе с эктомикоризными грибами. Для верификации видовой принадлежности культур и предотвращения подмен в Коллекции ЛЕ (БИН) проводится детальное изучение культуральных особенностей и получение стадии плодообразования в культуре. Так, с целью верификации культур, выделенных в 2004 г., у 25 штаммов была получена генеративная стадия на чашках Петри или субстратных блоках. Это позволило не только подтвердить таксономическую принадлежность штаммов, но и реидентифицировать ряд культур. Изучение культуральных особенностей штаммов – скорости роста на сусло-агаре, макро- и микроморфологических характеристик также во многих случаях дает возможность верификации. Для получения качественного изображения микроморфологических структур в Коллекции используется система аналоговой трансмиссии цифрового изображения на TV экран. Получена фототека микроморфологических особенностей штаммов базидиомицетов, которая может быть использована для сравнительного анализа при верификации. Важную положительную роль при верификации играют современные молекулярные методы. Ряд коллекционных штаммов был верифицированы с использованием PCR анализа. Сиквенирование последовательностей ДНК новых культур *Flammulina fennae*, *Pleurotus calypttratus*, *P. pulmonarius*, *P. dryinus* позволило подтвердить их таксономическую принадлежность. Начаты молекулярные исследования по верификации культур р. *Trametes*. При идентификации природных базидиом пар *T. ochracea/pubescens* и *T. hirsuta/versicolor* часто возникают трудности. Это влечет за собой возможность ошибочного диагноза для культур, выделенных из базидиом этих видов. Современные молекулярно-генетические методы могут помочь проведению корректной идентификации как исходных образцов, так и культур поддерживаемых в коллекциях.

Исследования в этом направлении поддерживаются Фондом РФФИ, гранты 03-04-49604, 04-04-63106 и 04-04-49813.

ПОЛИСАХАРИДЫ ГЛУБИННОГО МИЦЕЛИЯ И КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ГРИБОВ *GANODERMA LUCIDUM* И *LENTINUS EDODES*

Пучкова Т.А., Щерба В.В., Смирнов Д.А., Рожкова З.А.
Институт микробиологии НАН Беларуси
Минск, Беларусь

Установление в конце 60х годов прошлого столетия группой японских учёных онкостатического действия полисахаридов, выделенных из плодовых тел некоторых базидиальных грибов семейств *Polyporaceae*, *Tricholomataceae*, *Agaricaceae*, привело к активному изучению этих соединений, а также поиску их продуцентов. Большинство биологически активных полисахаридов грибов являются линейными или разветвлёнными β-1,3-D-глюканами, гетерогликанами или комплексами β-D-глюкана с белками. Известно, что β-1,3-глюкан активирует макрофаги, связываясь с соответствующим рецептором на их поверхности. Активированные макрофаги являются первым звеном в каскаде иммунных реакций. Они не только «убирают» чужеродные тела (фагоцитоз), но и продуцируют цитокинины, являющиеся регуляторами иммунной системы. Активация иммунной системы β-1,3-глюканом неспецифическая, что позволяет использовать β-глюкан как в профилактических целях, так и в качестве вспомогательного лекарственного средства при различных заболеваниях, сопровождающихся общим снижением иммунитета. Полисахариды грибов обладают также гепатопротекторным, антиоксидантным, хемо- и радиопротекторным, антимикробным, противовирусным, гипополипидемическим и др. действием. В Японии выпускается около десятка препаратов на основе глюканов, полученных из плодовых тел высших базидиомицетов, которые составляют около 30% рынка онкостатиков и иммунокорректоров. Наиболее известные коммерчески доступные полисахариды, получаемые из базидиальных грибов, — лентинан (из *Lentinus edodes*), PSP и PSK (из *Trametes versicolor*) и сонифилан (из *Schizophyllum commune*). В плодовых телах *Ganoderma lucidum* обнаружен онкостатический и иммуностимулирующий полисахарид — ганодеран, *Pleurotus ostreatus* — плевран, *Grifola frondosa* — грифофан, и др.

В последнее время внимание исследователей привлекает получение полисахаридов из глубинного мицелия грибов и культуральной жидкости, которое позволяет увеличить их выход и значительно сократить длительность процесса получения конечного продукта с меньшей вероятностью контаминации. Учитывая вышеизложенное, целью работы являлось изучение физико-химических свойств, состава и структуры этих соединений, образуемых при глубинном культивировании грибов *L. edodes* и *G. lucidum*.

Грибы выращивали в колбах Эрленмейера на качалке (180 об/мин) при температуре 25-30°C, в течение 7 суток на оптимизированной полусинтетической питательной среде. Экзополисахариды получали по [1], эндополисахариды — по [2]. Ионообменную хроматографию полисахаридов проводили на ДЭАЕ целлюлозе в ОН—форме, колонка 2,5x20 см. Фракции полисахаридов последовательно элюировали дистиллированной водой и 1M NaCl. Содержание полисахаридов во фракциях определяли фенол-сернокислотным методом. Гельхроматографию полисахаридов осуществляли на сефадексе G-200, колонка 1x25 см. В качестве элюента использовали фосфатный буфер с pH 7,2. Объем наносимой пробы — 0,5-1,0 мл. Скорость потока — 3-5 мл/час. Молекулярную массу изучаемых полисахаридов определяли по калибровочной кривой, которую строили по декстранам, имеющим определенную молекулярную массу (20, 40, 70, 500 кДа («Fluka»)). Свободный объем колонки определяли по голубому декстрану (2000 кДа, «Pharmacia»).

Полисахариды, синтезируемые *L. edodes* и *G. lucidum*, не растворимы в неорганических и органических кислотах, органических растворителях (спирте, ацетоне, хлороформе и т.д.). Экзополисахарид при нагревании частично растворялся в дистиллированной воде, лучше — в щелочах и диметилсульфоксиде. Эндополисахарид полностью растворялся в воде при нагревании.

Водорастворимые экзополисахариды *G. lucidum* и *L. edodes* составляют 6,7 и 5,8%, соответственно, растворимые в 1% NaOH — 8,4 и 14,9%, в 10% NaOH — 44,9 и 60,9%, нерастворимый остаток — 40,0 и 18,4%. Кинематическая вязкость 0,1% растворов экзополисахаридов *G. lucidum* составляла 1,51-2,13 мм²/с, *L. edodes* — 2,27-3,15 мм²/с. Удельное вращение плоскости поляризации 0,1% растворов экзополисахаридов: *G. lucidum* — водорастворимая фракция — $[\alpha]_D^{20} -250$, щелочерастворимая — $[\alpha]_D^{20} +15,20$; *L. edodes* — $[\alpha]_D^{20} +1300$ и $[\alpha]_D^{20} -6,50$. Молекулярная масса полисахарида водорастворимой фракции *L. edodes* — меньше 10 кДа, щелочерастворимой — 200-300 кДа. В водорастворимой фракции *G. lucidum* преобладал полисахарид с Mг меньше 10 кДа, а также имелось незначительное количество полисахарида с Mг 500 кДа, в щелочерастворимой — полисахарид с Mг 500 кДа.

Кинематическая вязкость 0,1% водных растворов эндополисахаридов различалась у исследованных грибов незначительно, была близка к вязкости воды (0,89 мм²/с) и составляла у *G. lucidum* — 0,96 мм²/

с, *L. edodes* – 1,12 мм²/с. Удельное вращение плоскости поляризации 0,1% растворов эндополисахаридов $[\alpha]_D^{20}$ составляло: *G. lucidum* – водная фракция $-\alpha]_D^{20} + 10,90$, элюируемая 1М NaCl – $[\alpha]_D^{20} + 1150$; *L. edodes* – $[\alpha]_D^{20} - 8,70$ и $[\alpha]_D^{20} - 440$.

Гельхроматография фракций эндополисахаридов *G. lucidum* показала, что элюируемая водой фракция гомогенна, её молекулярная масса составляла 500 кДа. Фракция, элюируемая 1М NaCl, гетерогенна: преобладал полисахарид с молекулярной массой 500 кДа, а также присутствовал низкомолекулярный полисахарид (Mг меньше 10 кДа).

Элюируемая водой фракция эндополисахарида *L. edodes* гетерогенна по своему составу. В ней преобладал полисахарид с молекулярной массой 500 кДа, присутствовали также низкомолекулярные полисахариды (Mг меньше 10 кДа). Во фракции, элюируемой 1М NaCl, у *L. edodes* наблюдалось приблизительно одинаковое соотношение низко- (Mг меньше 10 кДа) и высокомолекулярных (500 кДа) полисахаридов. Полисахариды грибов – пептидогликаны с содержанием белка 1,2-3,9% (*G. lucidum*) и 5,1-5,9% (*L. edodes*).

По углеводному составу полисахариды исследованных грибов – гетерогликианы. Углеводный состав водорастворимой фракции экзополисахарида *G. lucidum* представлен глюкозой (95,01%) и галактозой (4,99%), тогда как щелочерастворимая фракция состоит из глюкозы (98,44%) и маннозы (1,56%). В составе элюируемой водой фракции эндополисахарида *G. lucidum* обнаружены глюкоза (91,43%), манноза (3,21%) и галактоза (5,36%), а элюируемой солью – глюкоза (96,55%) и манноза (3,45%).

Экзополисахариды водорастворимой и щелочерастворимой фракций *L. edodes* схожи между собой и содержат 6,90 и 2,77% маннозы и 93,10 и 97,23% глюкозы. Отличительной особенностью водорастворимого и солерастворимого эндополисахаридов *L. edodes* является наличие значительного количества галактозы (36,14 и 12,38%). Глюкоза у этих полисахаридов составляет 61,20 и 78,26%, манноза – 2,66 и 9,36%. На основании исследования структуры полисахаридов с использованием ИК-спектроскопии и деградации по Смитсу установлено, что экзо- и эндополисахариды являются разветвленными гликанами, содержащими α и β гликозидные связи. Основная цепь представлена глюканами с C1→C3, боковые цепи – гликанами с C1→C4 и C1→C6 гликозидными связями.

Результаты исследований показали, что по физико-химическим свойствам, структуре и углеводному составу полисахариды исследованных грибов близки β -(1→3)-D-глюканам плодовых тел (лентинан, ганодеран), составляющим основу ряда лекарственных средств иммуностимулирующего и онкостатического действия, что открывает перспективу использования полисахаридов глубинного мицелия и культуральной жидкости для получения лечебно-профилактических препаратов.

Литература

1. Щерба В.В., Бабицкая В.Г. Образование внеклеточных полисахаридов некоторыми видами базидиомицетов // Прикл. биохимии и микробиол. – 1997. – Т. 37, № 4. – С. 419-423.
2. Гончарова И.А., Щерба В.В., Бабицкая В.Г. Полисахариды клеточной стенки базидиомицета *Coriolus hirsutus* // Прикл. биохимии и микробиол. – 1996. – Т. 32, № 4. – С. 434-437.

ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНОСТЬ СОРБЦИИ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ БИОМАССОЙ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Ровбель Н.М., Гончарова И.А.
Институт микробиологии НАНБ
Минск, Беларусь

Отсутствие во многих регионах реальной возможности снизить уровень хронического поступления в организм человека тяжелых металлов, радионуклидов, пестицидов, других токсикантов и связанного с ним накопления токсичных соединений эндогенного происхождения при нарушении обменных процессов вызвало необходимость появления так называемой «экологической медицины», которая широко использует сорбционные методы лечения и профилактики широкого круга заболеваний.

Перспективными сырьем для получения экологически чистых субстанций с высокими сорбционными характеристиками являются высшие дереворазрушающие базидиальные грибы с лекарственными свойствами, выращенные в условиях глубинного культивирования. Глубинная биомасса базидиомицетов, благодаря высокому содержанию клеточных стенок, структурной основой которых является неперевариваемый хитин-глюкановый комплекс, способна активно связывать и выводить из организма ионы токсичных металлов. Важной характеристикой грибной биомассы как сорбента является не только величина сорбционной емкости, но и селективность (избирательность) связывания тех или иных металлов. Закономерности, характеризующие процесс предпочтительного связывания ионов тяжелых металлов, однозначно проявляются при сравнении процессов сорбции, происходящей как в однокомпонентных растворах, так и в смесях.

Объектом исследования были 20 культур высших базидиальных грибов из коллекции Института микробиологии НАН Беларуси, принадлежащих к 10 видам: *Pleurotus ostreatus* (Fr.) P. Kumm., *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., *L. lepideus* (Fr.) Fr., *Crinipellis schevchenkovi* Buchalo, *Trametes hirsuta* (Wulfen: Fr.) Pilat, *T. versicolor* (L.: Fr.) Pilat, *Piptoporus betulinus*

(Bull.: Fr.) *P. Karst.*, *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilat, *Phellinus robustus* (Karst.) Bourd. et Galz u *Ganoderma lucidum* (Curtis.: Fr.) *P. Karst.*

На примере данных культур была изучена селективность связывания ионов тяжелых металлов — двухвалентных Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Cd и Pb из эквимолярных растворов с исходной концентрацией 0,25 мМ, чтобы избежать эффекта соосаждения ионов тяжелых металлов, которое может наблюдаться в сорбционных смесях с высокой концентрацией сорбата.

Для исследованных грибов среднее значение сорбционной емкости биомассы по отношению к ионам широко распространенного поллютанта свинца составляло 0,062x0,015 ммоль/г. Наиболее высокой сорбционной емкости биомассы с близкими значениями (0,08 ммоль/г) обладали грибы *G. lucidum*, *L. lepideus* и *T. hirsuta*.

Сорбция ионов высокотоксичного кадмия для исследованных грибов варьировала в широком диапазоне от 0,01 до 0,10 ммоль/г, среднее значение составило 0,051x0,027 ммоль/г. Лучшим сорбентом ионов кадмия оказался гриб *T. hirsuta* (0,10 ммоль/г). Сорбционная активность его биомассы значительно превосходила активность других изученных грибов. Активно связывали данный металл грибы *G. lucidum*, *L. lepideus*, *L. edodes*, однако сорбционный потенциал биомассы этих грибов был на 22–24% ниже, чем у *T. hirsuta*. Довольно низкой способностью к сорбции ионов кадмия обладали грибы *Ph. robustus* и *P. betulinus*, их сорбционная активность уступала активности биомассы с *T. hirsuta* соответственно в 6 и 7 раз.

Среднее значение сорбционной емкости биомассы грибов по отношению к ионам меди составляло 0,033x0,010 ммоль/г. Наиболее активно данный металл связывала биомасса грибов *T. hirsuta* и *G. lucidum*. Сорбционная емкость грибов *Ph. robustus* и *P. ostreatus* была на треть ниже. Различия между минимальным (*L. edodes*) и максимальными (*T. hirsuta*) значениями составляли 2,5 раза.

При изучении связывания ионов марганца, кобальта, никеля и цинка грибной биомассой наблюдались закономерности характерные для сорбции иона меди. Величины сорбционной емкости варьировали в весьма широком диапазоне и среднее значения сорбционной емкости грибов по этим ионам составляло 0,028x0,015 ммоль/г., уступая данному параметру по отношению к ионам кадмия и свинца и в среднем в 1,5 и 2 раза, соответственно.

Для характеристики поглотительной способности и селективности сорбентов в отношении тяжелых металлов широко используются коэффициент распределения — Kd, характеризующий соотношение концентраций вещества в жидкой и твердой фазе. При Kd<1 сорбент обеднен, при Kd>1 сорбент обогащен веществом по сравнению с равновесным раствором.

Наиболее высокие коэффициенты распределения, превышающие 1000 мл/г, отмечены в системах грибная биомасса — ионы свинца для

культур *G. lucidum* 14, *L. edodes* 104 и *T. hirsuta* 27. *T. hirsuta* 27 проявил себя как высокоэффективный концентратор ионов кадмия, Kd по отношению к данному металлу достигал 920 мл/г. У сорбента «Полифепан» данный показатель был 5–6 раз ниже.

Марганец, кобальт, никель, медь и цинк, токсичные в повышенных концентрациях, относят к микроэлементам, которые в малых количествах необходимы для нормального функционирования организма. Коэффициенты распределения для катионов микроэлементов биомассы 20 изученных базидиомицетов колебался от 25 до 400 мл/г. Наиболее низкими значениями Kd по отношению к микроэлементам обладал *P. betulinus*, по отношению к ионам кадмия этот показатель был тоже наиболее низок, менее 50. Наименьшую разницу в Kd всего изученного спектра металлов имел темноокрашенный мицелий грибов *Ph. robustus* и *I. obliquus*, что дает основания говорить об относительно невысокой селективности меланинсодержащей биомассы.

В отличие от грибов лигниновый сорбент «Полифепан» характеризовался предпочтительностью связывания ионов меди и цинка, значение Kd для данных металлов составило 717 и 563 соответственно, что было более чем в два раза выше, чем для ионов свинца и кадмия.

Результаты исследования показывают, что в случае одновременного присутствия в продуктах питания различных тяжелых металлов, что наиболее часто встречается в реальных условиях, ионы кадмия и свинца будут связываться в первую очередь и лишь затем — ионы микроэлементов. Использование грибных сорбентов позволит вывести из организма высокотоксичные металлы, избежав при этом нарушения минерального баланса организма.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ СУБСТРАТЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ

Соломко Э.Ф., Ломберг М.Л., Балагура А.Н.
Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины
Киев, Украина

По прогнозам специалистов, культивируемым съедобным и лекарственным грибам принадлежит исключительная роль в подъеме экономического благосостояния и улучшения здоровья населения планеты в 21 веке. Эти прогнозы основываются на том, что при использовании современных грибных технологий более 70% ежегодно возобновляемых отходов растениеводства и лесного хозяйства могут быть превращены

в экологически чистые физиологически функциональные пищевые продукты и лекарственные препараты различного фармакологического действия.

В странах СНГ, как и в большинстве стран Европы, пока широко культивируют только шампиньон двуспоровый (*Agaricus bisporus* (J. Lge) *Imbach*) и вешенку обыкновенную (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) *Kumm*), хотя в мировом грибоводстве в настоящее время используют уже 39 видов съедобных и лекарственных макромицетов. Обоснование возможности расширения объектов отечественного грибоводства за счет видов, для которых по современным данным установлено иммуностимулирующее, антиоксидантное, онкостатическое и другое фармакологическое действие заслуживает, на наш взгляд, особого внимания.

В последние годы Коллекция культур шляпочных грибов Института ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины существенно пополнилась новыми видами и штаммами таких лекарственных грибов как *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing., *Auricularia* spp., *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) P. Karst., *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst., *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S. F. Gray, *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers., *Hypsizyugus marmoreus* (Peck) Bigel., *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. и др. Большинство перечисленных видов культивируют в промышленном масштабе в странах Юго-Восточной Азии на традиционных опилочных субстратах или на альтернативных субстратах из числа отходов переработки риса, чая, бананов, кофе, кукурузы, ананасов и других видов сельскохозяйственной продукции. Очевидно, что такие субстраты нельзя считать подходящими для использования в грибоводстве европейских стран, имеющих иную структуру растениеводства. Учитывая это, наше исследование предполагало отбор штаммов из числа новых для европейского грибоводства видов лекарственных грибов, разработку условий производства посевного материала и проверку способности культур к плодоношению на ряде лигно-целлюлозных субстратов.

По результатам широкого сравнительного исследования скорости роста вегетативного мицелия более 130 культур лекарственных грибов на агаризованных питательных средах различного состава нами были отобраны наиболее перспективные штаммы 10 видов. На следующем этапе исследования были установлены оптимальные физико-химические параметры (температура, pH сред) для роста вегетативного мицелия отобранных культур, а также недорогие агаризованные и жидкие питательные среды для выращивания инокулюма, которые могут быть рекомендованы для отечественных лабораторий по производству посевного мицелия. Важно отметить, что оптимальное значение pH сред для роста мицелия таких видов как *Hypsizyugus marmoreus*, *Psilocybe cubensis* (Earle) Sing., *Auricularia* spp. и отдельных штаммов *Grifola frondosa* оказалось выше чем 6,5. Это следует учитывать при приготовлении посевного мицелия, а также говорит о том, что субстраты для культивирования указанных видов должны включать такие дополнительные компоненты

как мел и гипс, в количествах, необходимых для обеспечения pH, благоприятного для активного роста мицелия каждой культуры.

Применение глубокой культуры, как физиологически активно-го жидкого инокулюма, для получения посевного мицелия первой генерации весьма эффективно для всех изученных видов, но особенно целесообразно его применение для таких относительно медленно растущих лекарственных грибов как *Grifola frondosa*, *Hypsizyugus marmoreus* и *Lentinus edodes*. Ряд отобранных штаммов видов *Agrocybe aegerita*, *Ganoderma lucidum*, *Psilocybe cubensis*, *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc., *Schizophyllum commune* Fr.: Fr. и др. по комплексу ростовых характеристик (скорость роста, выход биомассы и др.), полученных на синтетических средах, представляют самостоятельный интерес для создания биотехнологий получения лекарственных препаратов путем глубокого культивирования этих известных продуцентов уникальных антибиотиков (*A. aegerita*), психотропных алкалоидов (*P. cubensis*), терпенов (*G. lucidum*), биологически активных протеин-глюкановых комплексов иммуностимулирующего действия, включающих такие высокомолекулярные полисахариды, как шиизофилан (*Sch.commune*) и др.

Задача следующего этапа исследований состояла в подборе субстратов из числа отходов растениеводства Украины, а также биостимулирующих добавок, благоприятных для роста вегетативного мицелия и плодоношения отобранных культур. В качестве контроля был использован классический субстрат из опилок твердых пород деревьев (бука) с добавкой 10% пшеничных отрубей или кукурузной муки, рекомендуемый для большинства ксилотрофных видов. Нами впервые установлено, что в качестве наиболее универсального и благоприятного альтернативного субстрата для культивирования видов *Auricularia polytricha*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Lentinus edodes*, в равной степени как и для таких видов рода *Pleurotus*, как *P. citrinopileatus* Sing., *P. sajor-caju* (Fr.) Sing. (*P. pulmonarius* (Fr.) *Quel.*) и *P. djamor* (Fr.) *Boedjin* можно с успехом использовать лузгу семян подсолнечника. Субстраты, основу которых составляли солома пшеницы, измельченные стержни початков кукурузы, костра льна и шелуха гречихи с добавлением пшеничных отрубей, оказались менее универсальными, хотя и они могут быть использованы для культивирования тех или иных видов лекарственных грибов: солома — для *G. frondosa* и *P. cubensis*, костра льна — для *F. velutipes* и т.п. Обнадешивающие результаты получены в производственных испытаниях по плодоношению селективированных нами штаммов *Lentinus edodes*, *Pleurotus djamor*, *P. eryngii*, *Ganoderma lucidum* и *Flammulina velutipes*, проведенных в ряде грибоводческих хозяйств юга Украины. На различных комбинациях субстратов, включающих лузгу семян подсолнечника, нами получен более высокий урожай плодовых тел и выход по субстрату при значительном, по сравнению с классическим опилочным субстратом, сокращении сроков всего технологического цикла.

Таким образом, мы полагаем, что дальнейшая оптимизация состава субстратов, применительно к конкретным, новым для европейского грибоводства видам лекарственных грибов – реальный путь расширения ассортимента грибных продуктов питания общеукрепляющего и адаптогенного действия, а также возможность создания сырьевой базы для получения тех или иных лекарственных и лечебно-профилактических препаратов отечественного производства.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГРИБА *ARTHROBOTRYS LONGA* В СВЯЗИ С НЕМАТОФАГОВЫМИ СВОЙСТВАМИ И АКТИВНОСТЬЮ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Теплякова Т.В., Максимова Р.А., Воробьёва И.Г.

*Государственный Научный Центр Вирусологии и Биотехнологии
«Вектор»*

Наукоград Кольцово, Новосибирская обл.

Проведена оценка нескольких штаммов хищных грибов рода *Arthrobotrys*, выделенных из почвы Новосибирской области, на способность к образованию фибринолитических ферментов, в результате чего было установлено, что штамм *A. longa* № 1 (а.с. № 745943, 1980) обладает повышенной активностью к продуцированию таких ферментов по сравнению со штаммом *Trichothecium roseum Link* (а.с. № 469348, 1973), с которым проводились исследования ранее.

Вновь выделенный штамм *A. longa* № 1 характеризовался хорошими нематофаговыми свойствами и следующими морфолого-культуральными особенностями.

На ряде питательных сред (Чапека, сусло-агар, пептонно-кукурузный агар) гриб образовывал широкорастающие белые пушистые колонии, с возрастом розовеющие. На конидиеносцах, трудно отличимых от вегетативных гиф, формируются макроконидии грушевидной формы, размером 20х40 мкм, двухклеточные, с перегородкой ниже середины.

При росте в погруженной культуре в колбах на качалке, имеющей 240 об/мин, при 25-26°C в течение 144-168 часов на жидком сусле и синтетической среде наблюдается образование мелкодисперсной густой массы. При этом мицелий распадается на отдельные участки и имеет место интенсивное образование одноклеточных микроконидий, величиной 3-5 мкм. Микроконидии образуются непосредственно на гифах вегетативного мицелия. Культуральная жидкость имеет вид раз-

веденного молока, плохо фильтруется, пигменты во внешнюю среду не выделяются.

Образование ферментов в погруженной культуре в колбах на качалке при 25-26°C происходит через 144-168 часов роста. Сравнительные данные фибринолитической активности ферментов, выделяемых в среды *A. longa* № 1 и *Trichothecium roseum Link* представлены в табл.1.

Из данных табл.1 следует, что штамм *A. longa* № 1 значительно превосходит по фибринолитической активности гриб *T. roseum*, используемый в работе лаборатории антибиотиков МГУ.

Таблица 1 Сравнение фибринолитической активности ферментов грибов *A. longa* № 1 и *T. roseum*

Вид	Фибринолитическая активность, мм ²		Среды
	Общая	Активаторная	
<i>Arthrobotrys longa</i> № 1	420-400	240-200	синтетическая
<i>Trichothecium roseum</i>	360-200	120-80	того же состава +сахар пищевой

Снижение ферментативной активности гриба *A. longa* при хранении способствовало изучению его физиологии и поиску возможных путей повышения его биосинтетической активности.

Проведение ряда пассажей исходного штамма *A. longa* № 1 через суспензию нематод *Panagrellus redivivus* показало, что несмотря на усиление культурой способности формировать ловчие приспособления, фибринолитическая активность не повышалась. Это указывает на отсутствие связи биосинтеза фибринолитических ферментов и акта хищничества.

Высказано предложение, что продуцентом фибринолитических ферментов является сапротрофный биотип (Максимова, Шаркова и др., 1986).

Следует отметить, что колония сапротрофного биотипа, растущая на агаризованных средах (сусло-агар, пептонно-кукурузный агар) по своим характеристикам резко отличалась от описания исходной культуры *A. longa* № 1 (а.с. № 745943, 1980), впервые использованной в качестве продуцента фибринолитических ферментов. Колонии этого биотипа на агаризованной среде имели скудный рост, мицелий – шерстистый вид, цвет розовато-желтоватый, микроконидии формировались не обильно на веточках мицелия, отходящих от мощных тяжей мицелия.

Для установления истинного происхождения микроконидий было проведено детальное исследование разных биотипов *A. longa*, штамма № 1.

По нашему предположению продуцентом фибринолитических ферментов мог быть микофильный гриб, который при росте в жидкой питательной среде получал преимущественное развитие и был выделен в более активный штамм *A. longa* № 7. Этот штамм резко отличался по своим морфологическим и биохимическим особенностям от исходного штамма *A. longa* № 1.

В коллекции в Новосибирске сохранялась культура *A. longa-H*, которая, после выделения гриба из почвы, периодически пересеивалась на питательные среды, при этом внешние морфологические особенности колоний соответствовали описанию вида по определению Н.А. Мехтевой (1979).

Через 10 лет в Новосибирск были отправлены 2 культуры штамма *A. longa* № 1 со следующими характеристиками фибринолитической активности (табл.2).

Таблица 2 Характеристика фибринолитической активности некоторых штаммов *A. longa*

Штамм	Фибринолитическая активность	
	общая	активаторная
<i>A. longa</i> № 1	255	0
<i>A. longa</i> № 7	600	312

Сравнивая данные, приведенные здесь и в табл.1 можно видеть, что исходный штамм *A. longa* № 1 снизил общую фибринолитическую активность с 420-400 до 255, а активаторную потерял совсем. Зато микроконидиальный штамм *A. longa* № 7 превосходил свой штамм-предшественник по обоим показателям.

Исходя из предположения, что основным продуцентом фибринолитических ферментов является не хищный гриб-гифомицет, а сопутствующий ему микофил, предположительно из рода *Cephalosporium*, мы провели следующие исследования:

1. Изучили микроморфологические особенности исходной культуры *A. longa-H* и *A. longa* №1.
2. Провели ряд пассажей всех вариантов (штаммов) *A. longa* через нематод *P. redivivus*. Здесь ставилась цель – усилить хищничество и очистить исходную культуру *A. longa* от предполагаемого микофильного гриба.
3. Проверили на фибринолитическую активность 3 культуры грибов (х, у, z) с микроконидиальным спороношением, которые были выделены из глубинной и поверхностной культур хищных грибов из родов *Arthrobotrys* и *Colovinia*.

В результате установлено, что исходная культура *A. longa-H* соответствовала её первоначальному описанию, однако, кроме характерно-го спороношения в виде двуклеточных грушевидных конидий, встре-

чались одноклеточные мелкие микроконидии, а внутри широких гиф – тонкие гифы другого гриба.

Культура *A. longa* №1 имела древовидный, шерстистый мицелий, в районе тяжелой мицелии встречались круглые хламидоподобные образования. Присутствовали классические двуклеточные грушевидные конидии, но более обильными были микроконидии.

Культура *A. longa* №7 была похожа на №1, но спороношение было представлено в основном микроконидиями.

При помещении кусочков всех вариантов культур в суспензию нематод *P. redivivus* было установлено, что у культуры *A. longa* – Н нематофаговый эффект проявлялся на вторые сутки, что выражалось в образовании ловчих петель на мицелии и гибели нематод (80%). У *A. longa* №1 были отмечены единичные ловушки только через неделю после помещения гриба в суспензию нематод. В культуре *A. longa* №7 ловушки отмечены не были, нематоды оставались длительное время живыми, что свидетельствует об отборе микроконидиальной формы гриба, являющейся по своей сути грибом-микофилом. Этот гриб может существовать в культуре хищных грибов длительное время, не обнаруживая себя при пересевах на агаризованных питательных средах и проявляясь при погруженном культивировании. По идентификации, проведенной Т.К. Кальвиш (БИН СО АН СССР) гриб-микофил относится к роду *Cephalosporium* (*Cephalosporium* sp.).

Проведение 5 пассажей с пересевами макроконидий *A. longa* № 1 и *A. longa* – Н на питательные среды позволило получить типичные для *A. longa* колонии с макроконидиальным спороношением. Анализ нематофаговой активности показал, что хищный гриб в этих вариантах активно образует ловчие органы, гибель нематод через 1 сутки составляет 80%, через 2 суток – 100%.

Количество ловушек и скорость гибели нематод после 2-3-х пассажей через нематод увеличивается. Наряду с конидиями в культуре на мицелии и проростках конидий образуются хламидоспоры, количество которых также после 2-го пассажа увеличивается. Микроконидий не отмечается. В гифах хищного гриба грибов других видов не обнаружено.

Исходя из предложений, что продуцентом фибринолитических ферментов является не хищный, а сопутствующий ему микофильный гриб, была проведена оценка фибринолитической активности исследуемых вариантов культур грибов, также вновь выделенных из хищных грибов микофилов (х, у, z). Данные представлены в табл.3.

Данные, приведенные в таблице 3, подтверждают наше предположение о том, что продуцентом фибринолитических ферментов является не хищный гриб *A. longa*, а сопутствующий ему гриб-микофил. У очищенной культуры *A. longa* (1 и 5 пассажей через нематод и питательные среды) не наблюдается микроконидий и отсутствует фибринолитическая активность.

Таблица 3.
Фибринолитическая активность некоторых вариантов *A. longa*
и микофильных грибов, выделенных из хищных гифомицетов

Вариант	Характеристика глубинной культуры	Фибринолитическая активность			
		общая		активаторная	
		120 ч	240 ч	120 ч	240 ч
A. longa № 1	Мицелий тонкий, густой, есть микроконидии	50	290	0	190
A. longa № 7	Обилие микроконидий и фрагментов мицелия	380	660	330	350
A. longa –Н (1 пассаж через нематод)	Мицелий широкий, ровный, редкий	0	0	0	0
A. longa –Н (5 пассажей через нематод)	Мицелий ровный, широкий, редкий	0	0	0	0
X/из A. flaggans	Микроконидии, фрагменты мицелия	48	255	20	125
У/из Golovinia sp.	Микроконидии, фрагменты мицелия	144	450	0	126
Z/из Arthrotrys sp.	Микроконидии, фрагменты мицелия	50	360	0	80

Наибольшую активность проявляет вариант *A. longa* № 7, так как он представлен микофильным грибом, выделенным из *A. longa* в процессе глубинного культивирования, активность которого значительно повысилась в результате подбора сред и работы с культурой.

A. longa № 1 состоит в основном из микофила, выделенного сразу же после оценки гриба *A. longa*-Н на фибринолитическую активность. В культуре имеются и макроконидии, представляющие хищный гриб. В погруженной культуре преимущественное развитие получает микофильный гриб, выделяя в среду ферменты, а в суспензии нематод немногочисленные макроконидии могут формировать мицелий хищного гриба с улавливающими приспособлениями и конидии новой генерации.

Показатели фибринолитической активности штаммов X, Y, Z впоследствии идентифицированные как *Paecilomyces farinosus* (X, Y) и *P. fumoso-roseus* (Z), выделенных из хищных грибов, подтверждают, что

именно грибы-паразиты хищных грибов являются истинными продуцентами фибринолитических ферментов.

По нашему мнению, это позволяет вести целенаправленный поиск эффективных продуцентов фибринолитических ферментов среди микофильных грибов, в том числе паразитирующих на видах хищных грибов.

В культуре гриба *Trichothecium roseum* – продуцента антибиотика трихотетина и фибринолитических ферментов, в ранних исследованиях также установлено наличие полиморфизма спороношения (Matruchot, 1892; Максимова, Пальмова, 1969). Однако наши предварительные исследования показали, что культура гриба *T. roseum* может быть, по аналогии с *A. longa*, представлена ассоциацией двух грибов со сложными взаимоотношениями, которые им, возможно, выгодны в природных условиях. Детальное изучение таких ассоциаций грибов в культуре поможет регулировать процессы получения необходимых биологически активных соединений.

МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ КАК ОСНОВА СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Феофилова Е.П.

*Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН
Москва*

В докладе развивается современная идея о сообществе и тесном общении клеток микроорганизмов, превращающих их в единый надклеточный «организм», управляемый системой химических контактов и коммуникаций. Исходя из этого принципа, популяции микроорганизмов могут быть сопоставлены с организацией клеток у высших эукариотов, что находит подтверждение в результатах исследований в области таких новых направлений биологии как микробная эндокринология и биохимическая адаптация к стрессовым воздействиям. Данные последних лет показывают также, что коммуникация клеток, а именно в процессах их прорастания и размножения, перехода во вторую фазу развития (идиофазу), образования покоящихся клеток, контролирует течение биотехнологического процесса.

В коммуникациях клеток большое значение принадлежит специальным сигнальным молекулам, которые называют гормонами или фе-

ромонами, и которые контролируют ряд фундаментальных процессов в популяции грибов, в частности процессы их репродукции. Поэтому основная часть доклада будет посвящена секс-гормонам грибов (сиренину, паризину, антеридиолу, 7-кето-С29-стерину, триспорovým кислотам и др.), их эволюции, сходству с гормонами высших эукариотов, процессу гетероталлизма и современным биотехнологиям, использующим результаты исследований указанных направлений. В докладе приводятся данные об общности гормонов грибов и млекопитающих, в частности стероида 5- α -андрост-16-ен-3- α -ола – метаболита черного трюфеля *Tuber melanosporum*, являющегося у борова феромоном. В этом же плане интересно сходство между гормоном грибов сиренином и ювенильными гормонами, в частности ювабионом насекомых, а также между триспорowymi кислотами мукоровых грибов, ретардантом роста растений (абсцизовой кислотой) и ретинойвой кислотой (морфогеном позвоночных). Не меньший интерес представляет тот факт, что инсулин подобный гормон найден среди микроорганизмов, начиная с архей и кончая грибами, например, у *Neurospora crassa*. С позиций эволюции гормонов в докладе приводится гипотеза (Roth et al., 1982) о том, что некоторые биохимические механизмы современной эндокринной системы имели аналог в одноклеточном организме, и что ряд грибных молекул, используемых в роли мессенджеров в механизме трансдукции и контролирующих ответ грибной клетки на действие эндогенных гормонов, обнаруживают тесное сходство с таковыми в клетках млекопитающих. На примере *Dictyostelium discoideum*, *Polysphondylium sp.* рассматривается также ряд хемотаксических сигналов (гормон акразин и др.) в агрегации клеток и образовании колоний и плодовых тел.

Особое внимание будет уделено современным представлениям о взаимодействии гормонов человека с патогенными грибами при возникновении микозов (*Coccidioidomycosis*, *Paracoccidioidomycosis*, *Candidosis*, *Dermatophytosis*) и роли пола гетероталлических грибов в этих процессах. Межклеточные взаимодействия рассматриваются также на примере механизмов передачи сигналов при контактировании клеток фитопатогенных грибов и растений в процессе их инфицирования грибами. В докладе приводится еще один тип клеточных контактов – энергетическая кооперация между клетками посредством ионных потоков и электронных токов на модели *Neurospora crassa*.

В заключительной части доклада на примере биотехнологических процессов (получение β -каротина и др.) рассматривается значение коммуникации клеток в морфогенезе мицелия и роль гормонов грибов в получении конечных продуктов ферментаций.

ПОЛУЧЕНИЕ γ -ЛИНОЛЕНОВОЙ КИСЛОТЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДРОЖЖЕПОДОБНЫХ КЛЕТОК ГРИБА *MUCOR LUSITANICUS* ИНМИ

Фунтикова Н.С., Мысякина И.С., Катомина А.А.
Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН
Москва

γ -Линоленовая кислота является активным началом многих лекарственных препаратов, используемых в медицине, косметике и диетологии. Эту полиненасыщенную кислоту получают из семян растений, в частности, примулы вечерней (*Oenothera*). Однако успехи, достигнутые в последние годы при изучении липидов грибов, стимулировали исследования по созданию биотехнологий получения γ -линоленовой кислоты из биомассы таких мицелиальных грибов как *Mortierella*, *Cunninghamella* и *Mucor*.

В ИНМИ РАН был запатентован способ получения γ -линоленовой кислоты из мицелия *Mucor lusitanicus* ИНМИ (Патент РФ № 751212, 1992). Согласно этому патенту гриб-продуцент образовывал до 40% γ -линоленовой кислоты от общего содержания жирных кислот, что позволило считать этот организм весьма перспективным для дальнейшего использования в биотехнологии с целью получения медицинских препаратов. γ -Линоленовая кислота содержится в разных липидных фракциях, основными из которых являются триацилглицериды и фосфолипиды. Для получения липидов гриб выращивали в погруженной культуре. Продуктивность штамма зависела от состава питательной среды и физико-химических условий выращивания.

Мукоровые грибы обладают высокой биохимической активностью и способны использовать для роста широкий спектр субстратов. Как показано, наилучшими для роста гриба *M. lusitanicus* и биосинтеза γ -линоленовой кислоты являются глюкоза и мочевины в качестве источников углерода и азота. При этом условия, обеспечивающие высокий выход липидов в биомассе гриба не совпадали с условиями, оптимальными для биосинтеза γ -линоленовой кислоты. В частности, большое значение имело соотношение источников углерода и азота в питательной среде, режим азотного питания (выращивание с подпиткой источником азота) и температура культивирования.

В процессе биотехнологических разработок одним из решающих факторов, определяющих течение ферментационного процесса, оказался диморфизм продуцента. При высокой концентрации глюкозы культура гриба растет в виде дрожжеподобных клеток. Дрожжеподобные клетки имели более низкий уровень γ -линоленовой кислоты по сравнению с мицелием. Однако дрожжеподобный рост позволил осуществить непрерывное культивирование гриба с использованием пита-

тельной среды, в которую в качестве источника углерода добавляли не менее 150 г/л глюкозы. Полученная биомасса содержала 35% липидов от веса сухой биомассы. Количество γ -линоленовой кислоты в сумме жирных кислот составляло 9 – 11%, а содержание триацилглицеринов – основной ацилсодержащей фракции в общих липидах – достигало 70%. Липиды по составу сходны с маслом примулы вечерней, используемой в медицинской практике и в качестве БАД.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ASPERGILLUS PARVULUS ДЛЯ БИОСИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО МЕТАБОЛИТА

Цыганенко Е.С.

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного
НАН Украины
Киев, Украина

На сегодняшний день биосинтетические свойства некоторых микромицетов рода *Aspergillus* изучены достаточно глубоко и на их основе разработаны биотехнологии получения большого количества практически важных биологически активных веществ, в том числе антибиотиков, ферментов, токсинов, органических кислот и др. Но, в тоже время, большое количество выделенных и описанных видов этого рода остается неизученным в плане физиологии. К этой группе принадлежит вид *Aspergillus parvulus*, выделенный из почв северной части Украины.

Изучая физиологические свойства разных штаммов этого вида, выделенных из радиоактивных почв и зоны отчуждения ЧАЭС, нами было установлено наличие в их культуральных фильтратах метаболита с биологической активностью.

При более детальном изучении антибиотической и фитотоксической активностей культуральных фильтратов разных штаммов *A. parvulus* по отношению к большому набору тест-организмов мы выделили группу штаммов, которые проявляли антибиотическую активность по отношению к грамположительным (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*), грамотрицательным (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) и фитопатогенным бактериям (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia aroideae*), а также фитотоксическую активность по отношению к зеленым водорослям (*Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*).

С целью углубления знаний о физиологии *A. parvulus* нами была проведена серия опытов, направленных на достижение условий, при которых выход биологически активного метаболита стремился бы к

максимальному значению. Микромицет культивировали поверхностно в колбах Эрленмейера объемом 0,5 л, которые содержали 100 мл жидкой среды Чапека. Посев осуществляли суспензией конидий 10-ти суточной культуры из пробирок со скошенным сусло-агаром. На 14 сутки культивирования получали культуральный фильтрат.

В результате анализа литературных данных, в качестве факторов, значимых для биосинтеза биологически активных веществ были выбраны следующие: физические факторы (температура, свет, перемешивание), химические факторы (рН, микроэлементы), влияние источников углеродного и азотного питания.

При исследовании влияния температуры *A. parvulus* культивировали при 20, 26, 30 и 37°C. Наибольшая биологическая активность культурального фильтрата наблюдалась при температуре 26°C, которая еще является и оптимальной для культивирования большинства видов микромицетов.

Культивирование *A. parvulus* в присутствии света в течение 14 суток показало значительное снижение биологической активности, что свидетельствует об отрицательном влиянии света на биосинтез исследуемого метаболита.

Для изучения влияния перемешивания использовали глубинное культивирование. *A. parvulus* культивировали на качалке при частоте вращения 220 об./мин. Следует отметить, что как в случае глубинного культивирования, так и в случае поверхностного культивирования количество синтезируемого биологически активного вещества было одинаковым, но при поверхностном культивировании максимум синтеза наблюдался на 8 сутки роста, а при глубинном – на 5 сутки.

При исследовании влияния на биосинтез показателя рН исходной питательной среды было показано, что наиболее оптимальными являются его значения в интервале 4,8 – 5,2. Увеличение или уменьшение данного значения приводило к снижению синтеза активного вещества.

Добавление в состав среды различных микроэлементов также не приводило к повышению синтеза исследуемого метаболита. В среду добавляли соли цинка, марганца и бора, в комбинациях по два и три вместе. Микроэлементы были выбраны по результатам предыдущих исследований лаборатории.

При изучении влияния источников углеродного и азотного питания в составе исходной питательной среды заменяли соответствующие источники другими в эквивалентных количествах. Как источники углерода использовали моносахариды (глюкозу, рамнозу, маннит), дисахариды (сахарозу, лактозу) и трисахарид (рафинозу); а как источники азота – нитрат натрия, нитрат аммония, мочевины, пептон. В результате исследования было показано, что наибольший выход биологически активного метаболита наблюдался в случае использования в качестве источников углеродного и азотного питания глюкозы и пептона, соот-

ветственно. Также высокий синтез был отмечен при использовании как источника азота нитрата натрия, который имеет некоторые преимущества по сравнению с пептоном, в том числе определенный состав и более низкую стоимость.

Таким образом, по результатам данного исследования можно сделать вывод, что наиболее оптимальными условиями культивирования *A. parvulus* для синтеза биологически активного метаболита являются следующие: глубинное культивирование в течение 5 суток в темноте при температуре 26°C на жидкой питательной среде с pH 5, где как источник углерода используется глюкоза, источник азота – нитрат натрия и не нуждается во введении дополнительных микроэлементов.

CRINIPPELLIS SCHEVCZENKOVI (BUCHALO) – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ОБЪЕКТ BIOTEХНОЛОГИИ

Щерба В.В., Бабицкая В.Г.,
Филимонова Т.В., Осадчая О.В.

Институт микробиологии НАН Беларуси
Минск, Беларусь

Биологическую активность большинства грибов наряду с другими соединениями определяют углеводы, в т.ч. гликаны, гетерополисахариды, полиаминосакхариды, общее содержание которых в клетке достигает 60% и более. Среди высокомолекулярных углеводов грибов особое внимание привлекают экстрагируемые водой полисахариды, которые, наряду с простыми углеводами цитозоля, широко используются при создании лечебно-профилактических и лекарственных средств широкого спектра действия. Более детальному исследованию в последнее время подвергаются полисахариды грибов *Ganoderma lucidum* и *Lentinus edodes*. Данные же по изучению гриба *Crinipellis schevczenkovi* в литературе единичны. Вместе с тем этот гриб представляет большой интерес, поскольку при глубинном выращивании накапливает значительное количество биомассы, в которой содержится 23-25% полноценного по содержанию важнейших аминокислот белка, 5-6% липидов, в которых доля ненасыщенных жирных кислот составляет 60-64%, 55-57% углеводов, фенольные соединения и полисахариды.

В задачу исследования входило: оптимизация условий культивирования гриба *C. schevczenkovi*, обеспечивающих максимальный выход полисахаридов, и изучение их состава.

Из 13 исследованных источников (глюкоза, арабиноза, ксилоза, галактоза, манноза, фруктоза, лактоза, мальтоза, сахароза, маннит, сорбит, крахмал, целлюлоза) лучшими для роста гриба и образования полисахаридов оказались глюкоза и крахмал. Содержание эндо- и эк-

зополисахаридов (при выращивании гриба на среде с глюкозой) составило 5,4% и 3,2 г/л. Выход полисахаридов увеличивался с повышением содержания в среде источника углерода. Максимальные значения получены при выращивании гриба в среде с 30 г/л глюкозы или крахмала. Увеличение концентрации источника углерода с 30 до 50 г/л не способствовало повышению уровня экзо- и эндополисахаридов, существенно не повышался и урожай биомассы. Из исследованных источников азотного питания, которые вносились на фоне 0,2% кукурузного экстракта, оптимальным для образования полисахаридов оказался пептон. Лучшее соотношение C:N – 18 для эндо- и 25 для экзополисахаридов. Оптимизация питательной среды позволила повысить синтез грибом эндополисахаридов на 22,7%, экзополисахаридов – на 43,7%.

Оптимальной для роста *C. schevczenkovi* и образования полисахаридов оказалась температура 30°C. Гриб рос в широком диапазоне начальных значений pH среды, от 3,0 до 7,5 и выше, однако наибольший выход биомассы отмечен при исходном pH 6,0 и 6,5. Эти же значения pH оказались наиболее благоприятными и для образования полисахаридов.

Влияние интенсивности аэрации на рост грибов в глубинной культуре определяли, варьируя уровень массообмена за счёт изменения (от 30 до 250 мл/750 мл) объёма питательной среды. Максимальная биомасса накапливалась грибом при аэрации 0,550-0,325 г O₂/л/ч. Наибольшее количество эндо- и экзополисахаридов содержалось в биомассе и культуральной жидкости при более низкой аэрации 0,325-0,155 г O₂/л/ч. Практически при этих же значениях аэрации отмечена наибольшая продуктивность гриба по экзо- и эндополисахаридам.

С целью количественной оценки эффективности процесса биосинтеза полисахаридов гриб выращивали на оптимизированной питательной среде (г/л: глюкоза – 30,0; KН₂PO₄ – 1,0; K₂HPO₄ – 1,0; MgSO₄ – 0,25; пептон – 3,5; КЭ – 2,0; pH 6,0), в ферментерах при аэрации 0,5 л/л среды/мин, непрерывном перемешивании при скорости вращения мешалки 100 об/мин. Следует отметить, что при культивировании в ферментерах количество экзополисахаридов возросло до 7-8 г/л.

Изучение образования полисахаридов в динамике роста гриба показало, что накопление биомассы и экзополисахаридов происходит параллельно. Биомасса достигает максимума к 120-150 ч, экзополисахариды – к 120-160 ч, т.е. в стационарной фазе роста гриба. Что же касается эндополисахаридов, то наибольшее их количество в биомассе *C. schevczenkovi* отмечено в экспоненциальной фазе (60-96 ч). С 60-72 ч роста гриба наблюдается интенсивное потребление источника углерода и незначительное закисление питательной среды. К концу ферментации биомасса снижается, pH среды остаётся на одном уровне. Остаточное содержание глюкозы составляет 0,7-0,9%. Скорость потребления источника углерода грибом достигает максимальных величин к 60-72 ч, затем становится практически постоянной. Экономический коэффициент

ент использования источника углерода при синтезе экзополисахаридов составил 26,3%, эндополисахаридов – 7,0%. Анализируя процесс роста гриба, следует отметить, что средняя скорость его роста составила около 2,2 г/л/сут, выход биомассы – 0,68 г/г источника углерода, выход экзополисахаридов к концу ферментации – 7,5 г/л, эндополисахаридов – 1,1 г/л либо 7,1 мг/100 мг сухой биомассы. Продуктивность культуры по эндополисахаридам – 169,2, экзополисахаридам – 1153,8 мг/л/сут.

Фракционирование экзополисахаридов позволило получить водорастворимую (7,4%), щелочерастворимую (48,2%) фракции и нерастворимый остаток (44,4%). Кинематическая вязкость 0,1% раствора полисахарида водорастворимой фракции, молекулярная масса которого меньше 10 кДа, составила 1,15 мм²/с, а полисахарида щелочерастворимой фракции с молекулярной массой 200-300 кДа – 3,15 мм²/с.

Внутриклеточный полисахарид полностью растворялся в воде, кинематическая вязкость 0,1% водного раствора его была близка к вязкости воды (0,89 мм²/с) и составляла 1,03 мм²/с.

Гельхроматография эндополисахарида, элюируемого водой, позволила установить его гомогенность (молекулярная масса – 500 кДа.), а элюируемого 1M NaCl – гетерогенность (M_r > 10 кДа и 500 кДа) с преобладанием полисахарида с молекулярной массой меньше 10 кДа.

Углеводный состав водорастворимой фракции экзополисахарида и фракции эндополисахарида, элюируемого солью, представлен галактозой и глюкозой, тогда как щелочерастворимая фракция экзополисахарида и фракция эндополисахарида, элюируемого водой состоят на 100% из глюкозы.

Использование ИК-спектроскопии и периодатного окисления в сочетании с боргидридным восстановлением (распад по Смитсу) позволило установить, что полисахариды всех фракций являются разветвленными структурами содержащими α и β гликозидные связи. Основная цепь полимеров образована (1-3), а боковые цепи гликанов *C. shevzenkovi* – С1-С4 связями. С1-С6 связи присутствуют в боковых цепях водной фракции экзополисахарида.

Проведенные исследования показали, что ксилотрофный базидиомицет *C. shevzenkovi* представляет большой интерес не только как продуцент полноценной биомассы, но и как продуцент полисахаридов.

Глава 7.

МЕДИЦИНСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ГРИБОВ. ФУНГОТЕРАПИЯ

PHALLUS IMPUDICUS L.: PERS. – ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ

Бабаянц О.В.¹, Бушулян М.А.¹,
Залогина М.А.²

¹ Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения УААН

² Биотехнологический центр в растениеводстве УААН и МОН Одесса

В последние годы в исследованиях микологов, биотехнологов, медиков всё большее внимание уделяется высшим базидиомицетам как потенциальным продуцентам биологически активных веществ. Помимо хорошо известных лидеров мировой фунготерапии (шии-таке, лингчи, маитаке, энюки, кордицепса) проводится постоянный поиск таких видов базидиомицетов, которые, обладая тромболитической, антимикробной, антиоксидантной и противоопухолевой активностью могли бы культивироваться *in vitro* и в условиях искусственно создаваемого климата. Как показали наши исследования, микобиота юга Украины хоть и не отличается особым разнообразием видов, но, тем не менее, в ней обнаруживаются весьма перспективные макромицеты, ранее не рассматривавшиеся в качестве возможных объектов биотехнологии для получения лекарственных препаратов.

Среди наших находок наибольший интерес представляет гастеромицет – Веселка обыкновенная (*Phallus impudicus*). Народное название веселки – «чертово яйцо», «дьяволы глаз», срамотник бесстыдный, «громовая стрела» – досталось этому грибу, благодаря его способности за 10 – 15 минут с колоссальной скоростью (5 мм в мин.) из стадии яйца преобразиться в сформированное плодовое тело, напоминающее фаллос. Народная медицина славян издревле использовала веселку как антиревматическое и антиподагрическое средство. Так называемое «земляное масло» знахари рекомендовали при половом бессилии, лечили «черную болезнь», снижали повышенное кровяное давление. Известно, что в деревнях Белоруссии, где люди использовали в пищу сырые плодовые тела веселки в стадии яйца (мелко рубили, поливали сметаной и съедали) не было людей, болеющих раком. Кроме того, веселка – прекрасное противопаразитарное средство, о чем также знали народные целители. В научных публикациях сведений о целебных свойствах веселки и её применении в классической медицине практически нет. Этот факт в некотором роде объясним: *Phallus impudicus* – гриб очень редко встречающийся, охота на него – загадка даже для бывалых грибников. Никогда гриб не появляется дважды в одном и том же месте и никто не может предугадать его появления. В последние

годы появились сообщения о применении веселки при лечении заболеваний кожи различной этиологии. Отмечены ее иммуномодулирующие, онкостатические и антибиотические свойства (Филиппова, 2004). Известно, что полисахариды веселки вызывают в организме выработку перфорина, который уничтожает раковые клетки.

По данным научных публикаций (Бухало, 1988) известно, что *Ph. impudicus* достаточно легко выделяется в чистую культуру, особенно на стадии яйца, когда плодовое тело окружено слоем слизи и заключено в кожистый перидий. Мы исследовали скорость роста вегетативного мицелия веселки на агаризованных средах разных составов. Был отобран наиболее приемлемый для данного вида состав. Чистые культуры получали как из стерильных кусочков глебы так и из спор половозрелого плодового тела. Более активным ростом обладали культуры глебы: ростовой коэффициент при температуре инкубации 28°С был высоким. В колониях были хорошо выражены мицелиальные тяжи. На 7 – 8 суток инкубации в чашках Петри мицелий полностью оккупировал всю площадь и приобретал светло-лиловую окраску, что, по нашим наблюдениям, является видовым признаком этого гриба. Обнаруживались пряжки, анастомозы и другие структуры. Споры прорастали медленно. Удалось получить моноспорные изоляты, из которых отобрали наиболее быстрорастущие. Инокулят из лучших линий от моноспорных культур и наиболее активных вегетативных культур веселки высаживали в колбы Эрленмейера на жидкие среды специально подобранных составов. Инкубировали на качалках АБУ-6 при 180 об/мин от 7 до 21 суток при t=25°С. Необходимо отметить, что инокулят из вегетативных участков гриба был значительно активнее и быстрее осваивал среду, накапливая за 14 суток максимальное количество биомассы. Споровая культура, хотя и накапливала количество биомассы в два раза меньше, обладала ярко выраженными антибиотическими и противогрибковыми свойствами уже на 7 сутки инкубации, активно подавляя культуры *Candida albicans*, *Trichoderma harzianum*, *Fusarium sambucinum*, а также бактериальные клетки. Антибиотические вещества накапливались в большей степени в культуральной жидкости, а противогрибковые – в мицелиальной массе. Нами были предприняты попытки вырастить плодовые тела в искусственно создаваемых условиях микроклимата, что открыло бы отличные перспективы для создания экологически безопасных лекарственных препаратов. Предварительные результаты дают абсолютно точный ответ: это возможно. На жидкой питательной среде при определенных режимах инкубации нам удалось на 21 сутки получить полноценное плодовое тело в стадии яйца. Плодовые тела на субстратах в наших экспериментах получали за 36–40 суток культивирования. Не углубляясь в тонкости технологии выращивания необходимо отметить, что в условиях создаваемого микроклимата слизистый слой был достаточно обильным, и, если у гриба, выросшего в природе слизь (земляное

масло) в соотношении к общей массе плодового тела составляет 10-15%, то у «культурного» изолята оно меняется в сторону 25–30%.

Мы исследовали практически все найденные нами природные изоляты Веселки обыкновенной, из каждого получили чистые культуры, отобрали наиболее активные продуценты биомассы в искусственной культуре. Из природного материала веселки произвели ферментацию плодовых тел, затем приготовили водочные и водные настойки и испытывали их на волонтерах, применяя в лечении и профилактике различных заболеваний. Наиболее ценный компонент веселки «земляное масло» мы с успехом применяем как ранозаживляющее средство. Любые раны – свежие, инфицированные обрабатываем слизистой частью веселки и от ран не остается и следа. За 21 день удалось полностью остановить развитие трофической язвы, вызванной рожистым воспалением, а к концу первого месяца применения препарата рана полностью зарубцевалась. Наружное применение веселки мы подкрепляли также и пероральным – в виде водочной настойки плодовых тел. Водочную настойку веселки применяем как профилактическое средство перед эпидемиями гриппа и других вирусных инфекций, при простудных заболеваниях – эффективность практически 100%. Так как *Ph. impudicus* обладает антибиотическими свойствами, применяем её в комплексном лечении язвы желудка и при различных нарушениях в работе желудочно-кишечного тракта – результаты исключительно положительные. Обнадёживающие результаты получены при применении экстрактов веселки в комплексной терапии рассеянного склероза. Удалось добиться устойчивой длительной ремиссии заболевания, кроме того значительно улучшилось общее состояние пациента: нормализовался сон, наладилась работа кишечника, стабилизировалось кровяное давление, уменьшились спастические явления. Опыт, накопленный нами в применении препаратов на основе веселки – достаточно богат. Этот необыкновенный гриб по праву может стать родоначальником и королем отечественной фунготерапии. К тому же преимущество применения веселки перед грибами восточной медицины – приуроченность к нашим экологическим условиям, возможность постоянного пополнения коллекции новыми природными изолятами для внедрения в искусственную культуру лучших из них по спектру биологически активных веществ.

Таким образом, все вышеизложенное позволяет считать перспективными и весьма своевременными исследования в области технологий культивирования *Ph. impudicus* в условиях контролируемого микроклимата для использования гриба в качестве лечебного продукта.

«РЕЙШИДИН» – НОВАЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА К ПИЩЕ

Бабицкая В.Г.¹, Лобанок А.Г.¹, Пленина Л.В.²,
Хлюстов С.В.², Лопатенко Ю.С.², Щерба В.В.¹,
Романовская Т.Р.², Игнатенко С.В.²

¹ Институт микробиологии НАН Беларуси

² Республиканское научно-производственное унитарное предприятие
диагностических и лекарственных препаратов «Диалек»
Минск, Беларусь

БАД «Рейшидин» содержит глубинный мицелий гриба рейши (*Ganoderma lucidum*) в сочетании с аскорбиновой кислотой и микрокристаллической целлюлозой. В состав БАД входят полисахариды, белки, аминокислоты, ненасыщенные жирные кислоты, пищевые волокна, витамины, в том числе эргостерин, макро- и микроэлементы, фенольные соединения. Содержание липидов составляет 9-10 % (в зависимости от состава среды культивирования гриба), доля линолевой кислоты – 60-80%. Сумма насыщенных жирных кислот – 16,0-36,0%, ненасыщенных – 64,0-84,0%. Фосфолипиды в мицелии гриба составляют 0,5-0,8%. Внутриклеточные полисахариды представлены пептидогликанами с содержанием белка – 1,4%, их молекулярная масса – 500 кДа. Мицелий и БАД обладают высокой сорбционной активностью, способны связывать и выводить из организма радионуклиды, тяжёлые металлы, экзо- и эндотоксины. Хранение мицелия (субстанции БАД) и БАД в течение 12 месяцев при температуре +5⁰ С не влияло на изменение всех показателей. Не изменилась и антиоксидантная активность, составляющая 88-92% по отношению к ионулу.

Субстанция и сама БАД характеризуются низкой токсичностью, не обладают кожно-раздражающим и раздражающим действием. Изучение грибного мицелия и БАД в хроническом эксперименте при ежедневном пероральном введении их подопытным животным в течение 30 сут в дозе 100 мг/кг в пересчете на СВ не выявило каких-либо существенных функциональных и структурных нарушений со стороны жизненно важных систем организма. Анализ результатов, полученных при токсикологическом исследовании, позволяет сделать заключение о том, что глубинный мицелий гриба и БАД на его основе в изученных концентрациях безвредны для организма подопытных животных.

Оценка иммуотропной активности глубинного мицелия и БАД «Рейшидин» in vivo на модели клеточного, гуморального иммунного ответа и в отношении факторов видового иммунитета показало следующее (таблица 1): субстанция и БАД модифицирует функциональную активность перитонеальных макрофагов: в использованной дозе субстанция вызывает некоторое снижение ФП и ФЧ, а БАД, напротив, усиливает поглотительную способность макрофагов в отношении *Staphilococcus aureus*. Эта тенденция распространяется и на метаболическую актив-

ность перитонеальных макрофагов в НСТ-тесте: субстанция оказывает ингибирующий эффект, проявляющийся достоверным снижением % НСТ⁺-клеток и СЦК. При использовании БАД зарегистрировано стимулирующее влияние в виде увеличения % НСТ⁺-клеток и тенденции к увеличению СЦК. Как субстанция, так и БАД способствуют увеличению активности классического пути активации системы комплемента.

Причиной различий влияния субстанции и БАД на показатели функциональной активности перитонеальных макрофагов мышей могут иметь дозовый характер, т.е. быть связаны с различной концентрацией основных иммуотропных компонентов, а также с наличием в пищевой добавке аскорбиновой кислоты. Увеличение активности системы комплемента отражает снижение реакции потребления компонентов в реальных условиях. Этот компонент иммуотропной активности *G. lucidum* может быть использован для достижения противовоспалительного действия при избыточности функционирования факторов видового иммунитета и неспецифической резистентности.

Таблица 1
Влияние *Ganoderma lucidum* на показатели неспецифической резистентности (среднее ± ст. отклонение)

№ п/п	Показатели	Контроль	Субстанция	БАД
1	Число лейкоцитов периферической крови, × 10 ⁹ /л	6,9 ± 0,95	6,75 ± 0,99	6,55 ± 2,25
2	Полинуклеарные клетки периферической крови, %	48,3 ± 1,2	44,3 ± 4,5	46,6 ± 3,8
3	Мононуклеарные клетки периферической крови, %	51,7 ± 0,95	55,7 ± 6,1	53,4 ± 2,1
4	Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов – фагоцитарный показатель (ФП), %	43,25 ± 8,9	39,3 ± 9,5	48,3 ± 5,7
5	Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов – фагоцитарное число (ФЧ), %	3,8 ± 0,2	3,0 ± 0,8	3,4 ± 1,1
6	Метаболическая активность перитонеальных макрофагов – НСТ ⁺ -клетки, %	15,75 ± 2,8	7,7 ± 3,8*	17,0 ± 2,0*
7	Метаболическая активность перитонеальных макрофагов – средний цитохимический коэффициент – СЦК	0,17 ± 0,03	0,08 ± 0,04*	0,2 ± 0,04
8	Активность классического пути системы комплемента сыворотки крови, СН50 (усл.ед.)	25,6 ± 2,4	42,8 ± 1,9*	44,7 ± 3,1*
9	Активность альтернативного пути системы комплемента сыворотки крови, АР 50 (усл.ед.)	8,4 ± 1,2	7,95 ± 3,1	8,25 ± 3,5

* – достоверность различий с контрольной группой, p < 0,001

В отношении показателей специфического гуморального иммунитета, индуцированного эритроцитами барана по стандартным схемам, существенных различий между опытной и контрольной группами животных не обнаружено (таблица 2). Большинство эффектов регистрируются на уровне тенденции. Так, *G. lucidum* способствует некоторому усилению выраженности гуморального иммунного ответа на эритроциты барана, что проявлялось увеличением селезеночного индекса. В отношении числа АОК селезенки активность проявляет только БАД, тогда как субстанция *G. lucidum* способствует определенному снижению числа АОК.

Таблица 2
Влияние *G. lucidum* на показатели специфического иммунитета (среднее ± ст. отклонение)

№ п/п	Показатели	Контроль	Субстанция	БАД
1	Масса селезенки, г	0,22 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,038
2	Селезеночный индекс	0,95 ± 0,03	1,1 ± 0,05	1,0 ± 0,12
3	Число антителообразующих клеток (АОК) селезенки (в 1млн. спленоцитов)	0,74 ± 0,18	0,62 ± 0,13	1,16 ± 0,17
4	Титр гемагглютининов IgM, log ₂	2,7 ± 0,6	3,0 ± 1,0	2,7 ± 1,2
5	Титр гемагглютининов IgG, log ₂	3,3 ± 0,6	3,3 ± 1,15	2,7 ± 0,6
6	Выраженность реакции ГЗТ (гиперчувствительности замедленного типа) – индекс ГЗТ, %	4,0 ± 0,87	9,9 ± 2,4*	15,9 ± 2,7*

*- достоверность различий с контрольной группой, p < 0,01

Таким образом, мицелий и БАД не обладают иммуотоксическим действием при использовании в дозе 50 мг/кг. Основной иммуотропный эффект сосредоточен на усилении клеточного иммунного ответа, что проявляется достоверным в сравнении с контрольной группой животных увеличением индекса ГЗТ. Мицелий и БАД способствуют и увеличению функциональной активности классического пути активации системы комплемента, что указывает на возможность применения их в целях ограничения выраженности воспалительного синдрома, а также для усиления реакции клеточного иммунитета.

ВЫСШИЕ БАЗИДИАЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ГРИБЫ – ОСНОВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК СЕРИИ “МИКОСВИТ”

*Бисько Н.А.¹, Москаленко Л.Г.²,
Шевчук Е.Ю.³, Митропольская Н.Ю.¹*

¹ *Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины*

² *Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца*

³ *ООО “СБ “МУР”*

Киев, Украина

Биологически активные добавки серии “Микосвит” на основе лекарственных грибов (*Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Grigola frondosa*, *Trametes versicolor*, *Inonotus obliquus*, *Schizophyllum commune*, *Fomes fomentarius*, *Hericium erinaceus* и др.) представляют собой натуральные, сбалансированные природой, комплексы биологически активных добавок, необходимые организму человека. Они содержат незаменимые аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты, в том числе арахидоновую, минеральные элементы, в том числе, дефицитные для питания человека железо, кобальт, селен, сериновые фосфолипиды, антиоксиданты, кофермент Q10; ферменты протеазы, липазы, фосфолипазу; полисахариды (маннаны, бета-глюканы); ингибитор фермента редуктазы биосинтеза холестерина, а также ингибиторы всех стадий биосинтеза предшественников холестерина; витамины группы В, а также F, D₃, Н, Е, С.

Нами экспериментально и клинически подтверждено следующее терапевтическое воздействие БАДов серии “Микосвит”:

- восстанавливает структуру и функции, поврежденных травмирующими факторами, рецепторов биологических мембран клеток за счет инозитальных фосфолипидов;

- ингибирует образование эндогенного холестерина, что способствует снижению гиперхолестеринемии;

- активизирует образование ц-АМФ в мозге, сердце, печени, желудке и крови, что способствует улучшению микроциркуляции крови и уменьшению зон тканевой атрофии;

- нормализует работу печени и уровень ферментов печени трансаминаз при гепатитах В и С;

- активизирует образование эндогенных интерферонов и интерлейкинов, обеспечивая активацию В и Т-лимфоцитов и нормализует уровень сывороточных иммуноглобулинов;

- увеличивает синтез альбумина в крови.

БАДы серии “Микосвит” рекомендуются для комплексного оздоровления за счет стимулирования восстановления иммунной системы; нормализации работы сердечно-сосудистой системы; снижения содержания холестерина в крови; улучшения состояния кровеносных сосу-

дов; усиления активности головного мозга, активизации творческого потенциала.

Как показали обширные лабораторные и клинические испытания, различный компонентный состав БАДов “Микосвит” определяет широкий спектр ценных для медицины свойств и возможность его применения во многих областях:

- для повышения неспецифической резистентности организма к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды;
- для профилактики нарушения обменных процессов и возникновения связанных с этим хронических заболеваний;
- для направленного изменения метаболизма, связывания и ускорения выведения из организма токсических и чужеродных веществ;
- для осуществления в физиологических границах регуляции функций организма.

БАД «МИПРО-ВИТ» В ЛЕЧЕНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

*Богданова Т.А., Кубышева Н.И., Ермолаева Е.В.²,
Лаврентьева Е.Б.¹, Скворцова М.М.³*

*Федеральный детский научно-практический центр
противорадиационной защиты при Московском НИИ педиатрии и
детской хирургии*

*Детская городская больница № 27, Нижний Новгород
ЗАО «Микротэп»
Москва*

Бронхиальная астма является тяжелым хроническим заболеванием дыхательных путей. Распространенность бронхиальной астмы (БА) у детей достигает 30% в различных популяциях. Наряду с ростом числа больных, страдающих астмой, отмечается устойчивая тенденция к увеличению количества больных, резистентных к традиционной терапии, регламентируемой отечественными и международными программами. Кроме того, в настоящее время для БА является актуальным наличие сопутствующей патологии, что требует внесения корректив в терапию этого заболевания.

При углубленном обследовании таких больных выявляется рост патологии ЖКТ (дисбактериозы, гастродуодениты), присоединение патологии ЛОР-органов (тонзиллиты, синуситы, отиты), формирование БА смешанного генеза (гнойные эндобронхиты). Все эти патологические состояния могут быть как причиной, так и следствием иммунологической несостоятельности, что формирует порочный круг заболевания.

Современная концепция определяет патогенез БА как специфический воспалительный процесс в бронхиальной стенке, приводящий к обструкции и усилению гиперреактивности бронхов. Воспаление дыхательных путей является чрезвычайно сложным регуляторным процессом, в котором участвует большое разнообразие клеток иммунной системы и секретируемых ими медиаторов.

Основные этапы лечения БА основываются на применении так называемой «базисной» терапии, соответствующей степени тяжести БА (кромоны, ингаляционные или системные глюкокортикостероиды) и «симптоматической» терапии, направленной на снятие бронхообструктивного синдрома.

Известно, что для БА характерно изменение функционального состояния иммунной системы, а при воздействии радиации именно иммунная система одной из первых вовлекается в патологический процесс. Поэтому чрезвычайно важное значение имеет введение в комплекс терапевтической программы этого заболевания иммуномодулирующих препаратов.

В Нижегородской детской городской больнице № 27 и в Федеральном детском научно-практическом центре противорадиационной защиты при Московском НИИ педиатрии и детской хирургии в комплексном лечении детей с бронхиальной астмой в качестве иммуномодулирующего средства был использован «Мипро-ВИТ» – БАД на основе биомассы лекарственного гриба *Fusarium sambucinum*.

В каждом лечебном учреждении были сформированы основные группы по 30 больных, а также контрольные группы, получавшие традиционное лечение.

«Мипро-ВИТа» назначался детям 3-14 лет- 0,25 x 3 раза в день, детям 14-16 лет- 0,5 x 3 раза в день. Длительность курса – 20 дней.

По данным ФДНПЦ радиационной защиты на фоне приема «Мипро-ВИТа» у детей постепенно исчезали признаки аллергического воспаления в бронхолегочной системе, что сопровождалось положительной динамикой клинических симптомов. Раньше других клинических симптомов, как в фазе обострения, так и в фазе ремиссии, уменьшались или исчезали слабость, потливость и сухой кашель. К концу лечения в фазе обострения уменьшался кашель со слизистой мокротой, физикальные изменения в легких (сухие и влажные хрипы), а в период ремиссии кашель полностью исчезал.

Следует отметить, что у детей с бронхиальной астмой, получавших «Мипро-ВИТ», терапия была более эффективной, чем в контрольной группе.

Наиболее выраженная и быстро наступившая положительная динамика клинических симптомов наблюдалась у тех больных, которым «Мипро-ВИТ» назначался в фазе ремиссии аллергического процесса.

Под влиянием «Мипро-ВИТа» у детей отмечалась тенденция к нормализации показателей клеточного иммунитета.

Таблица 1
Динамика иммунологических показателей у детей больных бронхиальной астмой

	Основная группа n=8		Группа сравнения n=10	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Т-лимфоциты %	48,6±2	55,1±0,5*	52,0±1	56,3±0,6
В-лимфоциты%	16,7±0,3	14,4±1,0*	15,2±1,6	12,4±0,7*
IgA г/л	0,8±0,02	1,3±0,3*	0,8±0,1	1,1±0,2
IgM г/л	0,8±0,06	0,8±0,03	0,9±0,1	0,9±0,03
IgG г/л	13,4±0,08	12,5±0,52	11,2±0,2	12,3±1,1
IgE МЕ/мл	400±46	176±14*	231±25	200±31
ЦИК ед.оп.пл	0,165±0,1	0,136±0,02*	0,120±0,5	0,110±0,2

*p<0,05

У детей основной группы, в отличие от контрольной, выявлено достоверное повышение IgA. Обращает на себя внимание значительное снижение уровня общего IgE у детей с бронхиальной астмой, получавших «Мипро-ВИТ» (табл.1).

Из объективных признаков эффективности применения «Мипро-ВИТа» у детей с бронхиальной астмой следует также отметить положительную динамику показателей функции внешнего дыхания. На фоне лечения отмечено увеличение скорости экспираторного потока по бронхам среднего и крупного калибра.

Таким образом, нормализация иммунологических сдвигов способствует ликвидации аллергического воспаления в дыхательных путях, что клинически выражается не только в уменьшении или исчезновении симптомов заболевания, но и в восстановлении бронхиальной проходимости.

У детей больных БА, проходивших лечение в Нижегородской детской городской больнице № 27, в результате лечения был получен хороший клинический результат: ни у одного ребенка при применении Мипро-ВИТа не было отмечено каких-либо побочных действий, аллергические реакции также выявлены не были. При этом снизилось количество вирусных инфекций, которые являются основными триггерами обострения БА, значительно снизилось количество приступов БА. Получена положительная динамика со стороны ЖКТ, а именно: уменьшилась изжога, отрыжка, чувство тяжести в желудке, нормализовался стул. Все дети отмечали улучшение настроения, снижение раздражительности, возбудимости, повышение жизненного тонуса.

У детей с сочетанной патологией БА и неврологическими нарушениями (вегетососудистая дистония, неврозоподобные состояния) отмечены урежения приступов БА, снижение потребности в медикаментозной нагрузке, нормализация сна, уменьшение нервной возбудимости. Все это отразилось на течении БА и позволило добиться длительной

ремиссии. У детей с кашлевым вариантом БА устранялось так называемое «подкашливание» и купировался кашель.

Динамическое наблюдение иммунологических параметров у больных детей, принимавших в комплексной терапии Мипро-ВИТ, показало существенные изменения отдельных показателей иммунного статуса.

Таблица 2
Содержание иммуноглобулинов А, М, G (г/л) у больных бронхиальной астмой до и после применения Мипро-ВИТа

	До лечения	После лечения	Норма
IgA	0,61 ± 0,17	1,09 ± 0,24	1,35 ± 0,08
IgM	0,82 ± 0,08	0,96 ± 0,08	1,16 ± 0,07
IgG	5,2 ± 1,8	7,4 ± 2,03	10,94 ± 0,51

Как видно из табл.2, средний уровень иммуноглобулинов до применения Мипро-ВИТа находился ниже нормальных значений, через 1 месяц после приема препарата наблюдалась тенденция к увеличению всех исследуемых классов иммуноглобулинов, а показателей IgA и IgM практически до нормальных значений. Особого внимания заслуживает достоверное повышение (примерно на 78%) практически у всех больных иммуноглобулина А, который играет существенную роль в защите слизистых оболочек, как ротовой полости, так и дыхательных путей.

Динамика иммунологических параметров клеточного иммунитета у больных детей, принимавших в комплексной терапии Мипро-ВИТ, представлены в таблице 3.

Таблица 3.
Количественное содержание CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD25+ (%) у больных бронхиальной астмой до и после применения Мипро-ВИТ.

	Количество больных	До лечения	После лечения	Норма
CD3+	22 чел.	31,3 ± 9,8	41,16 ± 9,6	50-70
CD4+	22 чел.	21,5 ± 4,2	37,5 ± 11,6*	30-50
CD8+	22 чел.	23,8 ± 7,3	25,1 ± 7,1	20-30
CD16	22 чел.	23,5 ± 9,4	25,5 ± 6,05	15 ± 1
CD16	11 чел.	31,1 ± 4,1	21,2 ± 3,4*	15 ± 1
CD16	7 чел.	11,5 ± 2,1	24,1 ± 3,6*	15 ± 1
CD25	22 чел.	20,2 ± 7,5	23,2 ± 3,4	15 ± 1
CD 95	22 чел.	25,6 ± 8,3	29,4 ± 10,5	20 ± 5
CD4/CD8	22 чел.	0,90 ± 0,24	1,49 ± 0,21*	1,4 ± 0,2

* – $p < 0,05$ относительно показателей до лечения

При исследовании клеточного звена иммунитета в динамике лечения с применением Мипро-ВИТа было установлено достоверное повышение лимфоцитов, несущих CD4+ – антиген (Т-хелперов). Каких-либо существенных отклонений уровня CD8+ – лимфоцитов выявлено не

было. В то же время подсчет иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8) показал, что в процессе курса терапии он достоверно повышался.

Как видно из табл. 3, до лечения этот показатель был значительно ниже нормы, что может свидетельствовать о наличии у данных больных вялотекущего хронического воспаления. Не исключено, что сниженное количество Т-хелперов до лечения обусловлено миграцией этих клеток в зону шокового органа. После проведенного курса терапии данные параметры повышаются до нормальных значений. Таким образом, можно сделать вывод, что применение Мипро-ВИТа оказывает стимулирующий эффект на уровень регуляторного звена иммунитета.

Наблюдение за динамикой содержания натуральных киллеров (CD16) выявило две группы пациентов. У 11 пациентов исходный уровень CD16 намного превышал нормальные значения, что может объясняться персистирующей вирусной инфекцией, свойственной для больных БА. За счет влияния проведенной терапии агрессивная активность инфекционных агентов в легочной ткани уменьшилась, что обусловило достоверное снижение количества натуральных киллеров до нормальных значений.

У 7 больных в результате проведенного курса терапии изначально низкое содержание CD16+ – лимфоцитов достоверно повысилось до нормальных значений. Представленные данные позволяют утверждать, что в комплексном лечении БА применение Мипро-ВИТа оказывает на содержание натуральных киллеров модулирующее влияние.

Исследование функциональной активности гранулоцитов (табл.4) показало, что практически у всех больных БА до применения Мипро-ВИТа отмечалось существенное снижение интенсивности генерации активных форм кислорода в тесте люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) по сравнению с нормой, что характеризует истощение функциональной активности клеток гранулоцитарного звена в условиях хронического персистирующего воспаления. После 2-3-недельного курса применения Мипро-ВИТа у этих детей было установлено в среднем повышение генерации активных форм кислорода практически до нормальных значений, что свидетельствует об активизации функциональной деятельности гранулоцитов.

Таблица 4.
Интенсивность хемилюминесцентного (ХЛ) ответа (отн.люм.ед.) гранулоцитов у детей, больных бронхиальной астмой, до и после применения Мипро-ВИТа

	Дети, больные БА	Норма
До лечения	0,020 3 ± 0,001	0,0520 ± 0,0065
После лечения	0,0998 ± 0,0005*	

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с нормой.

Этапное исследование уровня цитокинов у 10 больных выявило тенденцию к повышению гамма-интерферона (γ -ИФН) после лечения Мипро-ВИТом до более высоких показателей, чем у детей, которые данный препарат не получали (контрольная группа). Исходно у всех обследованных детей наблюдался низкий уровень гамма-ИНФ — $25,6 \pm 8,7$ пг/мл. После применения исследуемого препарата содержание гамма-интерферона достигало $37,4 \pm 7,6$ пг/мл.

Результаты проведенных клинических исследований позволяют сделать вывод о целесообразности и эффективности включения БАД «Мипро-ВИТ» в комплексную терапию бронхиальной астмы у детей.

ГРИБЫ – ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

*Брагинцева Л.М.
ООО «Макофарм»
Москва*

В Московской медицинской Академии им И.М. Сеченова с 1974 г. под руководством профессора Брагинцевой Л.М. разрабатывалась технология биологически активных веществ (БАВ) из различных растительных и животных тканей.

Роль полиеновых соединений велика в питании для профилактических целей. Основная проблема – в нахождении чистого сырья для выделения этих соединений, т. к. используемая до сих пор разными странами технология выделения из органов крупного рогатого скота и рыб из-за распространения вирусов, загрязнения ДДТ и др. отходами не отвечает современным требованиям.

В ходе поиска обнаружили полиеновые соединения в грибах.

Всего было изучено 92 вида и штаммов грибов классов ASCOMYCETES, BASIDIOMYCETES и DEUTEROMYCETES. Некоторые штаммы грибов нами были выделены из природы впервые. Самое большое содержание полиеновых соединений было обнаружено в белых, сморчках, строчках, дождевиках и шампиньонах, а в вешенках и опятах в 5-6 раз меньше.

Грибы являются богатыми источниками биологически активных веществ, не только полиеновых соединений, но и других классов БАВ.

На основе субстанции, получаемой из грибов ООО «МАКОФАРМ» разработал технологию БАД «ФЛОРАЛИДА ЦТ»

БАД «Флоралид ЦТ» (далее Флоралид) масляный, водно-спиртовой раствор, в таблетках и капсулах представляют собой натуральные, сбалансированные природой, комплексы БАВ необходимых организму человека:

- инозитольные, лецитиновые и сериновые фосфолипиды (ФЛ);
- каротиноиды, антиоксиданты, серусодержащие вещества, кофермент Q10;
- эссенциальные полиеновые кислоты, включая арахидоновую и омега – 3 кислоты;
- ферменты –, протеазы, коллагеназу, липазы, фосфолипазу А2, ферменты окислительного фосфорилирования и др.;
- полисахариды (маннаны, бета-глюканы);
- ингибиторы фермента (НМО-СоА)редуктазы биосинтеза холестерина, а также ингибиторы всех стадий биосинтеза предшественников холестерина;
- микроэлементы К, Mg, F, Zn и др.;
- витамины группы В(фолиевая кислота) F, Д3 и Н.

Основной механизм действия БАДа.

В соответствии с вышеприведенным составом и биологической ролью каждой из составляющих биологически активной добавки «Флоралид» – экспериментально и клинически подтверждены следующие механизмы действия:

- восстанавливает структуру и функции, поврежденных травмирующими факторами, рецепторов биологических мембран клеток за счет инозитольных ФЛ; указанные ФЛ являются вторичным мессенжерами в передаче сигнала от рецептора к эффекторной части клетки через образование в тканях человека арахидоновой кислоты, а затем простаглицлинов, лейкотриенов, простаглицлинов, ц-АМФ и др;
- ингибирует образование эндогенного холестерина, что способствует снижению гиперхолестеринемии в 1.5-2 раза после приема Флоралида в течение 1-1,5 месяца;
- активизирует образование ц-АМФ в мозге, сердце, печени, желудке и крови, что способствует улучшению микроциркуляции крови и уменьшению зон тканевой атрофии;
- нормализует биосинтетическую активность печени и, соответственно, уровень ферментов печени трансаминаз (АСТ, АЛТ, ЛДГ, ГГТ) при гипотитах СиВ;
- ингибирует рецептор глутамат ион МНДА в нейронах, и тем, предупреждает их деграцию при постинсультных состояниях, обеспечивая сохранения свойств личности человека;
- активизирует образование эндогенных интерферонов и интерлейкинов, что обеспечивает активацию В и Т – лимфоцитов и нормализует уровень сывороточных иммуноглобулинов G, уменьшает концентрацию до нормы ЦИК (циркулирующие иммунокомплексы);
- активизирует при помощи производных полисахаридов образование перитониальными макрофагами интерферона в 6 раз, интерлейкинов I и VI в 5-29 раз и фактора некроза опухоли в 10 раз, последний препятствует появлению онкологических клеток;

- ферменты обеспечивают растворение соединительной ткани, имеются данные по рассасыванию постинфарктных рубцов;
 - активирует фибринолиз за счет увеличения образования плазмينا в плазме крови и тканях почек;
 - стабилизирует мозговое кровоснабжение за счет улучшения реологии крови и за счет подключения сети капилляров, ранее не участвующих в кровообращении, улучшает синаптическую передачу и тем взаимосвязь структур мозга;
 - предупреждает и проводит обратное развитие катаракты;
 - увеличивает синтез альбумина в плазме крови;
 - активирует синтез опиоидных пептидов в организме, что важно для нормального самочувствия и работоспособности человека;
 - активирует защитное слизеобразование в желудке и кишечнике;
 - цинк активирует работу 300 ферментов в организме человека.
- Флоралид ЦТ рекомендуется для комплексного оздоровления:
- стимулирует восстановление иммун-ной системы,
 - нормализует работу сердечно сосудистой системы,
 - помогает восстановить микрофлору желудочно – кишечного тракта,
 - снижает содержание сахара и холестерина в крови,
 - улучшает состояние кровеносных сосудов, усиливает активность головного мозга, активизирует творческий потенциал человека

На основе биологически активной субстанции, полученной из грибов, разработана формула крема Таис Славная.

Применение крема « Таис славная» является трансдермальным способом введения в организм человека биологически активных веществ, содержащихся в грибной субстанции.

Крем «Таис славная» рекомендуется использовать для питания и поддержания эластичности кожи, предупреждения преждевременного старения не только кожи ихрящевых тканей но и для обезболивания при артритах, радикулитах и миозитах. По нашим данным своевременное нанесение крема Таис Славная на затылочную область головы и шею в течении 2х часов снимает симптоматику ишемического инсульта.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ ИЗ МАКРОМИЦЕТОВ

*Бухало А.С., Соломко Э.Ф., Вассер С.П., Михайлова О.Б.
Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины
Киев, Украина*

Количество видов грибов с макроскопическими плодовыми телами, достаточно крупными, чтобы их собирать руками, состоящими обычно из шляпки и ножки или только шляпки, достигает 14 тыс. видов. Бо-

лее 2 тыс. видов базидиальных и сумчатых макромицетов можно употреблять в пищу, а около 700 видов обладают лечебными свойствами. Вышесказанное позволяет считать эту гриппу грибов, тысячелетиями использовавшиеся человеком для еды и лечения, важным источником получения новых лечебных пищевых продуктов и фармакологических препаратов (Sytnik et al., 2002; Wasser, Diduch, 2004).

Начаты в 70-х годах 20 ст. интенсивные исследования увенчались созданием эффективных противоопухолевых препаратов, получаемых из плодовых тел или биомассы грибов, выращенной на жидких средах. В последнем случае возможно получение продуктов метаболизма гриба определенного, стабильного химического состава. К таким препаратам относятся лентинан из *Lentinus edodes*, крестин из *Trametes versicolor*, шизофилин (сонифлан, SPG) из *Schizophyllum commune*, грифолан из *Grifola frondosa*, фламмулин из *Flammulina velutipes*. Наиболее известными и традиционными лекарственными веществами, получаемыми из макромицетов, являются полисахариды, в основном β-глюканы.

Биологически активные полисахариды широко распространены среди макромицетов и имеют различное строение у разных видов грибов. Более того, разные штаммы одного и того же вида могут продуцировать полисахариды с различными свойствами, как это показано для штаммов *Trametes (Coriolus) versicolor* (Hiroshi, Taneda, 1993), которые содержат одинаковый полисахаридный компонент, но имеют в своем составе различные белковые молекулы, связанные с полисахаридами. Как показали многочисленные исследования, плодовые тела, мицелий и споры лекарственного гриба восточной медицины *Ganoderma lucidum* (рейши) содержат около 400 различных биоактивных компонентов, которые включают главным образом тритерпены, полисахариды, нуклеотиды, стеролы, жирные кислоты, белки, пептиды и микроэлементы (Wasser, 2005).

Противоопухолевые полисахариды, изолированные из грибов, по своей природе являются водорастворимыми β-D-глюканами с сильно разветвленной структурой, в состав которых могут входить глюкоза, ксилоза, манноза, галактоза и другие моно- и ди-сахара. В зависимости от способа выделения и очистки, а также условий культивирования гриба-продуцента, получаемые онкостатические препараты могут иметь различный компонентный состав. Так, например, в отличие от лентинана, препарат LEM, получаемый из культурального мицелия и жидкости *L. edodes*, в своем составе содержит не только гликопротеин, но и некоторое количество производных нуклеиновых кислот, витамины группы В и эргостеролы. Еще несколько препаратов с более высокой онкостатической и иммуностимулирующей активностью (LAP и EP3) были получены путем спиртовой экстракции и/или фракционирования LEM. Механизм фармакологического действия высокомолекулярных природных β-D-глюканов, подробно изученный на примере лентинана, основан на усилении иммунитета клеток хозяина, т.е. они действуют

как индукторы интерферона, обнаруживая наряду с онкостатической, активность против ряда вирусов, включая, в отдельных случаях, вирусы СПИДа и гепатита.

Современные данные свидетельствуют о безусловной специфике химического состава грибов, который включает элементы, присущие пищевым продуктам как растительного, так и животного происхождения, и поэтому грибы отнесены в разряд низкокалорийных пищевых продуктов, богатых физиологически функциональными незаменимыми веществами. По мнению ряда исследователей, одновременное присутствие в составе грибов витаминов С, D₂ и Е объясняет их антиоксидантное действие, подтвержденное в экспериментах на животных.

Макромицеты с лекарственными свойствами служат основой для создания функциональных пищевых продуктов, укрепляющих иммунитет и предупреждающих многие заболевания, продлевающих жизнь. Ряд культивируемых съедобных макромицетов *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sapodoleucus*, *Pholiota nameko*, *Tricholoma matsutake*, *Auricularia auricula* и др. обладают способностью снижать содержание холестерина в крови и запатентован ряд антисклеротических пищевых добавок, в состав которых входит грибной порошок.

Созданию биоактивных добавок (БАД) на основе лекарственных съедобных грибов уделяется все больше внимания в микологических и медикобиологических исследованиях, проводимых сегодня в Украине. БАД серии «Микосвит», включающие мицелий целого ряда лекарственных макромицетов (*Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune* и др.), прошли клинические испытания и выявили возможность их применения для повышения неспецифической резистентности организма к действию неблагоприятных факторов окружающей среды, профилактики нарушения обменных процессов, связывания и ускорения выведения из организма токсических и чужеродных веществ (Бисько, Москаленко, 2004).

В Институте ботаники имени Н.Г. Холодного НАНУ на базе Национальной коллекции культур шляпочных грибов разрабатываются научные основы биотехнологии культивирования и практического использования важнейших видов лекарственных, в т.ч. съедобных грибов, из родов *Lentinus*, *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Hericium*, *Hypsizygos*, *Morchella*, *Flammulina*, *Grifola*, *Schizophyllum* и др., которые отражены в монографии коллектива авторов «Культивирование съедобных и лекарственных грибов» под редакцией Бухало А.С. Киев, 2004.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА НА ОСНОВЕ МИЦЕЛИЯ ГРИБА *LAETIPORUS SULPHUREUS* И ЕЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ НАЗНАЧЕНИЕ

Гвоздкова Т.С.¹, Черноок Т.В.¹, Пленина Л.В.²,
Лопатенко Ю.С.², Романовская Т.Р.², Игнатенко С.В.²

¹ Институт микробиологии НАН Беларуси

² Республиканское научно-производственное унитарное предприятие
диагностических препаратов «Диалек»
Минск, Беларусь

Основой биологически активной добавки (БАД) является субстанция, представляющая собой сухой порошкообразный мицелий красно-оранжевого цвета, полученный путем глубинного культивирования штамма базидиального гриба *Laetiporus sulphureus* на питательной среде с использованием доступного и относительно дешевого сырья.

Как известно, питательная и биологическая ценность любой БАД определяется составом входящих в нее компонентов.

Исследование биохимического состава сухого мицелия гриба показало, что в нем содержится 22-24% сырого протеина. В состав белковых компонентов входят все незаменимые аминокислоты, на долю которых приходится 35-40% от суммы аминокислот. Содержание нуклеиновых кислот составляет 2,0-2,5 %.

Носителем биологической активности мицелия гриба является липокаротиноидный комплекс. Содержание каротиноидных пигментов в сухом мицелии достигает 0,8-1,0%. В составе каротиноидного комплекса выявлено 3 фракции, отнесенные к классу ксантофиллов, а точнее к кетокаротиноидам. Наибольший удельный вес (около 87%) приходится на пигмент, получивший тривиальное название лэтипорксантин.

Как известно, каротиноиды являются природными соединениями, биосинтез которых осуществляется лишь растениями и некоторыми микроорганизмами. Человек и животные не способны синтезировать их и должны регулярно получать с пищей в виду того, что они выполняют в организме целый ряд жизненно важных функций. По современным представлениям разнообразие функциональных свойств каротиноидных пигментов обуславливает и их биологическую ценность, связанную с иммуномодулирующим, антиканцерогенным, гиполипидемическим, радиопротекторными и др. действием. Эти функциональные проявления молекул каротиноидов, как полагают, могут быть аддитивны с их высокими антиоксидантными и антирадикальными свойствами, которые обнаружены у многих каротиноидных пигментов, в том числе ксантофиллах [1,2].

В липидной части мицелия, составляющей 20-25% в расчете на сухое вещество (СВ), наиболее важными и физиологически активными

компонентами являются также фосфолипиды, на долю которых приходится 4-7%, стероидные соединения, в том числе, провитамин Д (более 1,0% от СВ мицелия) и тритерпеновые кислоты. Являясь важнейшими структурными элементами клеток, эти соединения принимают активное участие в различных метаболических, регуляторных и обменных процессах. Благодаря своим известным фармакологическим свойствам, эти липидные вещества могут способствовать регенерации поврежденных митохондрий, активировать нарушенные ферментные системы, усиливать детоксикационную функцию печени, способствовать правильному фосфорнокальциевому обмену и др. [3]

В составе липидов мицелия гриба *L. sulphureus* содержатся насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты с четным числом атомов углерода (от 12 до 18). Из насыщенных жирных кислот преобладает пальмитиновая кислота (13-16% от общей суммы кислот). Более 70% приходится на долю эссенциальной линолевой кислоты, являющейся предшественником простагландинов, — регуляторов эндокринной, репродуктивной, нервной и др. систем человеческого организма. Выявление биологических свойств незаменимых жирных кислот позволило установить, что при их недостатке в организме снижается интенсивность роста, угнетается репродуктивная функция, понижается сопротивляемость к инфекциям, возникает поражение кожных покровов и др. нарушения [4].

Как показали исследования, липокаротиноидный комплекс мицелия гриба *L. sulphureus* характеризуется высокой антиокислительной активностью (70-90% от АОА иона), которая обусловлена не только природой, входящих в него компонентов, но и их синергическим взаимодействием.

Таким образом, биохимический состав сухого мицелия гриба — субстанции БАД определяет достаточно широкий спектр ценных биологических свойств, входящих в нее компонентов, что в свою очередь делает возможным применение ее в качестве питательного и лечебно-профилактического средства.

Безвредность БАД на основе глубинного мицелия гриба *L. sulphureus* подтверждена результатами исследований республиканского УП диагностических и лекарственных препаратов «Диалек» (г. Минск). В исследованиях, проведенных на лабораторных животных (белые мыши, крысы, морские свинки и кролики), показано отсутствие общего токсического действия БАД. Установлено, что при пероральном поступлении в организм животных, БАД не обладает кожно-раздражающим и ирритативным действием, а также не проявляет каких-либо существенных функциональных и структурных нарушений со стороны жизненно важных систем организма животных.

На фоне терапии токсического гепатита БАД отмечено снижение токсического действия тетрахлорметана, о чем свидетельствовало нормализация активности ЛДГ, снижение концентрации мочевины и билирубина в сыворотке крови.

Исследование гомогенатов печени затравленных тетрахлорметаном животных на содержание продуктов перекисного окисления, а именно, малонового диальдегида (МДА) и уровня активности фермента антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы (СОД) выявило увеличение в 1,6 раза концентрации МДА с одновременным снижением в 1,4 раза активности СОД. У животных получавших БАД, уровень МДА нормализовался до контрольного значения, а активность СОД достоверно повысилась. Полученные результаты свидетельствуют о том, что БАД обладает гепатопротекторным действием, в основе которого при экспериментальном токсическом гепатите лежат мембраностабилизирующие и антиоксидантные свойства.

Биологически активная добавка на основе мицелия гриба *L. sulphureus* может быть рекомендована в качестве вспомогательного и профилактического средства для проведения общеукрепляющей терапии, при нарушении функции печени, при состоянии организма, связанного с интенсивным развитием свободнорадикальных процессов и недостаточностью функционирования антиоксидантной системы.

Литература

1. Капитанов А.Б., Пименов А.М. Каротиноиды как антиоксидантные модуляторы клеточного метаболизма //Успехи современной биологии.-1996. — Т.116, вып. 2 — С.179-193.
2. Mathews-Roth M. M. Recent progress in the medical application of carotenoids //Pure Applied Chemistry. — 1991. — Vol.63, №3 — P.147-156.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. — М.: Медицина, 1984. — Т.2 — С.34-46.
4. Дедюхина Э.Г., Ерошин В.К. Микроорганизмы как потенциальные продуценты незаменимых жирных кислот //Биологические науки — 1984. — №2 — С.5-16.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ГРИБЫ ЮГА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Горбунова И.А.¹, Перова Н.В.¹, Теплякова² Т.В.

¹ Центральный сибирский ботанический сад СО РАН
Новосибирск

² Государственный Научный Центр Вирусологии и Биотехнологии
«Вектор»

Наукоград Кольцово, Новосибирская обл.

В настоящее время известно более 1500 видов макромицетов, произрастающих в различных растительных сообществах юга Западной Сибири. Около 250 видов шляпочных грибов являются съедобными. Список ядовитых грибов насчитывает около 50 видов макромицетов.

Многие съедобные и ядовитые грибы становятся объектами изучения в них биологически активных веществ. Согласно флористическим исследованиям и литературным данным, на территории юга Западной Сибири произрастает более 150 видов базидиальных и сумчатых грибов, обладающих лечебными свойствами. Наиболее известными в народной медицине сибиряков являются *Amanita muscaria* (L.: Fr.) Hook., *Boletus edulis* Bull.: Fr., *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilát и *Fomes officinalis* (Vill.: Fr.) Bondartsev et Singer. Если мухомор красный и белый гриб отличаются широким распространением и обильным плодоношением в смешанных и особенно сосновых лесах, то чага и лиственничная губка встречаются крайне редко. О лечебном и тонизирующем действии чаги известно с давних времен. Научно установлено, что гриб чага повышает защитные реакции организма больного, активизирует обмен веществ мозговой ткани, повышая биоэлектрическую активность коры головного мозга, при внутреннем и наружном применении оказывает значительное противовоспалительное действие. Доказано экспериментально, что чага задерживает рост некоторых опухолей. Население Сибири активно употребляет настой чаги. В аптеках продают сырье и готовые препараты из чаги. В практической медицине первым препаратом был «Бефунгин», созданию которого предшествовали длительные исследования российских ученых. Химический состав и биосинтетическую деятельность гриба изучали Кузнецова Г.А., 1959, 1962; Ловягина Е.В. и др., 1959; Низковская О. П. и др., 1960, 1965; Маттисон Н.Л., 1965; Шиврина А.Н. и др., 1969 и др. Действие биологически активных веществ чаги на организм исследовали Булатов П.К. и др., 1959; Спалва Е.А. и др., 1961; Еременко М.В., 1973; Рудаков В.Ф., 1973 и др. Клинические испытания препарата чаги проводили Булатов П.К. и др., 1959, 1961; Березина М.П., 1959; Березина М.П. и др., 1966; Мартынова Е.Я., 1973 и др. Есть сведения об использовании «Бефунгина» в лечении псориаза (Телятьев, 1987). Сейчас в аптеках г. Новосибирска представлен широкий выбор препаратов, включающих чагу: чага сухая, настойка чаги, сироп из чаги, чай, кремы-бальзамы для лечения заболеваний вен, суставов, заживления ран. Чага активно используется Центром Фунготерапии, созданном под Санкт-Петербургом, наряду с грибом шиитакэ (*Lentinus edodes*) в лечении раковых больных (Филиппова, 2003). В последнее время появляется много информации о препаратах из *Cordyceps militaris* (L.) Link. В природе на юге Западной Сибири известны единичные находки данного вида в Горном Алтае и Кемеровской области. К редким лекарственным видам в Сибири следует отнести также *Sarcosoma globosum* (Schmidel) Rehm, *Sparassis crispa* (Wulfen) Fr., *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst., *Dictyophora duplicata* (Bosc) E. Fisch., *Phallus impudicus* Pers., *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) Gray, *Hericium coralloides* (Scop.: Fr.) Pers., *Pleurotus calypttratus* (Lindblad) Sacc., *Polyporus umbellatus* (Pers.: Fr.) Fr., *Lyophyllum decastes* (Fr.) Singer, *Oudemansiella mucida* (Schrad.) Höhn., *Suillus bovinus* (Pers.) Kuntze. У населения нашего региона большой популярностью в качестве продуктов

питания пользуются съедобные виды *Kuehneromyces mutabilis* (Schaeff.: Fr.) Singer et A. H. Sm., *Armillaria mellea* (Vahl.: Fr.) P. Kumm., *Flammulina velutipes* (Curtis : Fr.) Singer, *Leccinum aurantiacum* (Bull.) Gray, *L. scabrum* (Bull.) Gray, *L. versipelle* (Fr. et Hök) Snell, *Suillus granulatus* (L.: Fr.) Snell, *S. grevillei* (Klotzsch.: Fr.) Singer, *S. luteus* (L.: Fr.) Gray, *Cantharellus cibarius* Fr., *Pleurotus ostreatus* (Fr.) P. Kumm., *P. pulmonarius* Fr., *Lactarius deliciosus* (L.) Fr., *L. torminosus* (Schaeff.: Fr.) Gray и представители рода *Russula* большинство которых, дают хорошие урожаи при благоприятных погодных условиях в березово-сосновых, лиственничных и таежных лесах на равнине и в горных областях. К сожалению, люди по-прежнему употребляют в пищу *Paxillus involutus* (Batsch) Fr., который признан ныне ядовитым видом. Обычными лесными видами являются также *Laccaria laccata* (Scop.) Fr., *Lepista nebularis* (Fr.) Harmaja, *L. nuda* (Bull.: Fr.) Cooke, *Lycoperdon perlatum* Pers., *L. pyriforme* Pers., *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) J. J. Kickx, *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr.) P. Karst., *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst., *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Bondartsev et Singer, *Schizophyllum commune* Fr. и др. В степных и луговых сообществах Новосибирской области, Алтайского края и Горного Алтая часто встречаются *Agaricus arvensis* Schaeff. ex Secr., *Calvatia excipuliformis* (Scop.) Perdeck, *C. lilacina* (Berk. et Mont.) Lloyd, *C. utriformis* (Bull.) Jaap, реже *Langermannia gigantea* (Batsch: Pers.) Rostk. и *Pleurotus eryngii* (DC.) Gillet. В различных местообитаниях можно найти *Coprinus atramentarius* (Bull.: Fr.) Fr. и *C. comatus* (O. F. Müll.: Fr.) Gray, но плодоношение их обильным бывает редко. До сих пор не обнаружены в Сибири хорошо известные во всем мире виды *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, *Tricholoma caligatum* (Viv.) Ricken, *Auricularia auricula-judae* (Bull.) Wettst.

Литература

1. Березина М. П., Еременко М. В., Мартынова Е. Я. Клинико-физиологические наблюдения за больными полипозом желудка, леченными препаратами чаги // Продукты биосинт. высш. грибов и их использ. М.; Л.: «Наука», 1966. С. 78-88.
2. Булатов П. К., Березина М. П., Якимов П. А. Чага, ее свойства и применение при раке IV стадии // Чага и ее лечебное применение. Л.: Медгиз, 1959. С. 7-22.
3. Булатов П.К., Березина М.П., Еременко М.В., Буцк А.Н. К вопросу о лечении 2%-м водным раствором чаги больных язвенной болезнью — язвой желудка и двенадцатиперстной кишки // Комплексное изучение биологически активных веществ низших растений. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1961. С. 236-247.
4. Еременко М. В. Изменение температуры мозга после внутривенного и внутримышечного введения чаги // Высшие грибы и их физиологически активные соединения. Л.: «Наука», 1973. С. 54-56.
5. Кузнецова Г. А. Химия пигментов чаги // Чага и ее лечебное применение Л.: Медгиз, 1959. С. 85-89.
6. Кузнецова Г. А. Некоторые сведения о химическом составе *Inonotus obliquus* // Журн. общ. хим., 1962. Т. 32. Вып. 94. С. 4090-4091.

7. Ловягина Е. В., Шиврина А. Н., Платонова Е. Г. Изучение кислотного состава чаги методом распределительной хроматографии // Чага и ее лечебное применение Л.: Медгиз, 1959. С. 62-67.
8. Мартынова Е. Я. Клинические наблюдения за больными язвенной болезнью, леченными бифунгином // Высшие грибы и их физиологически активные соединения. Л.: «Наука», 1973. С. 91-94.
9. Маттисон Н. Л. Ферменты гриба *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil. // Корм. белки и физиол. активн. вещества для животных. М.:Л.: «Наука», 1965. С. 21-25.
10. Низовская О. П., Шиврина А. Н., Платонова Е. Г. и др. Условия образования пигментного комплекса чаги в искусственной культуре // Микробиол., 1960. Т. 29. № 3. С. 441-445.
11. Низовская О. П., Милова Н. М. Особенности роста и развития штаммов трутового гриба *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil. в культуре // Корм. белки и физиол. активн. вещества для животных. М.:Л.: «Наука», 1965. С. 12-20.
12. Пясковский С., Рихтер С. Применение препаратов из чаги при лечении злокачественных опухолей // Комплексное изучение биологически активных веществ низших растений. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1961. С. 258-264.
13. Рудаков В. Ф. Влияние чаги на метастазирование опухоли Эрлиха у мышей // Высшие грибы и их физиологически активные соединения. Л.: «Наука», 1973. С.52-54.
14. Спалва Е. А., Петряевская Н. В. Определение токсичности некоторых очищенных препаратов из чаги // Комплексное изучение биологически активных веществ низших растений. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1961. С. 206-210.
15. Телятьев В.В., Полезные растения Центральной Сибири.- Иркутск: Восточно-Сибирское Книжное Издательство, 1987. – 400с.
16. Филиппова И.А. Лекарство нового тысячелетия. Грибы против рака.- Санкт-Петербург: изд-во «Диля», 2003. – 160с.
17. Шиврина А.Н., Низовская О. П., Фалина и др. Биосинтетическая деятельность высших грибов. Л.: Изд-во «Наука», Ленингр. отд., 1969. – 241 С.

ТРАМЕЛАН – ОТЕЧЕСТВЕННАЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА НА ОСНОВЕ СУХОЙ БИОМАССЫ ЛЕКАРСТВЕННОГО БАЗИДИОМИЦЕТА *TRAMETES PUBESCENS* (SCHUMACH.) PIL T И ДРУГИЕ ПРЕПАРАТЫ ГРИБОВ РОДА *TRAMETES (CORIOLUS)*

Горшина Е.С.¹, Скворцова М.М.²

¹ Московский государственный университет инженерной экологии

² ЗАО «Микротэл»

Москва

В конце 1960-х годов в Японии впервые было начато широкое изучение микопрепаратов в качестве противораковых лекарств. Это было вызвано как присутствием грибов в традиционной китайской медици-

не, которая была широко известна и в Японии, так и обнаруженными в грибных препаратах иммуномодулирующими свойствами, в то время как иммунотерапии при лечении онкологических больных в Японии придавалось особое значение.

В поисках препаратов, которые при высокой эффективности были бы наименее токсичны и имели минимум побочных эффектов, было изучено около 200 базидиомицетов, преимущественно из семейства *Polyporaceae*. Наиболее эффективным и безвредным оказался вид *Coriolus versicolor* (Fr.) Quél.

Высшие базидиальные грибы рода *Trametes (Coriolus) (сем. Polyporaceae)* известны как продуценты ряда ценных биологически активных веществ. Траметес разноцветный (*Trametes versicolor* (L.) C. G. Lloyd (*Coriolus versicolor* (L. et Fr.) Quél.) в народной медицине Китая известен под названием – Yunzhi, а Японии – kawaratake и применяется в виде водных экстрактов порошка плодовых тел. По результатам некоторых исследований траметес опушенный (*Trametes pubescens* (Schumach.) Pilát (*Coriolus pubescens* (Schum. ex Fr.) Quél.)) обладает противоопухолевым и иммунизирующим действиями, превышающими по эффективности траметес разноцветный.

Разработанный фирмой Kureha Chemical Industry Co. на основе одного из штаммов *C. versicolor* препарат получил название Krestin (или PSK). В середине 1970-х годов права на крестин были переданы фирме Sankyo Pharmaceutical и в 80-е годы крестин стал самым продаваемым противораковым лекарством в Японии. Объем его продаж составлял \$600 млн. в год. Sankyo позиционировала крестин как растительный препарат для иммунотерапии раковых заболеваний. В 1989 г применение крестина было ограничено в связи с недостаточностью его эффективности в качестве единственного средства лечения раковых заболеваний, однако до настоящего времени крестин широко используется в онкологической практике в комплексной терапии раковых больных и в качестве средства поддерживающей терапии.

Крестин (в научной литературе – PSK), действующим началом которого служат иммуномодулирующие протеинсодержащие полисахариды, экстрагируемые из мицелиальной массы *C. versicolor*, его южнокорейский аналог *Copolang*, китайский аналог *IPPV* и другие препараты полисахаридной природы из траметесов широко используются в онкологии при лечении рака желудка, пищевода, прямой кишки, яичников, матки и шейки матки, простаты, мочевого пузыря, острой лейкемии, чаще всего в сочетании с химио- или радиотерапией, а также с обычной и криохирургией в послеоперационный период и в качестве средства поддерживающей терапии. Препараты регулирует работу иммунной системы, усиливают клеточный иммунитет, восстанавливают пониженный у раковых больных иммунный ответ, обладают антивирусным и антибактериальным действием, повышают эффективность противораковых лекарств, способствуют дезинтоксикации организма, обладают

антиметастатической активностью, снижают гематологическую супрессию, вызываемую противоопухолевыми лекарствами. Эффективность препаратов клинически подтверждена также при заболеваниях печени различной этиологии. Экстракты траметесов обладают гипополидемиической, антиатерогенной активностью, регулируют образование простагландинов. Препараты эффективны в пероральной форме, малотоксичны и пригодны для длительного применения.

В Европе и США применение крестина до настоящего времени сдерживается требованиями фармакологических служб выделить один активный компонент в качестве действующего начала и описать единственный механизм действия, который может быть отслежен в клинических условиях, что для крестина и его аналогов, представляющих собой природный комплекс полисахаридов с множественным механизмом действия, не представляется возможным.

В настоящее время единственным в Европе производителем препаратов на основе *Coriolus versicolor*, является основанная в 1997 году компания MRL (Mycology Research Laboratory), коммерциализирующая результаты научных микологических исследований в области диетических и биологически активных продуктов, производимых в Великобритании в соответствии со стандартами GMP. MRL разработала биологически активную пищевую добавку, названную Coriolus-MRL, которая производится на основе продукта, получаемого компанией Gourmet Mushrooms Inc в Калифорнии при выращивании штамма *Coriolus versicolor* (CV-OH1) на зерновом субстрате. Получаемый продукт не является экстрактом, как крестин, а содержит мицелий и примордии гриба. Технология гарантирует отсутствие пестицидов и тяжелых металлов и микробиологическую чистоту получаемого продукта.

В Великобритании стерильный зерновой порошок *Coriolus versicolor* прессуют в таблетки с защитным пленочным покрытием с добавлением специальных таблеттирующих агентов (микрористаллической целлюлозы, растительного стеарата магния). Препарат выпускается в виде таблеток по 500 мг и порошкообразной форме (250 г) с банках с мерной ложечкой.

За время, прошедшее со времени начала выпуска препарата, клиническая эффективность его многократно подтверждена. С 1999 г препарат рекомендован также для укрепления иммунной системы спортсменов в США и Португалии.

Разработана и выпускается линия Corpet, предназначенная для иммунокоррекции и лечения вирусных и онкологических заболеваний домашних животных, а также синдрома хронической усталости у лошадей.

Препараты на основе грибов рода *Trametes* в России не зарегистрированы и отечественных аналогов не имеют.

В связи с этим создание отечественной лечебно-профилактической пищевой добавки, активной субстанцией которого была бы интактная мицелиальная биомасса грибов рода *Trametes*, представляется актуальной.

Нами разработан биотехнологический способ производства сухой мицелиальной субстанции траметеса опушенного (*T. pubescens*), предусматривающий выращивание мицелиальной массы гриба асептически в условиях глубинного культивирования на жидких средах, содержащих в качестве основного источника углерода сырье растительного происхождения. Испытания процесса культивирования проведены в промышленных условиях в аппаратах вместимостью 63 м³. Разработана техническая документация на производство препарата в таблетированной форме. Разработаны ПДК. В настоящее время препарат назван «Трамелан» и сертифицирован как пищевая добавка

Трамелан удовлетворяет требованиям безвредности и содержит ряд биологически активных компонентов.

Анализ химического состава показал высокое содержание белковых веществ (около 40%), а также присутствие биологически активных компонентов.

Аминокислотный состав включает все незаменимые аминокислоты, в том числе дефицитные – лизин, метионин, триптофан. Наибольший удельный вес приходится на глутаминовую кислоту (6,5%), аспарагиновую кислоту (3,8%), лизин и лейцин (по 2,9%), треонин и глицин (по 2,2%).

Липидная фракция (2,5-3,5 %) включает жирные кислоты, триглицериды, стерины, углеводороды, воска и в полярной части фосфолипиды.

Фракция жирных кислот представлена только соединениями с четным числом атомов углерода (соотношение их во фракции близко к лучшим растительным маслам) и характеризуется высоким (более 60 %) содержанием ненасыщенных жирных кислот (в основном – олеиновой и линолевой). Из насыщенных жирных кислот преобладает пальмитиновая.

Стериновая фракция Трамелана представлена в основном 3 компонентами – 5-дигидроэргостерином (8,5 % от суммы), собственно эргостерином (52,4 % от суммы) и его 22-дигидроаналогом (39,1%). Эргостерин (дигидроэргокальциферол) относится к группе витамина Д и обладает сравнимой активностью, составляющей около 40 % от активности самого холекальциферола.

Фракция фосфолипидов включает 7 компонентов, основными из которых являются фосфатидилсерин (58 %), фосфотидилэтаноламин (серин) (24 %), и фосфотидилхолином (лецитин) (18 %).

Трамелан содержит витамины, среди которых преобладают: холин, РР (никотиновая кислота); В₃ (пантотеновая кислота) В₂ (рибофлавин), фолиевая кислота, В₆ (пиридоксин).

Минеральный состав отличается высоким содержанием калия, кальция, фосфора, железа, меди и цинка и удовлетворяет требованиям СанПиН по содержанию токсичных элементов.

Институтом питания РАМН проведены исследования безвредности Трамелана и его биологической ценности. Показано отсутствие общего

токсического действия на организм животных в опытах по субхронической токсичности. В опытах отмечены некоторые метаболические эффекты, в частности, снижение уровня общего холестерина в сыворотке крови крыс на 24 %, что может свидетельствовать о гипохолестеринемическом действии препарата.

Исследованиями, проведенными в ГНЦА, установлено, что Трамелан не оказывает токсического действия при введении в желудок и брюшную полость подопытных животных. Не кумулирует при повторном введении в организм. Не обладает раздражающим и кожно-резорбтивным действием. Не является аллергеном.

Медико-биологические исследования, проведенные ФГО «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения и социального развития РФ и в ГНЦА показали высокую иммунотропную активность Трамелана.

Клиническими исследованиями, проведенными в клинике Института экологии и токсикологии имени Л.И. Медведя НАНУ установлено, что пероральный прием Трамелана способствует достоверному снижению уровня накопления опухолево-ассоциированных антигенов (онкомаркеров), а именно: раково-эмбрионального антигена (РЭА), ферритина, накапливающегося при опухолях пищеварительной системы, карбогидратного антигена (СА-125), сопряженного с опухолями яичников, и мусциноподобного антигена (МЦА), рост которого выявляется при опухолях молочной железы. 30-дневный курс приема препарата достоверно способствует восстановлению дезинтоксикационных свойств печени, в частности, восстановлению до физиологической нормы оксидаз-смешанной функции печени. Получены клинические данные о нормализующем влиянии препарата на клеточный иммунитет организма и, в частности, на количество и соотношение Т и В-лимфоцитов.

Промышленный выпуск Трамелана предполагается в 2006.

ПРИМЕНЕНИЕ ПОРОШКОВ ЗЕРНОВОГО МИЦЕЛИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ ВЕШЕНКИ, ГАНОДЕРМЫ И ШИИТАКЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТОКСИЧЕСКОЙ ГЕПАТОДИСТРОФИИ У ПОРОСЯТ

Евдокимова О.А.¹, Алехин Ю.Н.²

¹ *Лаборатория биотехнологии ВГАУ имени К.Д. Глинки*

² *ООО «Ветеринарный диагностический центр»*

Воронеж

Ранее в работах Митропольской Н.С. с соавторами было показано гепатотропное действие глубинного мицелия шиитаки и ганодермы на крысах.

В данной работе было изучено применение порошков зернового мицелия лекарственных грибов вешенки, ганодермы и шиитаке для лечения токсической гепатодистрофии у поросят. Мицелий грибов выращивали на зерне овса, затем высушивали, измельчали до порошков и таком виде вводили в корм животным.

В опыте были задействованы поросята в возрасте 45 суток. Отъем поросят был проведен в возрасте 28 суток. В возрасте 34 суток животные были переведены в групповые клетки. Отъем и перегруппировка животных создает стрессовую ситуацию, что, как правило, сопровождается обострением течения хронических патологий и возникновением новых болезней.

Клиническое обследование поросят позволило отобрать группу животных с патологией печени, с наличием выраженных синдромов эндогенной интоксикации, цитолиза и гепатодепрессии. Из числа больных животных были сформированы три опытных и одна контрольная группы. В опытных группах применяли порошок мицелия, который задавали с кормом в суточной дозе 5 г. В контрольной группе поросятам задавали лечебный премикс, в состав которого входят микроэлементы, витамины и аминокислоты (рецепт ВНИИНБЖ 1985 г.), обладающий выраженным нормализующим действием на обмен веществ и функции печени. Препараты грибов применялись в течение 10 дней. Через 5 дней после последней дачи препаратов был проведен отбор проб крови. Результаты анализов показали, что применение порошков из высушенного мицелия вешенки, ганодермы и шиитаке не оказывают на организм поросят вредного влияния. Отсутствует токсическое влияние, не отмечены признаки нарушения функций печени, почек и органов эритропоэза.

Применение порошка из мицелия и лечебного премикса оказывает нормализующее действие на обмен веществ и функции печени у поросят, больных токсической гепатодистрофией. Нормализующее гепатотропное действие наиболее выражено при применении порошка из мицелия шиитаке. Также достоверное, но менее выраженное действие отмечено у ганодермы. При применении порошка вешенки и лечебного премикса терапевтический эффект менее выражен.

Механизм действия высушенной субстанции мицелия заключается в антитоксическом действии, нормализующем влиянии на белковый обмен и мембранные структуры организма. При патологии печени это проявляется в снижении выраженности или устранении признаков синдромов цитолиза, гепатодепрессии и эндогенной интоксикации.

Наиболее перспективными в плане использования как гепатотропных препаратов являются порошки из мицелия шиитаке и ганодермы.

БАД «МИПРО-ВИТ» В ДЕТСКОЙ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИИ

Качалай Д.П., Лаврентьева Е.Б., Скворцова М.М., Горшина Е.С.

Клиника Института экогигиены и токсикологии имени Л.И.

Медведя

Киев, Украина

Федеральный детский научно-практический центр

противорадиационной защиты при Московском НИИ педиатрии и

детской хирургии МЗ РФ

ЗАО «Микротэл»

Москва

Болезни органов пищеварения в связи с их широким распространением у детей являются одной из важнейших проблем педиатрии. При этом все более актуальным в современных условиях становится поиск методов лечения, расширяющих адаптационные способности организма через реализацию его собственных резервов, сводя к минимуму возможные осложнения.

В этом плане весьма перспективным является применение в педиатрической практике БАД «Мипро-ВИТ», производимого на основе биомассы монокультуры лекарственного гриба *Fusarium sambucinum*, являющегося эффективным иммунокорректором и обладающего антиоксидантной и гиполлипидимической активностью.

Наиболее подробные клинические исследования эффективности применения Мипро-ВИТа детям были проведены в регионах Украины и России с повышенным радиационным фоном. Под наблюдением там находилось около 350 детей в возрасте от 3 до 14 лет.

Как правило, у детей, проживающих на таких территориях, диагностировалось снижение клеточного и гуморального иммунитета. Дети болели вегетососудистой дистонией по гипотоническому типу, хроническими гастродуоденитами, холециститами, колитами. У большинства детей наблюдался дисбактериоз.

При клиническом обследовании детей в возрасте 3-5 лет в 50,6% случаев было выявлено повышение количества микроорганизмов на единицу кожной поверхности. Из них у 37% детей выявлены манти-разлагающие, а у 44% — гемолитические формы микроорганизмов, несвойственные здоровому организму ребенка. Микрофлора кишечника характеризовалась общим снижением количества бифидобактерий, появлением измененных форм кишечной палочки с пониженной ферментативной активностью, и большого количества клеток золотистого стафилококка, стрептококка, протей. У 6,5% детей в кишечнике обнаружены грибы рода *Candida*. В более старших возрастных группах детей нарушения микробного биоценоза регистрировались чаще и носили полиорганный характер.

Заболевания органов пищеварения и сердечно-сосудистой системы у этих детей развивались на фоне выраженного синдрома перекисидации. У 80% больных детей всех возрастных групп в сыворотке крови методом иммунохемилюминесценции определялось значительное количество перекисных радикалов, у 30% пациентов они выявлялись и в форменных элементах крови. Изменения красной крови детей характеризовались снижением содержания гемоглобина от 8,1 до 11,2 г% и изменением числа эритроцитов от $26 \cdot 10^5$ до $36,7 \cdot 10^5$.

Изменения белой крови характеризовались умеренным лейкоцитозом от 9000 до 12550 мкл у 33% детей. Невысокая эозинофилия крови обнаружена у 35%, изменения в лейкоцитарной формуле крови наблюдались более чем у 80% детей — они характеризовались статистически достоверным нейтрофилезом, базофилией, а также моноцитозом и лимфоцитозом.

У всех детей в крови определялось повышение количества противорганых аутоантител, в основном, к антигенам щитовидной железы, селезенки, печени, кишечника, реже к антигенам сердца.

В лечебно-профилактические схемы реабилитации детей всех возрастных групп Мипро-ВИТ вводился наряду с общепринятым лечением в суточной дозе от 0,5 до 1,0 г на 10 кг веса тела ребенка при 2-3-кратном приеме в течение 25-30 дней.

В результате приема Мипро-ВИТа у большинства детей отмечалось улучшение гемограммы периферической крови — повышалось число моноцитов и тромбоцитов, показатели гемоглобина и количество эритроцитов приближилось к норме, что свидетельствовало об усилении неспецифической резистентности организма.

У 70% детей Мипро-ВИТ способствовал ускорению лечебного процесса с длительной ремиссией заболеваний органов пищеварения. При склонности к запорам устанавливалась нормальная регулярность физиологических отправлений.

У наблюдаемых детей в 1,5-2 раза повышалось содержание лизоцима в крови, желудке и слюне. Одновременно в 4 раза снижалась высеваемость на отпечатках кожных покровов пациентов гемолитических и манти-разлагающих форм микроорганизмов, в фекалиях в 2 раза снижалось количество гемолитических микроорганизмов и повышалось содержание бифидобактерий. В результате нормализации состава микрофлоры кишечника и кожных покровов исчезали явления дисбактериоза.

Полученные результаты подтверждают мнение ряда авторов (Гущина Н.С., Гребенюк В.Н., Быстрицкая Т.Ф., 1994 г.), что Мипро-ВИТ, являясь природным комплексом незаменимых аминокислот, биологически активных полисахаридов, ненасыщенных жирных кислот, макро- и микроэлементов, витаминов выполняет роль благоприятной питательной среды для обеспечения жизнедеятельности нормальной

микрофлоры с восстановлением слабокислой рН среды кишечника и вытеснением условно-патогенной флоры.

Анализ динамики иммунологических показателей в ходе применения препарата выявил тенденцию к нормализации содержания в крови Т- и В-лимфоцитов, в результате чего коэффициент Т/В, равный 1,1 до начала лечения, приблизился к норме и составил 2,2-2,3. Одновременно повышалось содержание в сыворотке периферической крови общих IgA.

Изучение функционального резерва фагоцитирующих клеток показало, что под влиянием Мипро-Вита резервные возможности этих клеток (тест восстановления НСТ) возрастали в 1,8 раза.

Чрезвычайно важен установленный факт снижения маркера атопии – уровней общих IgE в сыворотке периферической крови, которые в отдельных случаях к концу лечения больных респираторными аллергиями снижались вдвое, что коррелировало с уменьшением выраженности реакции при кожном тестировании аллергенов. Одновременно у детей отмечалось смягчение, а при более легких формах полное исчезновение аллергических проявлений. Повышалась резистентность больных к простудным заболеваниям. Исследование периферической крови детей, получавших Мипро-ВИТ, регулярно выявляло значительный рост показателя гемоглобина.

После проведения курса приема Мипро-ВИТа было получено выраженное снижение в крови детей концентрации антител к гемолитическому стафилококку, стрептококку, кишечной палочке, энтерококку, синегнойной палочке, протее. Эти результаты подтверждают целесообразность назначения Мипро-ВИТа ослабленным детям с явлениями дисбактериоза не только с целью нормализации состава микрофлоры, но и для предупреждения формирования сенсibilизации на несвойственную здоровому организму микрофлору.

Биохимилюминесцентными исследованиями показано, что у детей, принимавших Мипро-ВИТ, обнаружено в сравнении с контрольной группой достоверное снижение свободно циркулирующих в организме перекисных радикалов и антител к тканям почки, печени, желудка, кишечника, селезенки, щитовидной железы, что сопровождалось более стойкой ремиссией ранее выявленных заболеваний.

Каких-либо осложнений или нежелательных побочных действий от применения Мипро-ВИТа при клинических исследованиях не зафиксировано.

Таким образом, положительный эффект клинического применения Мипро-ВИТа в детской гастроэнтерологии характеризовался сокращением периода обострения воспалительных и инфекционно-аллергических процессов и достижением более стойких и длительных ремиссий, а также более выраженной нормализацией биохимических, иммунологических и клинических показателей.

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ МИЦЕЛИЯ БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *LAETIPORUS SULPHUREUS*

Квачева З.Б.¹, Капич А.Н.², Вотьяков В.И.¹, Николаева С.Н.¹

¹ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

² Международный государственный экологический университет имени А.Д. Сахарова
Минск, Беларусь

Как известно, многие грибы способны образовывать антибиотические вещества. Некоторые из грибных антибиотиков нашли практическое применение и используются в качестве лекарственных средств при химиотерапии инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями. Ксилотрофные базидиомицеты (дереворазрушающие базидиальные грибы) также способны продуцировать антибиотические вещества, обладающие бактериостатическим или бактерицидным действием. Значительно меньше известно о способности грибов продуцировать вещества, обладающие противовирусным действием. Целью данной работы было изучение противовирусной активности экстрактов мицелия ксилотрофного базидиомицета *Laetiporus sulphureus* (серно-желтого трутовика), малоизвестного съедобного гриба. В литературе имеются сведения об антибактериальных, противоопухолевых и цитотоксических свойствах плодовых тел серно-желтого трутовика. Наши предыдущие исследования показали, что спиртовые экстракты мицелия этого гриба, выращенного в глубинной культуре, обладают антиоксидантными и радиопротекторными свойствами. Однако о противовирусных свойствах этого гриба до наших исследований не сообщалось. Необходимость поиска новых противовирусных средств обусловлена широкой распространенностью инфекционных заболеваний, вызываемых вирусами, а также недостатком или в ряде случаев отсутствием эффективных противовирусных препаратов. Кроме этого, в последнее время серьезную проблему представляет появление вариантов вирусов, устойчивых к известным химиотерапевтическим средствам. В частности, появились варианты вируса простого герпеса первого типа (ВПГ-1), устойчивые к классическим ингибиторам, обладающим высокой избирательностью антивирусного эффекта, – ацикловиру и фосфоноуксусной кислоте.

В данной работе изучали действие экстракта мицелия *L. sulphureus* на течение герпетической инфекции, вызванной различными вариантами ВПГ-1, как чувствительными, так и резистентными к ацикловиру и фосфоноуксусной кислоте. Исследования проводили на экспериментальной модели герпетической инфекции *in vitro* в перевиваемых культурах клеток глиомы – С-6, полученных из опухоли мозга крысы, а также в клетках почки африканской зеленой мартышки – Vero. В

качестве ростовой среды для клеток использовали минимальную среду Игла (МЕМ) с добавлением 10% сыворотки крови плодов коров и 100 мкг/мл гентамицина. Посевная доза составляла $1,5 \times 10^5$ клеток/мл. Культуры инфицировали разными вариантами ВПГ-1 на 3-и сутки роста. Множественность инфицирования составляла 0,1-1,0 ТЦД₅₀/мл. За инфицированными культурами наблюдали в течение недели, отмечая специфический цитопатический эффект вирусов по степени деструкции клеточного монослоя. Для оценки противовирусной активности экстракта мицелия *L. sulphureus* его разводили водой и добавляли в нетоксичных концентрациях в культуры клеток одновременно с инфицированием соответствующим вариантом ВПГ-1. Перед этим определяли максимально переносимую дозу препарата, оценивая действие экстракта мицелия *L. sulphureus* с помощью цитоморфологического теста (по целостности неинфицированного клеточного монослоя). За цитотоксическую дозу (ЦТД) принималась такая концентрация экстракта, которая вызывала выявляемые при микроскопии нарушения нормальной клеточной морфологии приблизительно у 90 % клеток. Противовирусную активность препаратов констатировали по снижению инфекционной активности ВПГ-1.

Отсутствие экстракта мицелия *L. sulphureus* все исследованные варианты ВПГ-1 одинаково хорошо репродуцировались, вызывая цитолитическую инфекцию в культурах эпителиальных клеток Vero и глиальных клеток С6. Первые признаки цитопатического действия вируса (появление цитоплазматических и внутриядерных включений, симпластообразование и наличие шарообразных клеток) проявлялись через 24 часа после инфицирования, а через 48 часов наступала полная цитодеструкция и отслоение клеток от поверхности флакона. При внесении экстракта мицелия *L. sulphureus* в различных концентрациях (0,1%, 0,2 %, 0,4% и 0,8 %) в инфицированные культуры клеток наблюдали выраженный вирусингибирующий эффект в отношении всех исследованных вариантов ВПГ-1 – чувствительных и резистентных к ацикловиру и фосфоноуксусной кислоте. Вирусингибирующая концентрация экстракта мицелия (0,2% раствор) была в 4 раза меньше его максимально переносимой дозы. При внесении экстракта мицелия в культуры клеток снижение инфекционной активности для исходного чувствительного к ацикловиру и фосфоноуксусной кислоте варианта ВПГ-1 составляло 2,8 lg ТЦД₅₀/мл, для ацикловиррезистентного варианта – 3,2 lg ТЦД₅₀/мл и для резистентного к фосфоноуксусной кислоте варианта – 2,8 lg ТЦД₅₀/мл.

Таким образом, в результате проведенных исследований обнаружено, что экстракты мицелия ксилотрофного базидиомицета *L. sulphureus* обладают противовирусными свойствами. Показано также, что они проявляют антивирусную активность в отношении вариантов вируса простого герпеса первого типа, устойчивых к ингибиторам, обладающим высокой избирательностью антивирусного эффекта – ацикловиру

и фосфоноуксусной кислоте, что делает их перспективными для разработки противогерпетических препаратов. В настоящее время проводятся дальнейшие исследования с целью определения химической природы и механизма действия веществ, детерминирующих противовирусные свойства экстрактов мицелия этого гриба.

МАТЕРИАЛЫ К ИЗУЧЕНИЮ МИКОФИЛЬНЫХ ГРИБОВ АРМЕНИИ

Нанаголян С.Г., Абрамян Дж. Г.,

Таслахчян М.Г., Сирунян А.Л., Амирян А.А.

*Ереванский государственный университет, кафедра ботаники
Ереван, Армения*

Нами уже отмечалось, что в последние годы, в связи с тяжелым экономическим положением республики, отмечается усиленный интерес к грибам как продуктам питания (Нанаголян, Базилян, Сирунян, 2003). Для использования гриба в кулинарных и медицинских целях необходимо иметь плодовые тела высокого качества, выращенные в экологически чистых условиях. Поскольку грибы (и дикорастущие, и культивируемые), как и все другие организмы, подвергаются различным заболеваниям, необходимо изучить потенциально опасные виды патогенов, которые являются не только фактором потери качества продукции и снижения урожайности, но и благодаря токсическим веществам делают плодовые тела непригодными для употребления в медицине и кулинарии.

В процессе приспособления к разным условиям жизни или использования для питания различных веществ или живых тканей образовались те или иные экологические группы грибов, которые неравноценны по своему значению. Среди множества различных эколого-трофических групп своеобразную и интересную группу составляют грибы-микотрофы, обитающие на макромицетах. Способность организмов развиваться в природе за счет грибов положена в основу понятия “микотрофность”. На основании общности пищевых связей они выделяются в особую экологическую группу (Рудаков, 1981). Микотрофные грибы широко распространены в природе. Сюда входят как облигатные паразиты, так и многие сапротрофы из различных систематических групп грибов. Под влиянием гриба-паразита карпофоры гриба-хозяина изменяют свое морфологическое строение – часто разрушается гименофор, вследствие чего некоторые съедобные грибы теряют практическую ценность. Сапротрофные формы, в свою очередь, ускоряют процесс разложения плодовых тел и тем самым участвуют в жизни биогеоценоза (Мелик-Хачатрян, 1980).

С целью изучения микофилов Армении нами были собраны макромицеты, пораженные микофильными грибами. При этом были поставлены следующие задачи:

1. выявить таксономический состав микофильных грибов, собранных в основных лесных флористических районах республики,
2. представить подробную морфологическую характеристику карпофоров пораженных макромицетов, а также штаммов микофилов, выделенных на различные питательные среды,
3. изучить антагонистическую активность гриба *Pleurotus ostreatus* в отношении некоторых микофилов,
4. исследовать микофильные виды грибов и их вредоносное значение, выявленных на культивируемом в искусственных условиях съедобном грибе *Agaricus bisporus*.

Сбор и изучение грибов проводилось маршрутно-экспедиционным методом в течение вегетационного периода 2001-2004 г.г. Были обследованы в основном северо-восточный и центральный флористические районы Армении, а также грибоводческие хозяйства.

В результате микологического анализа собранного материала и опубликованных ранее работ (Мелик-Хачатрян, 1980; Мелик-Хачатрян, Таслахчян, 1977) выявлено 45 видов микофильных грибов, из которых 21 вид отмечается в республике впервые на новом субстрате.

Нами были исследованы 17 видов макромицетов: *Agaricus bisporus*, *Armillaria mellea*, *Boletus sp.*, *Clavariadelphus pistillaris*, *Entoloma prunuloides*, *Ganoderma lucidum*, *Gymnophyllus junonius*, *Helvella elastica*, *Inocybe sp.*, *Lepista nuda*, *Oudemansiella radicata*, *Paxillus involutus*, *Phallus impudicus*, *Pleurotus ostreatus*, *Ramaria botrytis*, *Stereum hirsutum*, *Tricholoma triste*. Подавляющее большинство пораженных макромицетов относится к агарикоидным базидиомицетам (11 видов). Афиллороидные грибы представлены 4 видами, гастеромицеты и сумчатые грибы по одному виду. Среди изученных видов многие относятся к лекарственным грибам и используются в народной медицине. Поскольку микофильные грибы, поражающие макромицеты вызывают различного типа морфологические изменения, нами приведены описания пораженных карпофоров, что может служить дополнительным признаком для таксономии.

Также были составлены подробные культурально-морфологические диагнозы выделенных в чистую культуру 20 видов микофильных микроскопических грибов (*Aspergillus niger*, *Cladosporium elegantum*, *S. herbarum*, *Dactylium dendroides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sp.*, *Moeszia pernambucensis*, *Monodictis putredinis*, *Mucor globosus*, *M. racemosus*, *Mycogone perniciosa*, *Penicillium canescens*, *P. lanosum*, *Penicillium sp.*, *P. verrucosum var. cyclopium*, *P. urticae*, *Sepedonium chrysospermum*, *Stemphylium botryosum*, *Trichoderma polysporum*, *Verticillium malthousi*) и одного микофила – макромицета (*Tremella mesenterica*). Для выделения и культивирования

грибов были использованы общепринятые микробиологические и микологические методы (Методы экспериментальной микологии, 1982).

Для изучения антагонистической активности в опыт были включены чистые культуры двух штаммов дереворазрушающего съедобного гриба *Pleurotus ostreatus* и четырех видов микофильных микромицетов: *Penicillium lanosum*, *Penicillium urticae*, *Moeszia pernambucensis*, *Stemphylium botryosum*. Наблюдения показали, что при совместном выращивании гриба-хозяина и микофила отмечается различная активность в зависимости от комбинаций. Установлены различные типы реакций и степень антагонизма в отношении микромицетов.

Так, при комбинации *P. ostreatus* и *Penicillium urticae*, *P. ostreatus* и *Penicillium lanosum* культура макромицета полностью подавляет рост колонии микромицетов. Несмотря на то, что на 4-5-ые сутки после посева рост обоих грибов временно приостанавливается, на 6-ые сутки культура макромицета, благодаря своей высокой активности, полностью нарастает и покрывает колонию микромицетов.

При совместном выращивании *P. ostreatus* и *Stemphylium botryosum* на 7-ые сутки образуется мицелиальный валик, затем наблюдается активный рост мицелия макромицета, который полностью покрывает мицелий микроскопического гриба.

При комбинации *P. ostreatus* и *Moeszia pernambucensis* мицелий микофила на 6-ые сутки полностью покрывает колонию макромицета. Таким образом, *Moeszia pernambucensis* оказался наиболее агрессивным среди исследуемых микромицетов.

Большой практический интерес представляют результаты микологической экспертизы плодовых тел культивируемого шампиньона *Agaricus bisporus*, в различных грибоводческих хозяйствах Армении. Эта проблема весьма актуальна для республики, где с каждым годом расширяется грибоводство, которое зачастую несет большие убытки от грибов-паразитов.

В результате обследования шампиньонниц республики нами выявлены патогенные грибы, вызывающие такие заболевания шампиньона двуспорового, как микогагоноз (*Mycogone perniciosa*), вертициллез (*Verticillium malthousei*), фузариозное увядание (*Fusarium oxysporum*), паутинистая гниль плодовых тел. Кроме грибных патогенов довольно распространенными и вредоносными являются бактериальные (*Pseudomonas tolaasi*) и вирусные заболевания, в результате которых отмечается мумификация плодовых тел. В отдельных случаях, потери, вызываемые микофильными грибами, составляли до 40%. Приведенные данные свидетельствуют о том, что патогенные грибы снижают урожайность культивируемых грибов, нанося ощутимый ущерб грибоводческим хозяйствам.

Таким образом, исследование микофильных грибов имеет как теоретическое, так и важное практическое значение. Комплексное изучение микофильных грибов позволит разработать научно-обоснован-

ные методы борьбы с грибами-паразитами, поскольку микопаразиты и созданные на их основе препараты успешно используются в качестве биологических мер борьбы с патогенными грибами — возбудителями многих болезней важнейших сельскохозяйственных растений, а также культивируемых съедобных грибов.

ЛЕЧЕБНЫЕ СВОЙСТВА ГЕРИЦИЯ ШИПОВАТОГО И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Поединок Н.Л.

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины
Киев, Украина

Гериций шиповатый (*Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers.) относится к базидиомицетам, считается съедобным и широко распространен в Юго-Восточной Азии (Китае и Японии), Европе, Северной Америке. Он принадлежит к экологической группе дереворазрушающих грибов и вызывает белую гниль сердцевины деревьев. Растет на дубе, орехе, буке, клене, платане и некоторых других широколиственных породах деревьев. Наиболее часто встречается на поваленных стволах деревьев и пнях.

Гриб в разных странах мира известен под различными названиями. В Японии его называют Yamabushitake, потому что по форме этот гриб напоминает одежды Yamabushi — будистских монахов практикующих аскетизм в горах. Его также называют Yokotake (гриб пьяниц), Usagitake (кроличий гриб), Harisenbon (воздушная рыба). Этот гриб можно встретить под названиями: Голова обезьяны, Грива льва, Голова медведя, Борода старика, Борода сатира, Ежовый гриб.

Плодовые тела гериция шиповатого очень нежные, мясистые, в начале их формирования коралловидноразветвленные, иногда напоминающие цветную капусту. Зрелые плодовые тела округлые или овальные, до 40 см в диаметре, состоят из спускающихся каскадом неветвящихся шипов, которые покрывают ветви почти целиком. Плодовые тела обычно белоснежные, иногда имеют розоватый оттенок, с возрастом, от прикосновения и при высушивании окрашиваются в коричневый или желто-коричневый цвет, особенно на верхушке.

Гериций шиповатый известен как деликатесный гриб, обладающий экзотическим вкусом (после приготовления напоминает омара). Его аромат гораздо сильнее аромата многих других известных съедобных грибов. Гериций хорошо известен в Китае, где он культивируется и стоит очень дорого.

Он обладает не только прекрасными вкусовыми качествами и приятным ароматом, но и лечебными свойствами: проявляет *противоопухоле-*

вую активность, помогает при *хроническом гастрите, язве и раке желудка и пищевода, хроническом бронхите*, используется для лечения *болезни Альцгеймера*, поскольку обладает способностью восстанавливать работу нервных клеток. В традиционной китайской медицине гериций используется для лечения внутренних органов, гриб стимулирует переваривание пищи, улучшает общее самочувствие и способствует улучшению обмена веществ. Традиционное лекарство, приготовленное из высушенных грибов называют «хоутон» (напоминает голову маленькой обезьянки).

По химическому составу, плодовые тела и мицелий гериция шиповатого состоят, в основном из углеводов и протеинов, кроме того содержат незначительное количество жиров и минеральных компонентов. Питательный состав определяют свободные аминокислоты и углеводы. Гериций шиповатый содержит витамины В₁ и В₂, никотиновую кислоту и *эргостерол* (провитамин D₂). Широко известно, что грибы, содержащие *эргостерол*, как в высушенном виде, так и в виде различных экстрактов, даже в небольших дозах, способствуют адсорбции и метаболизму кальция в организме. Поэтому их употребление является прекрасной профилактикой *остеопороза*. Известно, что *нуклеотиды* и *нуклеозиды*, обычно содержащиеся в грибах, такие как аденозин и др., обладают тромболитической активностью, кроме того эти же соединения эффективны при профилактике инфарктов.

Наиболее детально изучением биологически активных веществ гериция занимались японские исследователи Mizuno, Kanayama, Kawagishi и др. Из плодовых тел этого гриба были выделены и идентифицированы 3 группы *полисахаридов*: -глюкоксилан, глюкоксилан-протеиновый комплекс и галаксилан-глюкоксилан-протеиновый комплекс. Исследования, проведенные на мышах, показали, что все они обладают *противоопухолевой* активностью.

При глубинном культивировании гриба в ферментере из мицелия выделены вещества, относящиеся к группе *поликетонов*: *герицины А, В, С* и *-дигидропирон еринапирон С*. Доказано, что *герицины* подавляют слабый *цитотоксический эффект*, геринапирон С обладает *анти-микробной активностью* в отношении грам-положительных бактерий.

Из свежих плодовых тел, мицелия и культуральной среды гериция изолированы низкомолекулярные соединения, относящиеся по химической природе к фенолам (поликетонам) — *герициноны (А и В)* и *жирные кислоты (У-А-2)* Их использование дает такой же эффект при лечении рака, как и химиотерапия. Герициноны А и В подавляли цитотоксический эффект HeLa S3 клеток. Герициноны С, D, E, F, G и H индуцируют синтез фактора роста нервных клеток, что объясняет положительный эффект применения препаратов на основе гериция при лечении болезни Альцгеймера.

Глубинно выращенный на жидкой питательной среде мицелий, содержащий полисахариды и полипептиды (ксилан, глюкоксилан, гетероглюкоксилан и их протеиновые комплексы) является прекрасным

иммуномодулятором, выпускается в форме таблеток. Измельченные сухие плодовые тела в таблетированной форме в Китае используют для лечения язвы желудка, рака желудка и пищевода. Практикуют водные экстракты из плодовых тел этого гриба, их также солят, приготавливают вино и употребляют как напиток, укрепляющий здоровье и продлевающий жизнь.

В коммерческом масштабе препараты из этого гриба производятся для лечения раковых заболеваний, хронических бронхитов, используются как гепатопротекторы и для восстановления нервной системы.

Лекарственные свойства этого вида гриба, по сравнению с другими видами лекарственных грибов (*Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* и пр.), еще изучены недостаточно. Тем не менее перспективность дальнейших исследований в этом направлении и целесообразность производства лекарственных препаратов и биодобавок из гериция очевидны.

Коммерческое производство этого гриба ограничено из-за низкой урожайности большинства известных штаммов, образования нестандартных по форме и размерам плодовых тел, а также из-за плесневой инфекции, являющейся серьезной проблемой в течение всего периода плодоношения. Плодовые тела не могут долго храниться, в странах СНГ отсутствуют стандарты на плодовые тела гериция шиповатого и их хранение.

В Китае, Японии, США, Германии практикуются разные методы культивирования гериция шиповатого: экстенсивный (в природных условиях) и интенсивный (на искусственных субстратах). На Украине и в других странах СНГ гериций практически не культивируется.

ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ МИЦЕЛИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ *CORDYCEPS*, КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ИММУНОТЕРАПИИ

Розанов С.Е.¹, Петров А.Н.²

¹ *Детская городская поликлиника №1 МУЗ*

² *Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Иркутск*

При проведении иммунокорректирующего лечения нами уже 3 года используется БАД «Кордицепс», производимая фирмой «Тяньши» китайской государственной корпорации. Препарат выпускается в желатиновых капсулах. Рекомендуемый режим назначения детям от 5 до 15 лет – по одной капсуле два раза в день.

Доказано, что кордицепс стимулирует активность и размножение Т-лимфоцитов, естественных киллеров и клеток системы мононуклеаромакрофагов, а также стимулирует секрецию лимфоцитарных факторов, при этом активность естественных киллеров увеличивается в 1,5 раза;

процент фагоцитоза мононуклеарными макрофагами увеличивается на 73%, фагоцитарное число увеличивается на 130%. Применение кордицепса позволяет организму с повреждением 40% лейкоцитов в течение 7 дней восстановить их нормальное количество. Повышение кордицепсом иммунитета и стимуляция кроветворения – это две стороны одного взаимосвязанного процесса.

Экстракт кордицепса (*Cordyceps sinensis*) обладает выраженным бронходилатирующим действием, расслабляет гладкую мускулатуру бронхов, успокаивает одышку, способствует купированию обострений астмы, обладает противовоспалительным и противогрибковым (*Epidermophyton floccosum*; *Microsporum gypseum*; *Microsporum lanosum*) действием.

В задачи исследования входило изучение стандартизованного препарата кордицепса китайского в условиях Городской детской поликлиники, в фазе долечивания и реабилитации. На основании клинического опыта контрольной группы из 30 пациентов подросткового возраста с 11 до 13 лет, было установлено: что долечивание ОРЗ с выраженными явлениями бронхита, синусита, ринита при использовании кордицепса дало эффективность в снижении временной нетрудоспособности на 36%. Реабилитация контрольной группы не дала рецидивов, осложнений, аллергических реакций. Препарат использовался перорально, интраназально, в виде орошения. Клинические анализы на дисбактериоз кишечника в сравнительной группе при лечении с антибиотиками дал сохранение бактериальной флоры, в отличие при лечении стандартными антибиотиками.

Как известно, эффективность многих методов фитотерапии многократно увеличивается при использовании местной, аборигенной флоры и фауны. Поэтому наряду с внедрением БАД «Кордицепс», нами проводились работы по получению аналогичного препарата на основе местных, восточно-сибирских штаммов грибов из рода *Cordyceps*. Наилучшими показателями роста и накопления биомассы отличались два штамма *Cordyceps militaris*, выделенных нами в Южном Прибайкалье, для которых в настоящее время подбираются питательные среды для их промышленного культивирования.

ФУНГОТЕРАПИЯ – ЕСТЕСТВЕННАЯ МЕДИЦИНА БУДУЩЕГО

*Филиппова И.А., Фунтик Т.В.
Санкт-Петербург*

1. Лекарственные грибы – понятие широко известное и в России и за границей

«Грибами лечились всегда. И везде. Причем, за границей особенно охотно, потому что иностранцы к грибам как к еде относятся очень

осторожно, а вот лекарственным свойствам грибов доверяют стопроцентно. И оказывается, они-то и правы.

В Германии всегда лечились настойками из строчков, сморчков и белых грибов, в Мексике широко известны грибы агарики и мухоморы, в Венгрии и Чехословакии – лисички, в Японии и Китае – целая плеяда разнообразных грибов – шиитаке, мейтаке, кордицепс, рейши и т.д. Именно Япония открыла миру название «фунготерапия» – лечение целебными грибами, этой науке уже ни много ни мало 2 тысячи лет. И знания о лекарственных свойствах грибов, и опыт – колоссальные.

Что удивительно – шиитаке известны японской и китайской медицине уже более двух тысяч лет, их целебные свойства описаны у знаменитого целителя Ву Горин в трактате «Лекарственные средства для ежедневного применения» (1309 год), в которой целая глава посвящена этим грибам. Он утверждает, что шиитаке усиливает «ци», т.е. дух жизненной энергии, утоляет голод, лечит простуду и проникает в систему кровообращения, то есть шиитаке помогает человеку чувствовать себя «полным жизни», повышает «жизненную энергию». Ву Горин дает рецепты применения при аутоиммунных заболеваниях – рассеянном склерозе, красной волчанке, склеродермии и др., при онкологии и для поднятия жизненной силы.

В «Каноне» Авиценны первое место по целебным свойствам опять же занимают грибы. А самое удивительное то, что сразу же после перечисления более десятка грибов идет, женьшень. Считайте, он только на одиннадцатом месте».

2. Грибы продуцируют естественные антибиотики

«Интерес к лекарственным грибам резко возрос и именно из-за открытия пенициллина. Как известно, он был выделен из плесневых грибов, так называемых микромицетов. Большое количество антибиотиков продуцируют такие плесневые грибы, как виды родов *Penicillium* и *Aspergillus*. Такие антибиотики как гризофульвин, цитринин, вортманин, нотатин, патулин, аспергиллин, фумагиллин и т.д. – это как раз и есть «детища» микромицетов. Стали исследоваться и макромицеты, то есть базидиальные грибы: французские ученые получили из говорушки гигантской антибиотик клитоцибин, шведы выделили из рыжика антибиотик лактариовиолин, венгры нашли в поддубнике антибиотик болетол.

Сейчас каждый второй антибиотик синтезирован из веществ грибов. К сожалению, синтезированные препараты имеют свои негативные свойства, а вот биологически активные препараты из грибов таких отрицательных свойств лишены – они абсолютно безвредны и не дают побочных результатов, и вместе с тем обладают колоссальной лечебной способностью.

3. Новые открытия «на грибных опушках»

Кроме того, кроме паразитической антимикробной способности грибы обладают рядом других не менее удивительных свойств. Послед-

ние исследования американских ученых вообще стали сенсационными: были открыты «летучеподобные вещества» в грибах, их так и назвали «грибные фитонциды». Эти фитонциды способны уничтожить любой вирус: от безобидного рино-вируса, вызывающего насморк до грозного вируса СПИДа.

Кстати, чемпионами по количеству фитонцидов сразу стали японские шиитаке и наши отечественные грибы – веселка обыкновенная, рыжик и груздь перечный.

Противоопухолевыми свойствами обладают практически все высшие грибы в той или иной степени. Исследования показали, что полисахариды раздражают макрофаги и сам организм начинает выделять вещество перфорин, которое с легкостью борется с мутированными злокачественными клетками.

Что поразительно, каждый гриб – это отдельная мини-аптека со своими свойствами, набор веществ в них работает строго с определенным заболеванием. И очень обидно, что японские грибы сейчас уже изучены основательно, они стали сенсацией, а наши отечественные грибы еще только – только становятся предметом исследований.

4. Производство и применение биодобавок из лекарственных веществ базидиальных грибов по авторским методикам фунготерапевта Ирины А. Филипповой – приоритетная работа Центра.

Разработано более 20 биодобавок на основе целебных японских, китайских, российских грибов. Комплексное применение этих биодобавок не только улучшает качество жизни при различных заболеваниях, но реально лечит. Примеры в докладе И.А. Филипповой, подтвержденные историей болезни.

Автор всех методик лечения грибами – Филиппова Ирина Александровна, фунготерапевт, автор более 50 книг по альтернативной медицине.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ И ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ЗИМНЕГО ОПЕНКА *FLAMMULINA* *VELUTIPES* (FR.) P. KARST

Шелюк А.И., Бисько Н.А.
Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины
Киев, Украина

Одной из главных причин разного рода заболеваний человечества на сегодняшний день является плохая экологическая ситуация и неспособность большей части жителей нашей планеты обеспечить свой организм необходимыми питательными веществами для нормального

метаболизма клеток. Синтезированные химическим путем вещества для профилактики тех или других заболеваний стаут все менее актуальными. Сегодня наибольшее внимание многих исследователей завоевали грибы как наиболее продуктивные объекты биологически ценных веществ.

Flammulina velutipes — один из перспективных источников ценных питательных и биологически активных веществ широкого спектра действия.

Население провинции Нагано, Япония, которое занимается выращиванием зимнего опенка, значительно меньше подвергается раковым заболеваниям, чем население других провинций. Противоопухолевые качества были определены у низкомолекулярного бета-глюкан-протеинового комплекса (ЕА6), выделенного из плодовых тел, и состоящего с молекул глюкозы, манозы, арабинозы и 16-ти аминокислот. Исследования показали, что комплекс реализует противоопухолевое действие через активацию иммунной системы. Было отмечено, что ЕА6 был активен против опухолей при оральном применении и неактивен, когда вводили внутривенно. Исследования показали, что регулярное потребление плодовых тел зимнего опенка, или экстрактов биомассы является эффективным в предупреждении и лечении многих специфических заболеваний, повышении иммунитета. Экстракт зимнего опенка, проявляет очень низкую токсичность при регулярном потреблении и даже при больших дозах. (Mizuno, T., et al. 1995).

Две фракции лектинов FVA-L с молекулярным весом 12000 и FVA-S 8000 соответственно, были выделены с *F. velutipes*. Гемагглютинационная активность была обнаружена только в FVA-L фракции. Лектины были митогенными по отношению к лимфоцитам селезенки мышей.

При экстракции мицелия водой, экстракт был более фармакологически активен, чем при экстракции этиловым спиртом. Водный экстракт содержал больше сахаров, полисахаридов, полиолов, и терпеноидов, тогда как спиртовой экстракт содержал больше алкалоидов, аминокислот, нингидрины, и индол содержащие вещества, такие как феноловые кислоты (Badalyan, 1998)

Высокая антиоксидантная активность (АОА) была отмечена в мицелиальном экстракте *F. velutipes* при 5,10 мг/мл (57%) и в культуральной жидкости 0,1мл (51%). Максимальная АОА экстракта плодовых тел 20 мг/мл (29%) (Badalyan, 20003).

Было отмечено (Mitsuaki, 2002), что, этиловые экстракты мицелия *F. velutipes* обладали высокой антиаллергической активностью при введении орально мышам в дозе 250 мг/кг. Водные экстракты с фламулины не проявили антиаллергической активности при оральном введении. Однако вводимые водные и этиловые экстракты в ухо мышам с концентрацией 0,10 мг, проявили значительно высокую антиаллергическую активность.

С мицелия опенка зимнего был получен ферментный препарат владеющий прямой фибрино- и тромболитической активностью, что де-

лает возможным использования его в медицине при комплексной терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы (Псурцева, 1988).

По данным ряда авторов, культура гриба *F. velutipes* обладает рядом антимикробных и антифунгальных свойств. Так было показано, что экстракты зимнего опенка активно подавляют рост *Candida albicans* и гриба *Helminthosporium graminearum* (Бухало А.С., 1988).

Химический состав зимнего опенка является оптимальным для обеспечения клеток организма человека необходимыми для метаболизма веществами. Содержание сырого протеина в глубинном мицелии *F. velutipes* составляет 29% (Бухало, 1985). В состав мицелия, входят α - и β -альбумины и глобулины, спирто- и щелочерастворимые белки (Гаврилова, 1981). Внутри- и внеклеточные белки мицелия в основном состоят из легко растворимых фракций. Исследования аминокислотного состава мицелия *F. velutipes* показали, что белок по сравнению со стандартным белком ФАО несколько беднее по составу незаменимых аминокислот. Аминокислотный скор по суме этих аминокислот составляет 59%. Количество свободных аминокислот 55%. Среди незаменимых аминокислот белка *F. velutipes* преобладают лизин, лейцин, валин, аргинин и фенилаланин. Сума незаменимых аминокислот белка мицелия *F. velutipes* 5,5%. Перевариваемость сырого протеина мицелия 78,5% (Бухало и др., 1985).

Содержание липидов в мицелии *F. velutipes* колеблется в достаточно широких пределах: в мицелии — 2,0-5,3%, в плодовых телах (ПТ) — 5,8-10,5%. Из насыщенных жирных кислот (ЖК) в мицелии преобладают пальмитиновая (11,4%) и стеариновая (10%) (Kreula et al., 1976). Высокое содержание отмечено олеиновой (31,6%) и линолевой кислот (39%). В составе ЖК ПТ *F. velutipes* обнаружены также олеиновая, линолевая и линоленовая кислоты.

В составе стероидов ПТ и мицелия *F. velutipes* в качестве основных компонентов найдены эргостерин, перекись эргостерина, цервистерин, 22-дигидроэргостерин, ланостерин и его производное (Черточенко, 1985).

Известно, что в составе витаминов плодовых тел *F. velutipes* присутствуют витамины группы В, аскорбиновая кислота, эргостерин и др. (Sawada, 1965).

Анализ представленных литературных данных, посвященных изучению *Flammulina velutipes*, позволяет заключить, что этот гриб исследуется главным образом по двум причинам как один из объектов, перспективных в качестве дополнительного источника питательных веществ и как объект перспективный для исследований в области медицины в качестве поиска новых биологически активных веществ.

В национальной коллекции шляпочных грибов института ботаники имени М.Г. Холодного НАН Украины имеется широкий набор штаммов *Flammulina velutipes*, выделенных из различных местообитаний, что позволяет осуществить скрининг высокопродуктивных штаммов, под-

бор оптимальных питательных сред и субстратов, использовать химический состав и биосинтетическую активность этого перспективного для культивирования в Украине объекта биотехнологии.

К ПЕРСПЕКТИВЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ГРИБОВ

*Юцковский А. Д., Черных С. В., Новикова Е. В.
Государственный медицинский университет
Владивосток*

Лекарственные средства, полученные из грибов, вызывают у исследователей особый интерес в той связи, что грибы продуцируют различные по своей химической природе биологически активные вещества, которые могут регулировать многие процессы в организме человека. Наиболее широко используются грибы в лечебных целях в странах Восточной Азии, где в настоящее время используются 272 вида грибов, и еще около 200 их видов изучаются как перспективные для лечения различных заболеваний: вирусных, инфекционных, онкологических, сердечно-сосудистых. Активно ведутся разработки и поиск препаратов из грибов, понижающих сахар крови, регулирующих сексуальную функцию, снижающих кровяное давление. Между тем, в России, исследований подобного направления очень мало. Тогда как, к примеру, Дальний Восток России является уникальным по своим природным ресурсам, что позволяет проводить заготовки грибов в достаточных для исследований количествах, а также использовать выращивание грибов в культуре.

Целью настоящего исследования стало изучение эффективности применения гриба – древесного паразита: серно-желтого трутовика (*Laetiporus sulphureus* (Fr.) Bond et Singer) при сексуальных расстройствах. В китайской медицине он официально используется для лечения органов внутренней секреции, а постоянное употребление в пищу этого гриба способствует повышению сопротивляемости организма за счет содержания в нем эбуриновой кислоты, используемой в синтезе стероидных гормонов. Под наблюдением находилось 45 мужчин, в возрасте от 35 до 50 лет, предъявляющих жалобы на эректильную дисфункцию: снижение эрекции, укорочение длительности полового акта, ускорение эякуляции. При клинико-лабораторном обследовании у наблюдавшихся мужчин были исключены ИППП. Хроническим бактериальным простатитом страдало 22 из 45 наблюдавшихся. При формировании группы наблюдавшихся пациентов особое внимание уделяли выяснению состояния желудочно-кишечного тракта, в той связи, что язвенная болезнь желудка, 12-перстной кишки, в стадии обострения

гастрит являются противопоказанием к назначению настойки гриба. В процессе проведения терапии пациентам рекомендовано было исключение крепкого алкоголя, пива а также проведение 1-2 сеансов гидроклоноотерапии. Рекомендательный характер носило также использование больше зелени: петрушка, сельдерей, пастернак в пищевом рационе.

Собранный в Приморье, сушенный по специальной технологии гриб серно-желтый трутовик для непосредственного употребления перемалывали в мелкий порошок, 2 чайные ложки которого затем заливали 250мл кипяченой воды и настаивали в течение часа. После тщательного перемешивания настой ежедневно принимался внутрь в течение месяца. В результате проведенного исследования уже на 8-10 день приема настойки у 23 пациентов отмечено разрешение эректильных расстройств: повысилось либидо, усилилась и участилась эрекция, исчезли явления ранней эякуляции, пролонгировался половой акт и улучшилась окраска оргазма. У лиц, страдающих хроническим бактериальным простатитом зарегистрировано улучшение состояния эректильных расстройств к 23-25му дню проведения терапии. Побочных эффектов при приеме настойки не наблюдалось. В результате катамнеза выяснилось, что эффективность терапии отмечена пациентами еще в течение 6 месяцев после окончания курса приема настойки гриба. Что послужило основанием для рекомендаций курсового приема настойки 2 раза в год, с интервалом в 6 мес.

Таким образом, в результате использования настойки гриба серно-желтого трутовика отмечено разрешение или значительное улучшение явлений сексуальных расстройств у мужчин, что позволяет рекомендовать в практику доступный, экономически выгодный, альтернативный метод коррекции сексуальных расстройств у мужчин.

Глава 8.

ПОИСК ПЕРСПЕКТИВНЫХ АНТИМИКОТИКОВ. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К СОВРЕМЕННЫМ ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ

ШТАММ БАКТЕРИЙ С ВЫРАЖЕННОЙ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Авакян З.Г., Давидян Т.С.

Республиканский Центр Депонирования Микробов НАН Армении
Абовян, Армения

В процессе изучения микрофлоры компоста выделен штамм *Pseudomonas* с выраженной противогрибковой активностью. Установлено ингибирующее действие на культуры *Aspergillus terreus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. melinii*, *Paceliomyces variotii*, *Ulocladium botrytis*, а также различных видов дрожжевидных организмов. Угнетение роста микроорганизмов строго специфично и не проявляется на испытанные культуры бактерий.

Исследованы культуральные и физиолого-биохимические особенности выделенного штамма и условия биосинтеза антибиотика. Планируются работы по практическому применению нативных препаратов культуры бактерий.

БАКТЕРИОЦИНЫ КАК ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ В МИКОЛОГИИ

Блинкова Л.П., Горобец О.Г.

ГУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова РАМН
Москва

В 1985 г. впервые в медицинскую практику был внедрен препарат с коммерческим названием томицид, антибактериальным компонентом которого является бактериоцин [Блинкова Л.П., Сергеев В.В., Скрипкин Ю.К. и др., 1983]. Продукт вещества принадлежит группе молочнокислых бактерий. Свойства, которыми обладает томицид, позднее были обнаружены у бактериоцинов других продуцентов.

Необходимо подчеркнуть, что одна из рекомендаций по применению томицида относится к кожным заболеваниям [Скрипкин Ю.К., Бутов Ю.С., Блинкова Л.П., 1989].

За последние 20 лет среди исследователей существенно возрос интерес к бактериоцинам (термин предложен Jacob F. et al в 1953 г.) и особенно, к бактериоцинам лактобактерий. Способность синтезировать бактериоцины, долгое время изучавшаяся на колицинах (их продуценты – *E. coli* и близкородственные бактерии), обнаружена у многих родов микроорганизмов. Так, способность продуцировать бактериоциноподобные субстанции выявлена не только у бактерий, но также у *Streptomyces* [Roelants P. et al, 1964].

Как правило, изучение новых бактериоцинов касается физико-химических и биологических свойств бактериоцинов, генетического контроля их продукции и иммунитета к ним. На основании накопленных экспериментальных данных сформулированы критерии принадлежности веществ к бактериоцинам, принципы составления наименований, классификация.

К бактериоцинам относят микробные продукты рибосомального биосинтеза, имеющие пептидную (белковую) составляющую, обладающие бактерицидным или бактериостатическим действием, в первую очередь, на близкородственные микроорганизмы, адсорбирующиеся на специфических рецепторах, не активные в отношении популяции собственных клеток, для которых, однако, процесс биосинтеза бактериоцина летален.

В настоящее время бактериоцины, полученные от разных микроорганизмов, подразделяют на несколько групп, классов и субклассов (I, Ia, Ib; II, IIa, IIb; III, IV). Наибольший интерес вызывают бактериоцины (бактериоциноподобные вещества) – лантибиотики, содержащие в структуре пострепликативно модифицированные аминокислоты, такие как лантионин, β-метиллантионин, ненасыщенные аминокислоты (дегидроаланин и др.). Наибольшая часть охарактеризованных лантибиотиков принадлежит к классу Ia с молекулярной массой <5 кДа.

Показано, что уровень накопления бактериоцина зависит от условий культивирования штамма-продуцента, состава питательной среды, величины pH, температуры, количества кислорода или газовой смеси в среде и т.д. Известно, что грамположительные микроорганизмы синтезируют бактериоцины с более широким спектром действия, чем грамотрицательные микробы.

Бактериоцины характеризуются различной молекулярной массой, степенью устойчивости к воздействию высоких и низких температур, pH, растворителей, ферментов и других физико-химических факторов. Генетические детерминаты, контролирующие синтез бактериоцинов, локализованы на хромосоме, плазмидах или транспозонах [Altena, 2000, Engelke et al, 1992].

Наличие иммунитета у клеток, синтезирующих бактериоцины, является одним из их отличий от антибиотиков. Синтез “протеинов иммунитета” кодируют определенные гены.

Большинство синтезированных бактериоцинов экспортируются из клетки.

Основное поражающее воздействие бактериоцинов на чувствительную клетку направлено на цитоплазматическую мембрану, на синтез нуклеиновых кислот, белка, на формирование клеточной стенки, на процесс окислительного фосфорилирования и др.

В связи с массовым распространением лекарственноустойчивых форм микроорганизмов возрастает перспективность широкого использования в медицине, ветеринарии и т.д. бактериоцинов, для которых достоверно не доказано появление вторичнорезистентных микробов.

Помимо выявленной антимикробной и иммуномодулирующей активности важным свойством бактериоцинов является также отсутствие токсичности, относительно низкая величина минимальной подавляющей концентрации, способность аминокислот после распада пептидной составляющей включиться в метаболизм макроорганизма, не повреждая его. Последнее свидетельствует о безопасности бактериоцинов не только для человека, но и для окружающей среды.

Как оказалось, бактериоцины обладают также рядом других уникальных качеств, указывающих на значительный потенциал этих природных биополимеров.

Целесообразно отметить, что в отношении бактериоцинов имеются научные направления, по которым почти не проводятся исследования. Например, вопрос о чувствительности возбудителей микозов к бактериоцинам различных классов почти не изучен.

Таким образом, существующая информация позволяет надеяться, что поиск среди бактериоцинов эффективных безвредных терапевтических средств с антифунгальной активностью может привести к положительным результатам.

ИЗДЕЛИЯ ИЗ АНТИСЕПТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ В ПРОФИЛАКТИКЕ МИКОЗОВ СТОП

Важбин Л.Б.

*Кожно-венерологический клинический диспансер №1 Департамента
здравоохранения Москвы
Москва*

Наиболее распространенным грибковым заболеванием кожи человека являются микозы стоп, вызываемые в основном *Trichophyton rubrum*, реже другими дерматомицетами, дрожеподобными организмами рода *Candida* и плесневыми грибами (роды *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Fusarium*). На долю этих микозов приходятся основные трудовые потери в группе инфекционных поражений кожи, а по временной нетрудоспособности человека они уступают лишь простудным заболеваниям.

Протекают они хронически, терапия их дорогостояща, а профилактика трудоемка.

Поэтому появление в аптечной сети новых эффективных антимикотиков для лечения микозов кожи и ногтевых пластинок как местного (лаки - лоцерил, батрофен, мази, кремы и растворы - экзодерил), так и системного (тербинафин, итраконазол) действия открыло новую эру в терапии дерматомикозов.

Однако, несмотря на успехи фармации, число больных дерматомикозами все еще остается значительным. Одной из причин этого является недостаток средств эффективной профилактики микозов стоп. Это

побуждает специалистов к разработке моющих средств личной гигиены (мыла на основе триклозана, триклокарбана), а также созданию белья, носков, колготок, закладываемых в обувь стелек содержащих антифунгальные препараты (хлоргексидина биглюконат, фурагин и др.).

Приводим наши данные по созданию с НПМФ «Мария», ПФ «Кадотекс» и ПО «Конверсия», испытанию нами в группах соответствующих больных и обеспечению промышленного производства указанных изделий для профилактики дерматомикозов.

Созданные на основе антисептика Катамина АБ изделия - бумажные и шерстяные носки, стельки, колготки успешно испытанные нами в стационарных и амбулаторных условиях (с охватом около 500 человек), выпускаются промышленностью и широко могут использоваться в комплексе лечебно-профилактических мероприятий при микозах стоп.

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ЖИВОТНЫХ - НОВАЯ ГРУППА ПРОТИВОГРИБКОВЫХ СРЕДСТВ

Вальшев А.В.

*Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН
Оренбург*

Увеличение частоты возникновения микозов у иммунокомпрометированного хозяина, развитие лекарственной устойчивости у грибов к различным антибиотикам и химиопрепаратам являются основными причинами поиска новых противогрибковых средств. В последние годы внимание исследователей, занимающихся данной проблемой, привлекает группа эндогенных антибиотиков белковой природы, образующихся в различных органах и тканях животных на постоянной основе (конститутивно) или индуцируемых в ответ на внедрение микроорганизмов.

Одной из наиболее изученных групп антимикробных пептидов являются дефенсины позвоночных, которые в зависимости от количества и профиля дисульфидных связей делятся на три подсемейства: α -, β - и γ -дефенсины. У млекопитающих описано более 50 дефенсинов, которые накапливаются в гранулах нейтрофилов, моноцитов/макрофагов и клетках Панета, или образуются в кератиноцитах и эпителиальных клетках дыхательной, пищеварительной и мочеполовой систем. Другое семейство антимикробных пептидов у млекопитающих составляют кателицидины (около 30 пептидов).

Многие из защитных пептидов млекопитающих обладают противогрибковой активностью. Пептиды из гранулоцитов кролика (NP-1, NP-2 и NP-3a), протегрины лейкоцитов свиньи (PG-1, 2 и 3), пептид cBD-1 из верхних дыхательных путей шиншиллы *Chinchilla lanigera* (гомолог человеческого β -дефенсина 3) обладают высокой активностью

в отношении *Candida albicans* [Selsted *et al.*, 1985; Kokryakov *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 2004]. Кроме того, NP-1 подавляет рост *Cryptococcus neoformans*; МПК для инкапсулированных штаммов составляет от 3,75 до 15 мг/мл, для культур без капсулы этот показатель намного ниже (0,93 мг/мл) [Alcoulombre *et al.*, 1993]. NP-1 и другие кроличьи дефенсины оказывают губительное действие на *Coccidioides immitis*, а также на гифы и прорастающие конидии *Rhizopus oryzae* и *Aspergillus fumigatus* [Segal *et al.*, 1985; Levitz *et al.*, 1986]. Уникальный циклический θ -дефенсин RTD-1 лейкоцитов макака-резуса *Macaca mulatta* обладает активностью в отношении *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans* [Tran *et al.*, 2002].

Структурно родственные дефенсином коров пептиды - галлинацины - были выделены из псевдоэозинофилов домашних кур *Gallus gallus*. Оказалось, что некоторые галлинацины (Gal-1 и Gal-1a) проявляют антигрибковую активность [Harwig *et al.*, 1994]. В том же году другая группа исследователей выделила и секвенировала пептиды из гетерофилов кур и индеек, оказывающих в концентрации 16-2 мкг/мл снижение выживаемости (более чем на 90%) клеток *Candida albicans* [Evans *et al.*, 1994, 1995]. В настоящее время β -дефенсины, обладающие противогрибковой активностью, обнаружены в различных тканях птиц: крови кур, индеек и страусов; эпителиальных клетках кур и индеек; содержимом желудка королевских (патагонских) пингвинов *Aptenodytes patagonicus* [Sugiarto & Yu, 2004].

Важным источником антимикробных пептидов являются земноводные. Впервые такие соединения (магайнины) были обнаружены в секретах кожи гладкой шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* [Zaslhoff, 1987]; позже различные антимикробные пептиды - бомбинины, дермасептины, френатины, макулатины, цитропины, ауреины, темпорины, бревинины, раналексины, эскулентины, ранатуерины, тигеринины и др. - были выявлены в организме разных амфибий [Bulet *et al.*, 2004]. Противогрибковые пептиды выделены из кожных секретов чакской филломедузы *Phyllomedusa sauvagii* [Mor *et al.*, 1991], съедобной лягушки *Rana esculenta* [Simmaco *et al.*, 1994], пятнистой лягушки *Rana luteiventris* [Goraya *et al.*, 2000], палеовой лягушки *Rana berlandieri* [Goraya *et al.*, 2000], леопардовой лягушки *Rana pipiens* [Goraya *et al.*, 2000], сенегальской кассины *Kassina senegalensis* [Mattute *et al.*, 2000], лягушки-крикуны *Rana clamitans* [Halverson *et al.*, 2000], свиной лягушки *Rana grylio* [Kim *et al.*, 2000], чернопятнистой (китайской водяной) лягушки *Rana nigromaculata* [Park *et al.*, 2001], удивительной лягушки (гвианской водяной жабы) *Pseudis paradoxa* [Olson *et al.*, 2001], когтистой (тропической) шпорцевой лягушки *Xenopus tropicalis* [Ali *et al.*, 2001], пятнистобрюхой лягушки *Rana ornativentris* [Kim *et al.*, 2001], малой бурой лягушки *Rana tagoi* [Conlon *et al.*, 2003], желтоногой лягушки *Rana boylii* [Conlon *et al.*, 2003], желтоточечной квакши *Hyla punctata* [Prates *et al.*, 2004] и др. Пептиды-антимикотики образуются также в пищеварительном тракте амфибий. Например, в желудке дальневосточной (серой) жабы

Bufo bufo gargarizans при расщеплении пепсином гистона H2A высвобождается буфорин I [Kim *et al.*, 2000]; в эпителии желудка шпорцевой лягушки были обнаружены магайнины [Mooge *et al.*, 1991].

Противогрибковые соединения образуются в организме рыб. Примером могут служить пептиды из камбаловых рыб (зимней (американской) камбалы *Pseudopleuronectes americanus*, желтохвостой камбалы *Pleuronectes ferruginea*, западноатлантической палтусовидной камбалы *Hippoglossoides platessoides*, красной (атлантической длинной) камбалы *Glyptocephalus cynoglossus*, атлантического палтуса *Hippoglossus hippoglossus*), которые обладают противогрибковой (*Candida albicans*) активностью [Patrzykat *et al.*, 2003]. Пептид мисгуриин из амурского вьюна *Misgurnus anguillicaudatus* подавляет рост *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* [Park *et al.*, 1997]. Из жабер и кожных покровов гибрида белого американского окуня *Morone chrysops* и полосатого лаврака *Morone saxatilis* выделен мороненидин - пептид широкого спектра действия (*Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida lusitania*, *Candida tropicalis*) [Lauth *et al.*, 2002]. На слизистой кожных покровов амурского (дальневосточного) сома *Parasilurus asotus* из гистона H2A под действием катепсина D образуется антимикробный белок парасин I, активный в отношении *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida albicans* [Park *et al.*, 1998].

Антимикробные пептиды, выделенные из насекомых, также обладают противогрибковой активностью. Синтетический пептид, соответствующий 20 N-концевым остаткам пилосулина I (цитотоксического пептида из яда черного муравья-бульдога *Myrmecia pilosula*), обладает активностью в отношении *Candida albicans* [Zelezetsky *et al.*, 2005]. Три гомологичных пептида (степень идентичности последовательностей более 80%) - Alo-1, Alo-2 и Alo-3 - из бразильского длинноногого арлекина *Acrocisus longimanus* подавляют *Candida glabrata* [Barbault *et al.*, 2003]. Гелиомицин, дефенсиноподобный пептид из табачной совки *Heliothis virescens*, активен в отношении *Candida albicans* и *Pichia pastoris* [Thevissen *et al.*, 2004]. Из гемолимфы гусениц бабочки *Archeoprepona demophoon* выделен пептид ARD1, отличающийся от гелиомицина по двум остаткам, но более эффективный в отношении *Aspergillus fumigatus* и *Candida albicans*. Сайт-направленный мутагенез ARD1 либо в катионных, либо в гидрофобных участках, позволил синтезировать еще более активные противогрибковые соединения - пептиды ETD-135 и ETD-151 [Landon *et al.*, 2004]. Цекропины A и B из гемолимфы куколок гигантского шелкопряда *Hyalopora cecropia* подавляют рост *Candida albicans* [Andra *et al.*, 2001]. Противогрибковой активностью обладает пептид из сапедина B - антибактериального белка серой мясной мухи *Sarcophaga peregrina* [Yamada & Natori, 1994]. На основе последовательности кДНК цекропина A из гусеницы американской белой бабочки *Hyphantria cunea* был синтезирован пептид из 35 остатков, активный в

отношении *Candida* [Park et al., 1997]. Широкий спектр противогрибковой активности (*Nectria haematococca*, *Neurospora crassa*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*) имеют пептиды термидин и спинигерин из термита *Pseudacanthotermes spiniger* [Lamberty et al., 2001]. Голотрицин 3, подавляющий рост *C. albicans*, был очищен из гемолимфы личинок черного дальневосточного хруща *Holotrichia diomphalia* [Lee et al., 1995]. Антимикробный пептид, соответствующий С-концевому -складчатому домену тенецина 1, антибактериального белка личинок большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*, обладает противогрибковой активностью [Lee et al., 1998]. Танатин, продуцируемый клопом *Podisus maculiventris*, активен в отношении двух патогенных для человека видов - *Aspergillus fumigatus* и *Trichophyton mentagrophytes*, а также целого ряда других видов: *Neurospora crassa*, *Botrytis cinerea*, *Nectria haematococca*, *Trichoderma viride*, *Alternaria brassicola*, *Fusarium culmorum*, *Ascochyta pisi*, *Fusarium oxysporum* [Fehlbaum et al., 1996]. Противогрибковой активностью обладают также галлеримицин из личинок большой пчелиной огневки *Galleria mellonella* и дрозомицин из плодовой мушки *Drosophila melanogaster* [Schuhmann et al., 2003].

Некоторые противогрибковые пептиды синтезируются в организме арахнид — пауков и скорпионов. Например, гомезин из гемоцитов южноамериканского паука-птицеяда *Acanthoscurria gomesiana* обладает активностью в отношении многих видов грибов и дрожжей, в том числе *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* [Silva et al., 2000]. Из ядовитых желез каролинского тарантула *Lycosa carolinensis* и южнорусского тарантула *Lycosa singoriensis* выделены антимикробные пептиды — соответственно ликотоксины и ликоцитины, обладающие активностью в отношении *Candida glabrata* и *Candida albicans* [Yan & Adams, 1998; Budnik et al., 2004]. Пандинин 2, пептид из яда гигантского лесного скорпиона *Pandinus imperator*, подавляет *Candida albicans* [Corzo et al., 2001]. Пептиды опистопорин 1 и парабутопорин из яда южноафриканских видов скорпионов *Opisththalmus carinatus* и *Parabuthus schlechteri* активны в отношении *Neurospora crassa*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Saccharomyces cerevisiae* [Moerman et al., 2002]. Противогрибковой активностью обладают также андроктонин из яда желтого толстохвостого скорпиона *Androctonus australis* [Mandard et al., 1999].

Приведенные данные свидетельствуют, что антимикробные пептиды синтезируются в организме практически всех типов животных. Учитывая ряд важных свойств (широкий спектр антимикробной активности, ограниченная иммуногенность, устойчивость к протеолизу), можно рассматривать данные соединения как перспективную группу противогрибковых лекарственных средств.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРОМИЦЕТОВ К НЕКОТОРЫМ АЗОЛОВЫМ ПРЕПАРАТАМ

Васильева Н.В., Выборнова И.В., Елинов Н.П., Михайлова М.А.
 НИИ медицинской микологии имени П.Н. Кашкина, СПб МАПО
 Санкт-Петербург

Изучена чувствительность ряда дрожжевых и нитчатых грибов к избранным лекарственным препаратам из группы бис-триазолов. Определение чувствительности тест-культур проводили макро-методом серийных разведений согласно ГФ XI (дополнение 2, 2001). Лекарственные препараты испытывали в отношении заведомо чувствительных и резистентных штаммов микромицетов, выделенных от соответствующих пациентов или, в некоторых случаях, взятых из коллекции музейных штаммов. Из лекарственных средств применяли итраконазол в форме разрешенных к применению в России препаратов «орунгал» и «румико-коз». Контролями служили индивидуальные субстанции итраконазола. Из питательных сред использовали жидкую среду Сабуро и среду RPMI 1640, предложенную Американским национальным комитетом по клиническому и лабораторным стандартам (NCCLS).

На обеих средах тест-культуры выражено различалась по чувствительности к испытываемым препаратам.

Сравнительная кратность возрастания противогрибкового эффекта итраконазола на среде Сабуро

Тест-культуры (штаммы КРИММ-ВКПГ _Р)	Активность, МПК (мкг/мл), макрометод серийных разведений					
	Итраконазол-субстанция		«румико-коз»		«орунгал»	
	1,М	2,В	1,М	2,В	1,М	2,В
<i>Asperg. fumigatus</i> 1217	3,14	6,25	3,14	1,57	6,25	3,14 3,14
<i>Microsporum canis</i> 1208	1,57	0,78	0,2	0,39	1,57	1,57
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 1207	1,57	1,57	0,39	0,39	3,14	1,57
<i>Trichophyton rubrum</i> 350	0,78	0,78	0,2	0,2	1,57	1,57

Как следует из таблицы 1 румико-коз был активнее итраконазола-субстанции и несколько активнее орунгала. Из четырёх культур самой чувствительной ко всем испытываемым лекарственным средствам оказалась культура красного трихофитона 350, менее чувствительным оказался дымчатый аспергилл 1217.

На среде RPMI 1640 тест-культуры могли существенно различаться по результатам титрования применительно к одному виду или штамму. Например, румикоз и орунгал были равно активны в отношении штамма РКПГУ 1029/13 *Candida albicans* на данной среде (в концентрации 0,25 мкг/мл), тогда как на среде Сабуро развитие данного вида и штамма тормозилось при концентрациях 32-64 мкг/мл. Сходные результаты были получены и *C. glabrata* (штамм РПГУ 1188/1062). Штаммы *C. tropicalis* РКПГУ 560/2303 и *C. parapsilosis* РКПГУ 1179П были высоко чувствительными к обоим препаратам.

“Поведение” *C. krusei* (штамм РКПГ Y 1198) на среде Сабуро и среде RPMI 1640 было прямо противоположным - на среде Сабуро он был более чувствительным к румикозу и орунгалу более, чем в 8 раз, тогда как во столько же раз менее чувствительным - на среде RPMI - 1640.

Контрольные субстанции итраконазола могут также различаться по активности против тест-микробов. в зависимости от серии. (в нашем случае - в 2 и более раза).

Из тест-микроспоридий, относящихся к дерматомицетам, наиболее чувствительными к румикозу и орунгалу оказались трихофитоны и, прежде всего, *T. rubrum*, несколько менее чувствительны штаммы микроспоридий. Исходно резистентные виды и штаммы *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium* species, *Geotrichum* species, *Trichosporon beigeli*, *Aspergillus flavus*, *A. niger* и некоторые другие оставались устойчивыми к избранным азоловым лекарственным средствам.

Таким образом, «румикоз» проявил повышенную активность против изученных патогенных и условно патогенных грибов в диапазоне от 1,2 раза до 33 раз в сравнении с субстанциями “Итраконазол” (в двух сериях).

В одинаковых условиях проведения испытаний «румикоза» и «орунгала» оба препарата оказались эффективными против чувствительных микроспоридий, однако общая тенденция повышенной активности против микроспоридий-патогенов сохранялась более выражено у «румикоза» равно активным с орунгалом. На среде RPMI 1640 «румикоз» и «орунгал» проявили примерно равную активность в отношении избранных тест-штаммов грибов.

Штаммы патогенных грибов, резистентные к итраконазолу-субстанции остаются более чувствительными к румикозу. В практике использования «румикоза» (равно как и других химиотерапевтических средств) необходимо учитывать особенности штаммов микроспоридий - возбудителей микозов или испытываемых культур для оценки их чувствительности к препарату (-ам), а подбору питательных сред для этих целей необходимо уделить особое внимание.

АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МАЗИ НА ОСНОВЕ НОВОГО АМИНОПРОИЗВОДНОГО АДАМАНТАНА

Врынчану Н.А.

Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины
Киев, Украина

В настоящее время отмечается увеличение количества заболеваний, обусловленных грибами. Этому способствует нерациональное использование антибиотиков широкого спектра действия, гормонов, препаратов, оказывающих иммунодепрессивное действие и т.д.

Грибковая патология часто возникает у больных сахарным диабетом, ВИЧ-инфицированных, у людей, перенесших трансплантацию органов. Одно из ведущих мест при этом принадлежит грибам рода *Candida*. Исследования, проведенные в 34 медицинских центрах США, Канады и Латинской Америки, показали, что из 654 случаев кандидоза – 54,3 % были обусловлены *C. albicans*, 16,4% – *C. glabrata*, 14,9 % – *C. parapsilosis*, 8,2 % – *C. tropicalis*, 1,6 % – *C. krusei*, 4,6 % – другими видами грибов (Н.П. Елинов, 2000).

Для лечения кандидозов в медицинской практике применяются препараты различных химических классов – полиены, азолы, эхинокандины и др.

Несмотря на значительное количество антифунгальных средств, проблема профилактики и лечения кандидозов еще далека от разрешения. Одна из основных причин недостаточной эффективности препаратов – возникновение резистентных штаммов микроорганизмов.

В ранее проведенных нами исследованиях была установлена антимикробная активность у нового производного аминоадамантила-4-(1-адамантил)-1-(1-аминобутил) бензола (АМ-166) в отношении бактерий и грибов. Соединение АМ-166 ингибирует рост и размножение грамположительных и грамотрицательных бактерий, дерматомицетов, дрожжеподобных, плесневых и других видов грибов.

На основе соединения АМ-166 разработана 0,1% мазь на гидрофильной основе для лечения поражений кожи и мягких тканей бактериального и грибкового генеза.

Цель настоящей работы - изучение антифунгальных свойств мази на основе нового производного аминоадамантила в отношении *C. albicans* NTCC 885/653; *C. glabrata* УКМу – 2383; *C. parapsilosis* УКМу - 73; *C. krusei* УКМу – 61 в сравнении с клотримазолом (1% мазь) и мирамистином (0,5 % мазь).

Противогрибковые свойства мази изучены *in vitro* в плотной питательной среде Сабуро методом лунок, в которые вносили по 100 мг мази. Посевная доза составляла 10⁶ грибных элементов на 1 мл среды.

Проведенные исследования показали, что зоны задержки роста микроорганизмов при действии 0,1% мази на основе аминопроизводного адамантана составляют по отношению к *C. albicans* — $36 \pm 0,8$ мм, *C. glabrata* — 27 мм, *C. parapsilosis* — $21 \pm 0,5$ мм, *C. krusei* — $24 \pm 0,5$ мм. В этом плане экспериментальная мазь не уступает препаратам сравнения - 1% мази клотримазол (зона задержки роста по отношению к *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* составляет $37 \pm 0,7$ мм, $27 \pm 0,5$ мм, $20 \pm 0,5$ мм и $23 \pm 0,6$ мм соответственно) и 0,5% мирамистина (зоны задержки роста микроорганизмов составляют $34 \pm 0,8$ мм, $24 \pm 0,6$ мм, $14 \pm 0,4$ мм и $18 \pm 0,5$ мм соответственно).

Следовательно, изучаемая мазь обладает широким спектром антигрибкового действия с достаточно выраженной активностью.

КАНДИДАЦИДНЫЙ ЭФФЕКТ НЕКОГЕРЕНТНОГО ИМПУЛЬСНОГО СВЕТА

Иванова И.П., Заславская М.И.

*Нижегородская государственная медицинская академия
Нижний Новгород*

Изучен кандидацидный эффект некогерентного импульсного света, а также функциональное состояние нейтрофилов крови и уровень перекисного окисления липидов плазмы у крыс в норме и с оральным кандидозом после воздействия некогерентным импульсным светом видимого диапазона (НКИ).

В нашей работе были изучены фунгицидные свойства некогерентного импульсного света (80, 40, 20, 5 импульсов) (НКИ). Исследовалось воздействие на инокулят дрожжеподобных грибов *Candida albicans*. Штамм 601 (*C. albicans*) содержал $1 \cdot 10^3$ кл/мл. Культуры были взяты из коллекции кафедры микробиологии и иммунологии НГМА.

Полученную суспензию микроорганизмов разливали в полипропиленовые микропробирки по 1 мл. Пробы подвергали воздействию НКИ. Контролем служила интактная культура микроорганизмов (без воздействия). После облучения из контрольной (интактной) и экспериментальных проб готовили серию 10-ти кратных разведений на ЗФР. Делали высеив из каждого разведения (по 0,1 мл) на плотные среды в чашки Петри. *C. albicans* выращивали на селективных средах Сабуро. Культуры инкубировали в термостате (24 ч, 37° С). Подсчитывали количество КОЕ (колониеобразующих единиц) на каждой чашке.

В эксперименте использовали белых беспородных крыс самцов массой 200 - 250 грамм. Животных заражали перорально суспензией *C. albicans* штамм 601 (0,1 мл, $5 \cdot 10^7$ кл/мл). Через 1 час после микробной инокуляции, слизистую ротовой полости крыс подвергали воздей-

ствием импульсным светом в режиме: 100 импульсов (1 группа) или 300 импульсов (2 группа). Через 24 часа животных 1-й и 2-й групп вновь подвергали воздействию НКИ: 100 и 300 импульсов соответственно. Контролем служили интактные крысы; животные, подвергавшиеся однократному облучению в режиме 100 или 300 имп, а также крысы с оральным кандидозом, не подвергавшиеся облучению. Каждая группа включала 7 животных. Через 6 суток после заражения /облучения животных декапитировали под эфирным наркозом, кровь отбирали в гепаринизированную посуду.

О реактивных изменениях нейтрофилов судили по показателям метаболической перестройки клеток, фиксируемой методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ). ХЛ нейтрофилов крови измеряли в имп/мин на жидкостно-стинцилляционном счетчике «Бета-1» (КПО «Медаппаратура», Украина).

Уровень процессов ПОЛ сыворотки крови оценивали методом хемилюминесценции. Интенсивность ПОЛ определяли по значению светосуммы ХЛ за 60 с.

Результаты фунгицидной активности некогерентного светового импульсного света на грибковую микрофлору; некогерентное световое излучение в режимах 80, 40, 20 импульсов. В то же время фунгицидный эффект носил дозозависимый характер. Так, наиболее интенсивное НКИ в режиме 80имп обладало фунгицидным эффектом на взвесь *Candida albicans* в начальной концентрации 10^3 . При снижении мощности биоцидный эффект снижался, что проявлялось в сохранении жизнеспособности части грибковых клеток. Меньший эффект излучений НКИ в режимах 40 и 20 импульсов, полученный в отношении *Candida albicans*, связан, по-видимому, с протективными свойствами многослойной и ригидной клеточной стенки, характерной для всех грибов.

В настоящее время нейтрофилы рассматриваются не только как инструмент противоинфекционного иммунитета, но и как универсальный эффектор и индикатор гомеостаза. Кроме того, полагают, что фагоциты и, в частности, нейтрофилы, играют ведущую роль в антикандидозной защите организма. Другим интегральным критерием гомеостаза и его нарушений может служить уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), отражающий активность свободнорадикальных процессов в тканях.

Существенное повышение сХЛ нейтрофилов у крыс с оральным кандидозом, по сравнению с интактными, свидетельствовало о наличии инфекционного процесса у животных. В то же время, показатели сХЛ у зараженных животных, облученных в режимах: 100 и 300 импульсов были существенно ниже, чем в аналогичной группе, не подвергавшейся воздействию НКИ. Поскольку сХЛ отражает реактивные сдвиги нейтрофилов непосредственно в организме, то снижение сХЛ у животных с кандидозом, после воздействия НКИ, указывало на положительную тенденцию к стабилизации состояния фагоцитов.

Показатели иХЛ практически не отличались друг от друга во всех группах животных, поэтому для характеристики функционального резерва фагоцитов был введен индекс реактивности (ИР): соотношение между показателями иХЛ и сХЛ.

ИР нейтрофилов значительно снижался на фоне экспериментального кандидоза, а функциональный резерв клеток восстанавливался до контрольных показателей (нормы) только после воздействия НКИ в режиме 300 импульсов.

Уровень ПОЛ плазмы несущественно повышался на фоне экспериментального кандидоза, и наблюдалась незначительная тенденция к снижению показателей до исходного уровня (контроля) на фоне действия НКИ.

Таким образом, некогерентное световое излучение в режиме 80 импульсов имеет абсолютный стопроцентный фунгицидный эффект, в дозе 40 импульсов 95% фунгицидный эффект и в режиме 20 импульсов 30% фунгицидный эффект. НКИ в режиме 20 импульсов стабилизирует состояние нейтрофилов и увеличивает функциональный резерв фагоцитов у инфицированных крыс НКИ (100 или 300 импульсов) не оказывали существенного влияния на состояние нейтрофилов, индекс реактивности фагоцитов и ПОЛ плазмы крови у здоровых (незараженных) животных.

Показано, что некогерентное импульсное излучение обладает 100% фунгицидным эффектом в режиме 80 импульсов, коронный разряд наносекундной длительности не обладает выраженным бактерицидным и фунгицидным действием. И не изменяет реактивные параметры клеток здоровых животных.

МЕХАНИЗМ ФУНГИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ НЕКОГЕРЕНТНОГО ИМПУЛЬСНОГО СВЕТА

Иванова И.П.

*Нижегородская государственная медицинская академия
Нижний Новгород*

Кандидоз слизистых оболочек является одной из самых распространенных оппортунистических инфекций. В то же время, влияние импульсных воздействий электромагнитной природы на кандиды, адгезированные на слизистой оболочке в системе *in vivo*, а также на макроорганизмы *in vitro*, изучено не достаточно. Биологические эффекты некогерентного светового излучения реализуются через эндогенные первичные акцепторы излучения. Универсальным фотоакцептором, содержащимся в значительных концентрациях во всех аэробных биологических системах, является молекулярный кислород. Генерация

высокоактивного синглетного кислорода вызывается за счет проникновения в субстрат светового излучения с диапазоном волн 200 - 1000 нм. Образовавшиеся активные формы кислорода стимулируют каскад свободно - радикальных реакций. Это приводит к повреждению мембран продуктами перекисного окисления липидов, В связи с этим, некогерентное световое излучение (НСИ), обладающие мощными окислительными свойствами, может быть использовано как фунгицидное средство.

Целью работы было изучение механизма фунгицидного действия некогерентного импульсного света (НКИ). Работа была выполнена в два этапа, первоначально *in vivo*, а затем и *in vitro*.

В эксперименте *in vivo* использовали 18 беспородных крыс-самцов весом 150-200 г. Под эфирным наркозом крысам обрабатывали ротовую полость взвесью *Candida albicans* штамм 601(0,1 мл, $5 \cdot 10^7$ кл/мл) из коллекции кафедры микробиологии и иммунологии НГМА. Животных разбивали на 3 группы по 6 животных: контрольную и 2 экспериментальные. Ротовую полость крыс подвергали двукратному воздействию некогерентным светом по следующей схеме: 1. контрольная группа - отсутствие воздействия после заражения 2. 1-ая экспериментальная группа: через 1 час после заражения- 2,5 минуты и через 1 сутки после заражения - 5 минут. 3. 2-ая экспериментальная группа: через 1 час после заражения- 5 минут и через 1 сутки после заражения - 10 минут.

Через 4 суток после заражения проводили тест на кандидоносительство, ротовую полость промывали 0, 2 мл стерильного забуференного физиологического раствора, смыв помещали в пробирки с 0, 8 мл ЗФР (конечный объем 1 мл). Из пробирок 0, 1 мл отбирали и переносили на скошенный агар Сабуро (скос дважды обмывали жидкостью для анализа). Посевы термостатировали (24ч, 37°C), просматривали скосы для обнаружения кандид в материале для анализа по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ).

У всех групп крыс кандиды присутствовали в ротовой полости. По результатам посева отмечено значительное (в 6 раз) снижение количества колониеобразующих единиц (КОЕ). Данный феномен был более выражен в экспериментальной группе после меньшего воздействия в течение 5 минут. При увеличении времени экспозиции фунгицидный эффект был в 3 раза ниже. По всей вероятности, увеличение времени экспозиции, влечет за собой и увеличение количества свободных радикалов, которые нарабатываются во время генерации света. Увеличение количества свободно радикальных агентов провоцирует и их рекомбинацию.

На втором этапе экспериментах *in vitro* суспензию микроорганизмов *Candida albicans* штамм 601(0,1 мл, $5 \cdot 10^7$ кл/мл) разливали в полипропиленовые микропробирки по 1 мл. Пробы подвергали воздействию НКИ в течение 2.5 и 5 минут. Контролем служила интактная культура микроорганизмов (без воздействия). После обработки экспериментальных проб проводили исследование процессов перекисного окисления

липидов методом индуцированной хемилюминесценции (ХЛ). Метод ХЛ является адекватной моделью изучения свободно радикальных и перекисных процессов.

Известно, что во время генерации импульсных напряжений за счет высокой напряженности электромагнитного поля нарабатывается большое количество электронов, имеющих высокую энергию. Их взаимодействие с воздушной средой и биологическими субстратами приводит к образованию активных форм кислорода, которые первыми участвуют в цепи реакций клеточного метаболизма. В субстрате накапливаются активные формы кислорода, стимулирующие каскад свободнорадикальных реакций (СР), которые в свою очередь активируют перекисное окисление липидов (ПОЛ).

Показано, что после обработки клеточной взвеси импульсным светом в течение 2,5 минут, ХЛ была 25,44 мВ. После обработки в течение 5 минут ХЛ суспензии кандид была на 1-2% ниже, чем в контроле. Таким образом, активация СРО наиболее выражена при обработке клеточной взвеси НКИ в меньшей экспозиции. При обработке электромагнитным фактором идет активация ПОЛ, образование гидроперекисей, изменяется гидрофобность липидного бислоя в котором образуются гидрофильные поры. В результате нарушаются барьерные свойства мембраны, она становится проницаемой. ПОЛ инициируемое некогерентным импульсным светом повреждает клеточные компоненты микроорганизмов и вызывает деструкцию клеточных мембран.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ МИРАМИСТИНА ГЕЛЯ «МИТРИПАН» В ДЕРМАТОЛОГИИ

*Кириченко И.М., Молочков В.А.,
Воробьев А.А., Кириченко Н.А., Рудько А.П.,
Свистов В.В., Кривошеина Ю.С.*

*Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова, кафедра
кожных и венерических болезней ФППОВ, кафедра микробиологии*

Гнойно-воспалительные заболевания наружных покровов - одна из наиболее актуальных проблем современной медицины. Они возникают при нарушении целостности кожи и слизистых в результате механических, температурных, химических воздействий, а также эндогенной инфекции на фоне снижения защитных реакций организма. В большинстве случаев инфекционный процесс вызывается микробами, относящимися к различным таксономическим группам, причем, как

правило, не монокультурами, а микробными ассоциациями бактерий, грибов и вирусов.

Для лечения этих патологических процессов требуется использование комплекса лекарственных средств, эффективных в отношении различных микроорганизмов или же препаратов с широким спектром антимикробного действия, а также средств регулирующих иммунологическую реактивность организма. Особую значимость имеют препараты местного применения (мази, гели, аэрозоли и др.), позволяющие создать высокую концентрацию лекарственного вещества в очаге поражения, очистить пораженную поверхность от экссудата, избежав при этом побочных реакций, возникающих при воздействии лекарства на весь организм.

Медико-биологические требования к этим препаратам обусловлены их назначением, способом применения, формой и стадией патологического процесса, состоянием организма. Наиболее широко применяемые в настоящее время мази на ланолин-вазелиновой основе не всегда удовлетворяют требования современной медицины. Анализ литературы показывает, что наиболее перспективными являются препараты для местного использования, в состав которых входят антисептики, а также гидрофильные основы.

Применяемые в настоящее время лекарственные препараты для местного лечения заболеваний кожи проявляют ряд недостатков, к числу которых следует отнести:

- 1) возникновение аллергических реакций в случае индивидуальной повышенной чувствительности к левомицетину («Левомеколь», «Левосин»);
- 2) возникновение токсических реакций в случае индивидуальной непереносимости к диоксидину и сульфаниламидным препаратам и нитазолу («Диоксиколь», «Стрептонитол», «Нитацид»);
- 3) реинфицирование из-за узкого антимикробного спектра действия («Левомеколь», «Левосин», «Метрокаин», «Сульфамеколь»);
- 4) обезвоживание и нарушение грануляционной ткани, обусловленное высоким осмотическим действием основы («Левомеколь», «Левосин», «Диоксиколь»);
- 5) малая эффективность при лечении заболеваний, вызванных ассоциациями патогенных грибов и бактерий.

Нами разработан новый препарат гель «Митрипан» для лечения и профилактики гнойно-воспалительные заболевания наружных покровов грибковой и бактериальной этиологии (Состав с антисептическими, репаративными и болеутоляющими свойствами. Патент РФ № 21-77314 от 22.03. 2000).

Основным действующим началом препарата «Митрипан» является отечественный антисептик мирамистин, обладающий широким спектром антимикробного действия, а также иммуномодулирующими свойствами (Мирамистин, под ред. Ю.С. Кривошеина, М., МИА, 2004, 155

с.). Для придания препарату «Митрипан» анестезирующих и усиливающих репаративное действие свойств в его состав на гидрофильной основе дополнительно введен тримекаин, а также D-пантенол в специально подобранных для этих целей концентрациях.

Изучение осмотического действия «Митрипана» по сравнению с препаратами «Мирамистин-Дарница», «Левомеколь» и «Левосин» показало, что его абсорбционная активность на 20% ниже. Это обусловлено особенностью состава его основы, обладающей способностью удерживать влагу и не обезвоживать ткани.

Исследование антимикробных свойств препарата «Митрипан» методом колодцев по стандартной методике в отношении тест-культур музейных референс-штаммов из коллекции ГИСК имени Тарасевича, а также диких штаммов бактерий и грибов, показало, что «Митрипан» обладает более выраженными антимикробными свойствами, чем препараты сравнения (табл.). Наблюдаемые различия в активности мазей «Мирамистин-Дарница» и «Митрипан», как нами показано, обусловлено присутствием тримекаина, который усиливает антимикробные свойства мирамистина, входящего в состав «Митрипана». Это также подтверждается литературными данными, указывающими на то, что анестетики в составе полимерных основ способствуют высвобождению и всасыванию антисептиков.

Таблица

Сравнительная антибактериальная активность препарата «Митрипан» и официальных мазей, используемых в дерматологии

Вид тест-культуры микроорганизма	Зона задержки роста тест-культуры (мм)			
	Название препарата			
	Митрипан	Мирамистин-Дарница	Клотримазол	Левосин
<i>Staphylococcus aureus</i>	30,6+3,8	29,8+2,9	рост	26,4+2,7
<i>Escherichia coli</i>	29,4+2,8	28,6+2,8	рост	22,2+2,4
<i>Proteus vulgaris</i>	24,8+2,8	21,8+3,2	рост	24,8+2,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23,2+2,2	22,6+2,2	рост	23,2+2,1
<i>Candida albicans</i>	30,8+3,2	29,8+3,0	24,6+ 2,02	рост
<i>Microsporum lanosum</i>	30,4+3,2	29,6+2,6	24,0+2,0	рост
<i>Trichophyton rubrum</i>	29,8+2,6	28,4+2,4	рост	рост

Таким образом, гель «Митрипан» обладает выраженной антибактериальной и антифунгальной активностью в отношении основных штаммов патогенных бактерий и грибов, вызывающих гнойно-воспалительные процессы кожных покровов, и имеет преимущество по антимикробным свойствам по сравнению с официальными аналогами.

Изучение антифунгальной лечебной эффективности «Митрипана» на модели кандидоза и трихофитии у морских свинок показали его высокую эффективность при лечении экспериментальных микозов, вызванных у животных *C. albicans* и *T. rubrum*. «Митрипан» превосходит по своей антифунгальной активности мазь «Клотримазол», препарат рекомендованный для лечения грибковых заболеваний.

На основании полученных экспериментальных данных можно предположить о перспективности проведения дальнейших исследований новой лекарственной формы мирамистина геля «Митрипан» с целью использования его в дерматологии.

МИРАМИСТИН – ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ АНТИСЕПТИК ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ (СТРАТЕГИЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ МИРАМИСТИНА ДЛЯ ДЕРМАТОЛОГИИ)

Кривошеин Ю.С., Рудько А.П., Свистов В.В., Смирнов И.В.
ЗАО «Инфамед»
Москва

Широкий спектр антимикробных свойств антисептика мирамистина, низкая токсичность, отсутствие аллергизирующего и раздражающего действия на кожу и слизистые оболочки дало возможность на его основе создать лекарственные формы для наружного применения, а также для введения интратрахеально, в уретру, влагалище, носоглотку, брюшную полость и на конъюнктиву глаза. Они успешно используются для лечения и профилактики гнойно-воспалительных процессов, вызванных грибами, бактериями, вирусами.

Многолетний опыт применения препаратов мирамистина (растворы, мази, гели) для лечения больных с микозами стоп и крупных складок кожи, кандидомикозом кожи и слизистых, микроспорией гладкой кожи, онихомикозом и кератомикозом, отрубевидным лишаем, кандидозом полости рта и другими микозами показал, что препараты мирамистина самостоятельно, а также включенные в комплексное лечение больных с грибковыми поражениями кожи и слизистых, позволяют достичь более чем в 95% случаев положительного клинического эффекта, а элиминации возбудителя - в 75%. Препараты мирамистина рекомендуется применять в остром периоде заболевания, а также в случае осложнения микоза экзематизацией и вторичной бактериальной инфекцией.

Многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями показано, что наблюдаемый положительный клинический

эффект при применении препаратов мирамистина в лекарственных формах раствор, мази, гель, аэрозоль, суппозитории, клей, глазные капли для лечения и профилактики гнойно-воспалительных заболеваний различной этиологии и локализации обусловлен широкими антимикотическими и антибактериальными свойствами (Кривошеин Ю.С., 1985, Арзуманян В.Г., 2002), а также модулирующим дозозависимым действием мирамистина на местные клеточные факторы иммунитета, нормализацией в процессе лечения показателей Т-клеточного звена иммунитета (Шатров В.А., 1992). Это позволяет оказывать этиопатогенетическое воздействие на различных этапах лечения микозов.

Доказано, что мирамистин:

1. Обладает синергидным действием на антибиотики и другие антимикробные средства, снижая устойчивость к ним бактерий и грибов.
2. Стимулирует местные иммунные реакции в очаге за счёт усиления поглотительной и переваривающей активности фагоцитов. Потенцирует активность моноцитарно-макрофагальной системы уретры и легких, а также стимулирует тималин-зависимую пролиферативную активность бронхиального эпителия.
3. Усиливает регенераторные процессы и репаративную активность в ране.
4. Обладает выраженным противовоспалительным действием.
5. Активизирует процессы фибринолиза в очаге воспаления.
6. Нормализует процессы перекисного окисления липидов при эндобронхиальном ведении препарата у больных с лёгочной патологией.
7. Не влияет на транспортную функцию мерцательного эпителия верхних дыхательных путей, нормализует у больных мукоцилиарный клиренс.
8. Водным растворам мирамистина (0,01% раствор, Дезмистин-0,1%), а также спиртовым растворам (Мирамистин-ОП – 0,5%, Мирамидез-0,1%) присущи выраженные моющие свойства, что играет важную роль в профилактических мероприятиях.
9. Мазевые лекарственные формы мирамистина (Мирамистин-Дарница, тримистин, пантестин, митрипан и др.) обладают гиперосмолярной активностью, купируют раневое и перифокальное воспаление, поглощают гнойный экссудат, способствуя формированию сухого струпа. При этом не повреждаются грануляции и жизнеспособные клетки кожи, не угнетается краевая эпителизация.

На основе мирамистина разработано 16 лекарственных форм, 10 из которых разрешены к выпуску, остальные находятся на различных этапах клинических и доклинических испытаний. Препараты представляют собой водный и спиртовой растворы, мази, гели, свечи, аэрозоль, клей, антисептические таблетки и салфетки, они защищены патентами. Препараты, содержащие мирамистин, нашли применение для лечения и профилактики гнойно-воспалительных процессов грибковой, бактериальной и вирусной этиологии в дерматологии и венерологии, хирур-

гии и травматологии, акушерстве и гинекологии, оториноларингологии, офтальмологии, комбустиологии, урологии, стоматологии.

Разработаны ряд программ по широкомасштабному использованию препаратов мирамистина для лечения и профилактики пролежней и трофических язв (Московская благотворительная программа № 131), воспалительных заболеваний половых органов у женщин репродуктивного возраста и др.

Налажено массовое производство препаратов мирамистина, они находятся в свободной продаже в аптечной сети.

БАЦИЛЛЯРНЫЕ ШТАММЫ С ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ЗАЩИТЫ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ

*Миненкова И.Б., Николаенко М.А., Азизбеян Р.Р.
ФГУП ГосНИИгенетика
Москва*

К концу XX-го века благодаря химизации, механизации и мелиорации плодородных земель значительно ухудшилось их состояние и плодородие и, как следствие, качество воды и воздуха. Особенную озабоченность вызывает и качество самой агропромышленной продукции, что приводит к постоянному ухудшению здоровья ее потребителей – людей. Не исключено, что постоянное увеличение аллергиков в различных странах может быть связано с плохим качеством пищи, воды и воздуха. В настоящее время продолжают процессы истощения плодородных земель и падение урожайности основных культурных растений (картошка, свекла, зерновые, подсолнечник, томаты, хлопчатник и т.д.). Одновременно происходит усиление инфекционного фона земель: почва на 40-50% заражена фитопатогенами, что приводит к различным поражениям культурных растений на всех стадиях роста; потери урожайности и хранение урожая (30-40%). Программа РФ «Повышение плодородия почв России на 2002-2005 гг.» от 8 ноября 2001 г. направлена на укрепление продовольственной независимости страны за счет решения задачи устойчивого АПК (широкое внедрение биотехнологии, замена химических пестицидов биологическими и т.д.). Экологизация АПК России включает сельское хозяйство и производство продуктов питания и должна обусловить национальную безопасность страны. Уже сегодня отечественная биотехнология предлагает широкий спектр биопестицидов для повышения плодородия почв и растений, защиты культурных растений от болезней и сохранность урожая. Для решения этих задач часто используются бациллярные штаммы – естественные непатогенные обитатели почвы. Из природных почвенных изолятов различных климато-географических регионов России выделено 120 новых бациллярных штаммов,

которые проверяли на видовую специфичность, фунгицидную активность и спектр антигрибного действия. Во всех выделенных нами почвенных изолятах доминировали *Bac.subtilis* (40-45%), *Bac.polymyxa* (20%), акристаллические штаммы *Bac.thuringiensis* (10%) и единичные представители *Bac.pumilis*, *Bac.laterosporus* и *Bac.brevis*. Фунгицидную активность штаммов проверяли методом лунок в различных разведениях на основных возбудителях заболеваний растений *Fusarium solani*, *F.graminearum*, *F.nivalae*, *Phoma solanicola*, *Rizoctonia solani*, *Alternaria tenuis* и смешанной грибной инфекции (фузариозно-фомозная). Полученные данные позволили отобрать два эффективных штамма с повышенной фунгицидной активностью – *Bac.subtilis* 110 и *Bac.laterosporus* 01. Оба штамма образовывали споры и не образовывали кристаллы. По широте спектра антигрибного действия был выбран один штамм-*Bac.subtilis*, на основе которого возможно создание нового биофунгицида широкого действия для защиты основных культурных растений. Проводились предварительные испытания нового штамма для защиты картофеля в лабораторных условиях. При обработке растений картофеля на стадии вегетации (путем орошения-полива) увеличивалась средняя масса клубней, показатели среднего числа клубней и масса клубней на 1 куст; уменьшалось количество пораженных клубней. Проводится дальнейшая работа по выбору оптимальных условий синтеза фунгицидного фактора вновь выделенного эффективного штамма-продуцента фунгицида широкого спектра.

АНТИКАНДИДОЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ РАСТЕНИЙ

Перунова Н.Б.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза
ОНЦ УрО РАН
Оренбурге

Пристальный интерес врачей к изучению грибковых заболеваний в последние годы обусловлен значительным ростом их частоты. Это связано с увеличением числа факторов риска развития микозов (антибиотикотерапия, использование глюкокортикоидов, иммуносупрессивных факторов и др.) (Буслаева Г.Н., 2003 г.).

Эффективные противогрибковые и антимикотические препараты предлагаемые современной фармацевтикой в основном являются продуктами химического и природного синтеза. Однако они дорогостоящи и обладают различными побочными действиями (аллергия, гепатотоксичность и др.) (Бадалян С.М., 2003 г.).

В связи с этим ведется активный поиск альтернативных методов лечения грибковых заболеваний. В частности предлагается использовать препараты растительного происхождения (Бадалян С.М., 2003 г.,

Ермакова Т.С., 2003 г., Криворутченко Ю.Л., 2003 г., Молочко В.А., 2003 г., Пячюлите Д.Ю., 2003 г.).

Материалы и методы: всего в работе использовано 13 штаммов грибов рода *Candida* выделенных от пациентов с дисбиозом кишечника 2-3 степени. Изучалась чувствительность изолированных культур дрожжевых грибов к эфирным маслам апельсина, можжевельника, лимона, пачули, нероли, ладана, гвоздики, Melissa, иланг-иланга, розового дерева и алоэ (ООО ТПК “Ароматы жизни”, Москва) методом дисков. Приготовленные диски из фильтровальной бумаги пропитывали определенным количеством растительных ароматических веществ и затем накладывали на поверхность подсушенных чашек с агаром Сабуро, содержащие исследуемые культуры грибов. Через 24 часа измеряли зоны торможения роста штаммов вокруг диска.

Результаты: Растительные ароматические вещества (РАВ) проявляли различную антимикробную активность в отношении дрожжевых грибов. Так, зоны торможения роста (ЗТР) грибов от 7 до 10 мм в диаметре формировались у 11,1±10,4% штаммов вокруг диска содержащего эфирное масло можжевельника; у 60±15,4% - диска с эфирным маслом лимона; у 25±12,5% культур - диска с пачули; у 20±12,6% грибов - вокруг диска содержащего эфирное масло (ЭМ) нероли и ладана; 16,6±10,7% штаммов - диска с Melissa; у 23±11,6% культур - вокруг диска с иланг-илангом; у 14,3±13,2% штаммов - диска с розовым деревом и у 44,4±16,5% дрожжевых грибов вокруг диска с алоэ.

ЗТР *C.albicans* диаметром от 10,5 до 15 мм обнаруживали у 25±21,6%; 11,1±10,4%; 10±9,4%; 16,6±10,7%; 50±15,8%; 30±14,4%; 25±15,3%; 25±12,5%; 23±11,6%; 42,8±18,7% и 44,4±16,5% культур грибов вокруг дисков содержащих соответственно РАВ апельсина, можжевельника, лимона, пачули, нероли, ладана, гвоздики, Melissa, иланг-иланга, розового дерева и алоэ.

Зоны торможения роста исследуемых штаммов дрожжевых грибов были от 15,5 до 20 мм в диаметре вокруг дисков с апельсином у 50±25% культур; дисков с нероли - у 20±12,6% штаммов; дисков, содержащих ЭМ гвоздики - 25±15,3% *C.albicans*; дисков с Melissa - у 16,6±10,7% культур; дисков с иланг-илангом - у 7,6±7,3% грибов.

Зоны торможения роста грибов рода *Candida* диаметром более 20 мм наблюдались у 10±9,4%; 10±9,4%; 50±17,6%; 8,3±7,9%; 7,6±7,3%; 28,6±17%; исследуемых культур вокруг дисков содержащих РАВ нероли, ладана, гвоздики, Melissa, иланг-иланга и розового дерева соответственно.

Заключение: Таким образом, исследования показывают, что эфирные масла растений могут проявлять фунгицидную активность. Растительные ароматические вещества способны в разной степени подавлять рост дрожжеподобных грибов. Наиболее выраженную активность (более 20 мм в диаметре зон торможения роста культуры вокруг диска) проявляли ЭМ нероли, ладана, гвоздики, Melissa, иланг-иланга, розо-

вого дерева. Проведенные исследования позволяют предложить эфирные масла в качестве альтернативных антимикотических препаратов. В связи с этим целесообразно вести поиск и разработку препаратов на основе широкого спектра класса природных соединений.

ИЗУЧЕНИЕ ФУНГИСТАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА «ЙОДОРАНТ» НА НЕКОТОРЫЕ ШТАММЫ ГРИБОВ - ДЕРМАТОФИТОВ IN VITRO

Петрасюк О.А., Гафаров М.М., Басченко И.А.

БГМУ

*Институт биологии Уфимского научного центра РАН
Уфа*

Профилактика и лечение микозов стоп (МС) — одна из актуальных проблем дерматологии, поскольку это заболевание широко распространено и зачастую вызывает временную утрату трудоспособности среди взрослого населения. По данным ВОЗ, 1/5 часть населения планеты страдает микозами стоп. Соотношение роли возбудителей, наиболее часто вызывающих МС периодически изменяется, в настоящее время основными возбудителями являются грибы *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale* и *Candida albicans*. В эпидемиологии МС большую роль играет устойчивость возбудителей в окружающей среде и изыскание новых фунгицидных препаратов для профилактической дезинфекции в бытовых условиях имеет большое значение.

Нами проводилась оценка противогрибковой активности препарата «Йодорант», разработанного на основе соединений йода в лаборатории биохимии физиологически активных веществ института биологии УНЦ РАН.

Зарубежные фирмы активно разрабатывают различные средства, в состав которых входит данное соединение йода, и используют их как для обработки зубных каналов при лечении кариеса (Франция), а в Японии для обработки песочниц в парках и детских садах. Это яркое свидетельство не только и эффективности, но и полной экологической безопасности данного соединения йода.

Целью работы было изучение фунгистатического действия «Йодоранта» на грибы — дерматофиты *Trichophyton rubrum* и *T. interdigitale*. Изучение фунгицидного действия препарата на грибы рода *Candida albicans* проводилось ранее в институте биологии УНЦ РАН.

В качестве тест — системы были использованы чистые культуры грибов *Trichophyton rubrum* и *T. interdigitale*.

Определение противогрибковой активности препарата к тест — грибам производили методом лунок (Сеги, 1983): суспензию спор грибов каждого вида, включенного в тест — систему, полученную путем смыва

стерильной водой с колоний 14 — суточного возраста (100 мкл при плотности 10 спор/мл), распределяли по поверхности среды в чашки Петри, на картофельно — глюкозном агаре. Затем стерильным пробочным сверлом из агаровой пластинки вырезали диски диаметром 10 мм, получая четыре симметрично расположенных отверстия. В отверстия вносили по 100 мкл жидкости, содержащей «Йодорант» в разведении действующего вещества 1: 5 и 1:10. Учет результатов проводили с помощью световой микроскопии колоний грибов в зоне действия препарата и вне ее. Одновременно проводили посев контрольных колоний дерматофитов без воздействия данного препарата.

Формирование ростковых трубок у спор тест — грибов в контрольном варианте отмечали через сутки после посева. На 3 — 4 сутки происходило формирование микроколоний тест — культур. На 10 сутки отмечали образование спор, морфологическая картина позволяла идентифицировать вид гриба. В опытных вариантах наблюдалась четкая зона подавления роста грибов вокруг лунок с препаратом. Зона ингибирования роста составляла от 30 до 50 мм в зависимости от разведения препарата.

Мицелий дерматофитов, сформированный на границе зоны действия «Йодоранта», обладал выраженными морфологическими изменениями.

Апикальная часть субстратного мицелия истончалась, на растущем мицелии формировались сферопласты, спорообразование отсутствовало. Морфология колоний не позволяла идентифицировать вид гриба. Наиболее выраженные деструктивные изменения отмечались на чашках, где концентрация препарата «Йодорант» в лунках составляла 1:5.

Таким образом, препарат «Йодорант» ингибирует рост и развитие грибов *Trichophyton rubrum* и *T. interdigitale* и обладает фунгицидным действием, что позволяет применять препарат для дезинфекции обуви у больных МС, а также для разработки новых форм лекарственных препаратов.

ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО АНТИМИКОТИКА ПРОИЗВОДНОГО ТИАЗОЛИДИН-2,4-ДИОНА

Пушкина Т.В., Николаева И.С., Петерс В.В., Стебаева Л.Ф.
ФГУП Центр по химии лекарственных средств (ЦХЛС-ВНИХФИ)
Москва

Цель: для выявления широты биологического действия нового оригинального антимикотика, производного тиазолидин-2,4-диона, показавшего химиотерапевтическую эффективность в опытах *in vivo* на модели экспериментальной микроспории морских свинок при мест-

ном применении, проведено изучение его антибактериального и противовирусного действия, а также влияния на фагоцитарную активность макрофагов.

Методы: антибактериальную активность определяли методом 2-х кратных серийных разведений в жидкой питательной среде Хоттингера в отношении референс-штаммов бактерий: *S. aureus ATCC 25923*, *E. coli 25922*, *Pr. Vulgaris ATCC 27853* и ряда госпитальных штаммов. Противовирусную активность изучали в контактных опытах *in vitro* с последующим титрованием остаточной инфекционности вируса на мышах: вируса простого герпеса (*ВПГ-1* типа, штамм «*ЕС*») при интраперитонеальном заражении, вируса гриппа *A/Aichi (H3N2)* при интраназальном заражении. Влияние на макрофагальную активность перитонеальных макрофагов проводили *in vitro* в жидкой питательной среде Хоттингера в отношении бактерий *S. aureus ATCC 25923*. Вещество изучено в дозах 5-10 мг/кг и в сверхмалых дозах $1,15 \cdot 10^{-8}$ – $1,15 \cdot 10^{-12}$ М/кг.

Результаты: вещество в концентрации 2,5 мг/мл оказывает бактерицидное действие в отношении *S. aureus ATCC 25923*; в концентрации 0,5 мг/мл обладает вирулицидным действием, полностью подавляя инфекционные свойства LD_{50} для мышей вируса простого герпеса и вируса гриппа; в концентрации 5–10 мг/кг активизирует все показатели фагоцитоза: макрофагальная активность (МФА) возрастает до 177%, а индивидуальная активность клеток (ФЧ и ФИ) – в 2-4 раза; в концентрации $1,15 \cdot 10^{-8}$ – $1,15 \cdot 10^{-10}$ М/кг МФА возрастает до 200-220%.

Выводы: выявлен широкий спектр биологической активности нового антимикотика – производного тиазолидин-2,4-диона: наряду с противогрибковой активностью оказывает бактерицидное действие в отношении золотистого стафилококка и вирулицидное действие на вирус герпеса простого, что может быть использовано при лечении поражений кожи смешанной этиологии. Вещество обладает стимулирующим действием на фагоцитарное звено иммунитета, особенно в сверхмалых дозах.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОТОКСИЧНОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ОРИГИНАЛЬНОГО АНТИМИКОТИКА ПРОИЗВОДНОГО ТИАЗОЛИДИН-2,4, ДИОНА

Савинова Т.Б.

ФГУП Центр по химии лекарственных средств (ЦХЛС ВНИХФИ)

Москва

Цель: с целью изучения эмбриотоксических и тератогенных свойств тиазолидин-2,4-диона на антенатальный и постнатальный период развития потомства крыс.

Методы тиазолидин-2,4-дион вводили с 1 по 20 день беременности в дозах 150мг/кг, составляющей примерно 1/12 от ЛД, и 30 мг/кг. Датированную беременность получали общепринятыми методами. После аутоназии рассчитывали до и постимплантационную смертность, количество аномальных плодов и тип аномалий, оценивали влияние на костную систему и состояние внутренних органов. Для оценки влияния на постнатальное развитие потомства тиазолидин-2,4-дион вводили в течение всей беременности до родов. После рождения оценивали выживаемость, динамику нарастания массы потомства, а также скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов (переворачивание на плоскости, избегание обрыва, мышечную работоспособность, двигательную активность).

Результаты: Установлено, что исследуемое соединение не повышает до- и постимплантационную смертность, не снижает массу плодов по сравнению с контрольным потомством. Тиазолидин-2,4-дион не влияет на состояние внутренних органов, но тормозит степень окостенения костной системы при введении в максимальной дозе. Ни при одной из вводимых доз тиазолидин-2,4-диона не обнаружены плоды с аномалиями развития.

Родившееся потомство подопытных самок по выживаемости и физическому развитию, а также по скорости созревания сенсорно-двигательных реакций не отличается от потомства контрольных самок.

Выводы: Полученные данные показывают, что тиазолидин-2,4-дион в исследуемых дозах не оказывает эмбриолетального действия в антенатальном периоде развития потомства, но в максимальной дозе тормозит степень окостенения костной системы эмбрионов. Тиазолидин-2,4-дион не оказывает отрицательное влияние на развитие потомства в постнатальном периоде развития. Тератогенное действие тиазолидин-2,4-диона не установлено.

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НОВОГО ОРИГИНАЛЬНОГО АНТИМИКОТИКА ПРОИЗВОДНОГО ТИАЗОЛИДИН-2,4-ДИОНА НА СТРУКТУРУ КЛЕТКИ CANDIDA ALBICANS И MICROSPORUM CANIS В ОПЫТАХ IN VITRO И IN VIVO

Стебаева Л.Ф., Крылова Л.Ю., Пушкина Т.В.

ФГУП Центр по химии лекарственных средств (ЦХЛС-ВНИХФИ)

Москва

Цель: с целью выявления возможных морфологических изменений в клетках гриба *Candida albicans* в опыте *in vitro* и *Microsporum canis* в опыте *in vivo* под воздействием тиазолидин 2,4-диона, проведены

электронно-микроскопические исследования влияния антимикотика на структуру грибковых клеток.

Методы: влияние тиазолидин-2,4-диона на ультраструктуру клеток гриба *Candida albicans* изучено в опытах *in vitro* в жидкой питательной среде Сабуро. Вещество исследовано в концентрациях 2,0; 3,9; 7,8; 15,6 мкг/мл при экспозиции с культурой в течение 3; 6; 24; 48 часов и 5 суток. Изучение влияние тиазолидин-2,4-диона на ультраструктуру клеток гриба *Microsporum canis* проведено в опыте *in vivo* на модели микроспории морских свинок. У животных, пролеченных 3% мазью брали образцы кожи на 10, 20 и 30 день после заражения. Проведено электронно-микроскопическое исследование кожи животных

Результаты: Электронно-микроскопические исследования показали, что тиазолидин-2,4-дион вызывает грубые изменения структуры гриба *Candida albicans*. Эти изменения затрагивают центральную вакуоль и структуру ДНК. Все изменения носят дозозависимый характер, а также зависят от времени экспозиции. При небольших дозах стенки клетки частично лизируются, теряют жесткость, меняется форма клеток. Основная масса в культуре имеет угловатую форму. При увеличении дозы соединения и экспозиции до 48 часов клетки гриба лизируются почти полностью. Оставшиеся клетки являются полностью не жизнеспособными. В опыте *in vivo* при микроспории у морских свинок после 10 дневного лечения поверхностные явления воспаления почти полностью излечиваются. Тогда как в контроле явления воспаления в этот срок ярко выражены. Однако при более углубленном электронно-микроскопическом исследовании кожи выявляется, что в более глубоких слоях можно определить наличие интерстициального отека и разрушение волосных фолликулов. Нити гриба выявлялись часто. Почти полное излечение можно наблюдать только к 30 дню. К этому сроку кожный покров и подкожная клетчатка имеют нормальный вид, нити гриба не выявляются.

Выводы: полученные данные подтверждают фунгицидный эффект тиазолидин 2-4-диона в отношении *Candida albicans* и *Microsporum canis* в опытах *in vitro* и *in vivo* при местном применении на модели микроспории морских свинок.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АНТИФУНГАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ГРУППЫ ТЕРБИНАФИНА

Федотов В.П., Светашов О.В.

Днепропетровская государственная медицинская академия
Днепропетровск, Украина

Мы провели качественное и количественное изучение сравнительной противогрибковой активности тербинафина выпускаемых фирмами под

названием Ламизил, Тербизил, Экзифин. Количественным методом эти таблетированные препараты подвергались исследованию при помощи раститровки исследуемой дозы в жидких селективных средах и определялась микостатическая чувствительность готовых фирменных мазей на чашках Петри методом «луночный колодец». Исследуемым материалом для проведения опыта *in vitro* служили культуры грибов *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Phodotorula rubra*, полученные бактериологическим методом из пораженных волос, ногтевых пластин, чешуек кожи, отделяемого эрозий и идентифицированные по морфологическим и бактериологическим признакам. Растворителем служил стерильный 10% донорский альбумин, что позволило достигнуть высокую биодоступность исследуемого вещества в эксперименте приближенном к условиям *in vivo* человека. При количественном определении микостатической активности методом серийных разведений отсутствовал рост плесневых грибов и дерматомицетов в присутствии каждого из препаратов в дозе 1 мкг/мл. Контроль проводился бактериоскопией и бактериологически на чашках Петри методом секторов, что выявило минимальную подавляющую активность дрожжеподобных грибов для ламизила - 1 мкг/мл, экзифина - 7,8 мкг/мл, тербизила - 250 мкг/мл. При качественном исследовании выраженные фунгистатические и функциональные свойства в отношении дрожжеподобных грибов и дерматомицетов отмечена у 1% крема Ламизил, несколько ниже - у 15% крема Экзифин, средняя степень активности - 1% крем Тербизил. Согласно проведенным исследованиям, наиболее выраженными фунгистатическими свойствами в отношении дрожжеподобных грибов и дерматомицетов обладает Ламизил и Экзифин и несколько слабее - Тербизил, что позволяет их практически равнозначно применять в терапии дерматомикозов, дифференцированно - кандидоза.

АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРОБИОТИКОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К ГРИБАМ-ВОЗБУДИТЕЛЯМ МИКОЗОВ И МИКОТОКСИКОЗОВ

Харченко С.Н.

Национальный аграрный университет Украины, кафедра микробиологии, вирусологии и биотехнологии
Киев, Украина

Профилактика и лечение микотических инфекций - одна из актуальных проблем современной медицины и ветеринарии, поскольку число случаев заболеваний грибной этиологии ежегодно возрастает. По

данным ВОЗ, ФАО, микозами страдает от 10 до 40% населения планеты различных возрастов (Мелентьев А.И. и др., 2004). Одно из особых мест среди поверхностных и висцеральных микозов и микотоксикозов занимают, наряду с возбудителями дерматомикозов, поражения кожи и её придатков ассоциативная дрожжеподобная и плесневых мицелиальных грибов. Такая ассоциативная микотическая инфекция опасна тем, что быстро может перейти из острой инфильтративной формы в хроническую, исходом которой являются секундарные бактериальные обсеменения, заканчивающиеся нагноительными процессами и рубцовой атрофией (Медведева Е.А., 1988). В связи с этим требования к препаратам, используемым в лечении, должны быть высокими.

В этом плане положительно зарекомендовали себя пробиотики – препараты из живых микробных культур, предназначенные для коррекции микробиоценозов макроорганизма и лечения ряда заболеваний. Широкую известность приобретают в последнее время пробиотики на основе спорообразующих аэробных бактерий рода *Bacillus*, одними из важнейших свойств которых являются их антагонистическое действие к определенным видам патогенных и условно патогенных микроорганизмов, высокая ферментативная активность, позволяющая существенно регулировать и стимулировать пищеварение, противоаллергенное и антиоксидантное действие и ряд других (Харченко С.Н., 1988).

Поэтому представляло интерес оценить антигрибную активность перспективных видов бацилл в отношении возбудителей микозов и микотоксикозов. Для этой цели были отобраны производственные штаммы *Bacillus subtilis* 3, *Bac. licheniformis* 31, представляющие биологическую основу пробиотиков Бактерина SL и Биоспорина, выпускаемых Днепропетровским заводом медпрепаратов и штаммов *B. subtilis* 68, 69, 70 КМВБ из музея кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии Национального аграрного университета.

В качестве тест-объектов воздействия были чистые культуры *Trichophyton mentagrophytes* var. *gypseum*, *T. rubrum*, *Candida albicans*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, отличающиеся вирулентностью, токсичностью и вызывающие острые и хронические заболевания человека и сельскохозяйственных животных.

В опытных вариантах наблюдалась четкая зона подавления роста грибов вокруг штриха бактерий. Зона ингибирования роста составляла от 20 до 30 мм в зависимости от штамма бацилл и видовой принадлежности гриба. Наиболее деструктивные изменения мицелия возбудителей дерматомикозов и микотоксикозов отмечалось на чашках с культурами *Bac. subtilis* 3 и 70 КМВБ, *Bac. licheniformis* 31, обладающих избирательной антифунгальной активностью.

Таким образом, штаммы *Bac. subtilis* 3 и *Bac. licheniformis* 31, составляющие основу пробиотиков Бактерина SL и Биоспорина, а также коллекционная культура *Bac. subtilis* 70 КМВБ способны ингибировать рост и развитие грибов-возбудителей микозов и микотоксикозов, что

может быть использовано при разработке новых схем лечения микотических поражений и новых форм лекарственных препаратов.

СРАВНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИФУНГАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ ПРИРОДНЫХ И КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA*

*Хомич Ю.С., Бурмистрова А.Л., Чернов Ю.И.¹,
Самышкина Н.Е., Поспелова А.В., Бахарева Л.И.*
Челябинский государственный университет

Челябинск

¹ МГУ, факультет почвоведения
Москва

Грибы рода *Candida* являются уникальными микроорганизмами, имеющими огромный диапазон адаптационных возможностей (от сапрофитов до комменсалов и оппортунистов), позволяющих им успешно проживать как в различных анатомических местах организма хозяина, так и во внешней среде. Все это ставит перед исследователями вопрос – существует ли ассоциация ряда уникальных свойств грибов с патогенным стилем жизни, либо эти свойства эффективно эксплуатируют и сапрофиты, и оппортунисты в целях выживания.

Для того чтобы частично прояснить этот вопрос, в данном исследовании мы сравнили чувствительность к антифунгальным препаратам природных и клинических изолятов грибов рода *Candida* (in vitro).

Материалы и методы:

Было изучено:

1. 13 клинических изолятов грибов рода *Candida*, выделенных из влагалища женщин с различной генитальной патологией;
2. 11 природных изолятов грибов рода *Candida*, любезно предоставленных кафедрой биологии почв факультета почвоведения МГУ (выделены из корма рыб, имаго комаров, ЖКТ кивсяка и почвы).

Для определения чувствительности грибов использовали коммерческую тест – систему “Fungitest” (Bio Rad, Франция), включающую следующие препараты:

- Флуконазол 8 и 64 мкг/мл,
- Итраконазол 0,5 и 4 мкг/мл,
- Кетоназол 0,5 и 4 мкг/мл,
- Миконазол 0,5 и 8 мкг/мл,
- Амфотерицин В 2 и 8 мкг/мл,
- 5-флюороцитозин 2 и 32 мкг/мл.

В соответствии с методикой исследования готовили суспензию 24 – 48-часовой чистой культуры грибов, выросшей на среде Сабуро, вносили по 100 мкл этой суспензии в каждую лунку микропланшета и инкубировали при 37^oC 48 часов. Результат (чувствителен / резистентен) оценивали по изменению окраски в лунках.

Кроме этого, из тех лунок, где результат был расценен как “чувствителен”, для оценки эффекта действия на грибы антифунгального препарата, мы производили высев 10 мкл содержимого каждой лунки микропланшета на среду Сабуро. Если через 48 часов инкубации при 28^oC проявлялся рост грибов, то эффект расценивали как фунгистатический; если роста не было – как фунгицидный.

Результаты: представлены в таблице.

Антифунгальный препарат	Концентрация	% чувствительных штаммов	
		Природные	Клинические
Флуконазол	8	46	33
Итраконазол	64	82	38
	0,5	36	23
Кетоконазол	4	82	38
	0,5	82	31
Миконазол	4	100	56
	0,5	0	38
Амфотерицин В	8	100	92
	2	100	100
5 – флюороцитозин	8	100	100
	2	100	77
	32	100	92
		77,3	59,8

Закключение.

1. Клинические изоляты грибов рода *Candida* проявляют наибольшую устойчивость к антифунгальным препаратам (59,8 % чувствительных штаммов), по сравнению с природными (77,3 % чувствительных штаммов).
2. Максимальную активность в отношении и природных, и клинических изолятов грибов рода *Candida* проявили амфотерицин В (100 % чувствительных штаммов) и 5 – флюороцитозин (100% и 77-92 % чувствительных штаммов соответственно). При этом, амфотерицин В в 100 % случаев оказывал фунгицидное действие и на природные, и на клинические штаммы.
3. Природные штаммы проявили высокую чувствительность к кетоконазолу (82 и 100 % чувствительных штаммов), в отличие от клиниче-

ских изолятов, демонстрирующих низкую чувствительность к этому препарату (31 и 56 % чувствительных штаммов). В то же время, все природные штаммы оказались устойчивы по отношению к миконазолу в концентрации 0,5 мкг/мл, но при увеличении концентрации до 8 мкг/мл показали 100 % чувствительность.

Для всех атимикотиков было отмечено, что если при минимальной концентрации препарат оказывал фунгистатическое действие, то при увеличении концентрации – эффект становился фунгицидным.

ИЗУЧЕНИЕ ОБЩЕТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОГО ОРИГИНАЛЬНОГО АНТИМИКОТИКА ПРОИЗВОДНОГО ТИАЗОЛИДИН-2,4, ДИОНА

Шарова С.А., Чичерина Л.А.

*ФГУП Центр по химии лекарственных средств (ЦХЛС ВНИХФИ)
Москва*

Задачи: изучение общетоксических свойств субстанции и лекарственной формы оригинального отечественного противогрибкового препарата – производного тиазолидин-2,4-диона при длительном применении в эксперименте на лабораторных животных.

Методы эксперименты проведены на нелинейных мышах и крысах обоего пола и на кроликах самцах породы “шиншилла”. Субстанцию препарата в виде взвеси в крахмальном киселе однократно вводили мышам и крысам внутрижелудочно и внутрибрюшинно. Крысам взвесь субстанции вводили внутрижелудочно в течение 4-х месяцев в дозах 30,150 и 300 мг/кг; по окончании эксперимента проведены гематологические, биохимические и патоморфологические исследования. В экспериментах на кроликах изучено общетоксическое действие 3% мази тиазолидин-2,4-диона при ежедневной ее аппликации на эпилированный участок спины в течение 2-х месяцев.

Результаты: Показано, что мыши и крысы переносят однократное введение препарата в достаточно высоких дозах. ЛД₅₀ для мышей при внутрижелудочном введении составила 27122,1(2230,7÷3297,4) мг/кг; для крыс – 2728,5(2100,5÷3544,4) мг/кг. Согласно общепринятой классификации, исследуемый препарат можно отнести к умеренно токсичным соединениям. В хроническом эксперименте также показана хорошая переносимость субстанции препарата. Токсические проявления отмечены только при введении его в высокой дозе – 300 мг/кг, составляющей примерно 1/9 от ЛД₅₀: наблюдалось снижение массы тела, частичная гибель животных, структурные изменения в почках и неспецифические изменения в печени. Введение препарата в дозах 30 и 150 мг/кг в течение 4-х месяцев не выявило существенных изменений

в гематологических и биохимических показателях крови и в структуре внутренних органов, кроме очаговой интерстициально-канальцевой нефропатии, носящей обратимый характер. При аппликации мази в течение 2-х месяцев состояние гомеостаза подопытных животных не претерпело заметного изменения по сравнению с контролем: гематологические и биохимические показатели находились в пределах физиологической нормы. Патоморфологическое исследование не выявило следов повреждающего воздействия на структуру внутренних органов, кроме не резко выраженной белковой дистрофии в печени. Признаки местнораздражающего действия отсутствовали.

Выводы: Полученные данные показывают хорошую переносимость препарата и позволяют предложить его для клинического изучения.

К ВОПРОСУ ОБ ИЗУЧЕНИИ МЕСТНОЙ АНТИФУНГАЛЬНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИ РЕЦИДИВИРУЮЩЕМ КАНДИДОЗЕ ПИЩЕВОДА

Шевяков М.А., Авдеенко Ю.Л.

*НИИ медицинской микологии имени П.Н. Кашкина СПбМАПО
Санкт-Петербург*

Рецидивирующий кандидоз пищевода, как у больных СПИДом, так и у ВИЧ-негативных пациентов, представляет актуальную проблему из-за существенного снижения качества жизни больных, угрозы пищеводного кровотечения, стриктуры, диссеминации микотического поражения и высокой стоимости лечения.

По нашим данным (2004) в период первых 6 мес. после излечения первичного эпизода кандидоза пищевода выявляют рецидив в более чем 38 % случаев. У большинства больных причиной рецидивирующего течения кандидоза является персистирующий иммунодефицит, обусловленный основным заболеванием (в т.ч. сахарный диабет, ревматологические заболевания, злокачественные новообразования, гормонозависимая бронхиальная астма). В тоже время у 14% пациентов с кандидозом пищевода не удается обнаружить факторов, предрасполагающих к рецидивирующему течению.

Обращает на себя внимание факт, что у значительной части больных рецидивирующий кандидоз пищевода протекает изолированно, т.е. без сопутствующего микотического поражения кожи, других слизистых оболочек и внутренних органов. Следовательно, в этих случаях речь идет о сугубо местных нарушениях антимикотической резистентности,

«ускользающих» от имеющихся диагностических методик, в том числе и от иммунологического исследования крови.

По-видимому, у определенной части больных отмечаются нарушения в местной системе неспецифических и специфических факторов резистентности. К первым нужно отнести перистальтику, адекватный баланс десквамации и регенерации многослойного плоского эпителия слизистой оболочки пищевода, свойства мукополисахаридов пристеночной слизи, количество и функцию внутриэпителиальных макро- и микрофагов, и, возможно, защитный эффект нормобиоты пищевода. Ко вторым относят CD1 (клетки Лангерганса), CD20, CD4, CD8, CD56, CD94 и интерлейкины.

Причины нарушений в системе местной антифунгальной резистентности пищевода могут быть детерминированы генетически. Также нельзя исключать такие факторы альтерации эпителия, как термический (вредная привычка в виде употребления обжигающего питья), пептический (рефлюкс-эзофагит) и микробный (*Herpes simplex*, *Cytomegalovirus*, *Streptococcus viridans*). Можно допустить, что в ряде случаев рецидивирование кандидоза связано с антигенными свойствами возбудителя.

По нашему мнению, перспективными в ракурсе изучения причин рецидивирования кандидоза пищевода являются иммуноморфологические методы, изучающие плотность и функцию иммунокомпетентных клеток слизистой оболочки. Такие исследования будут особо ценными, если их результаты будут проанализированы вместе с результатами изучения частоты и характера микст-инфекций пищевода и гастроэзофагеального рефлюкса.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Абдушкурова А.М. 98
 Амбардзумян А.Дз. 82
 Абрамян Дж. Г. 273
 Абрамян Р.А. 86
 Авакян З.Г. 288
 Авдеенко Ю.Л. 42, 320
 Аветисян Г.К. 176
 Автономова А.В. 164, 192
 Азизбекян Р.Р. 307
 Аксенов И.В. 152
 Аксёнов И.В. 122
 Амирян А.А. 273
 Антонов В.А. 17
 Антонов В.Б. 54
 Антропова А.Б. 67
 Арзуманян В.Г. 49
 Аристархова Т.В. 152
 Арутюнян К.Э. 82
 Ахунова А.М. 90

Б

Бабаянц Л.Т. 123
 Бабаянц О.В. 123, 240
 Бабицкая В.Г. 168, 171, 174, 236, 243
 Бадалян С. М. 178
 Бадалян С.М. 176
 Бакаева М.Д. 70
 Балагура А.Н. 223
 Баранцевич Е.П. 96
 Басченко И.А. 310
 Бахарева Л.И. 47, 101, 103, 105, 317
 Баяндина И.И. 195
 Белицкий И.В. 192
 Белова Н.В. 181
 Беловежц Л.А. 185
 Бибилова М.В. 183
 Билай В.Т. 174
 Биланенко Е.Н. 67
 Бисько Н.А. 174, 246, 281
 Блинкова Л.П. 288
 Богданова Т.А. 247
 Богомолова Е.В. 12, 28

Богомолова Т.С. 30
 Богуш П.Г. 23, 25
 Бондарь Т.И. 125
 Брагинцева Л.М. 252
 Бурмистрова А.Л. 47, 101, 103, 105, 317
 Бухало А.С. 254
 Бухман В.М. 192
 Бушулян М.А. 240
 Быков В.Ю. 12

В

Важбин Л.Б. 290
 Вальшев А.В. 291
 Васильева Н.В. 30, 295
 Вассер С.П. 254
 Вискова Н.Ю. 108
 Водопьянов В.В. 56
 Войчук С.И. 31
 Волчатова И.В. 185
 Воробьев А.А. 302
 Воробьева И.Г. 226
 Вотяков В.И. 271
 Врынчану Н.А. 297
 Выборнова И.В. 30, 295

Г

Гагкаева Т.Ю. 13
 Галимзянова Н.Ф. 70
 Галяутдинова Г.Г. 156
 Гарибова Л.В. 164
 Гафаров М.М. 310
 Гвоздкова Т.С. 257
 Геворкян С.А. 58
 Глушакова А.М. 91
 Гогинян В.Б. 58
 Гончарова И.А. 61, 187, 221
 Горбунова И.А. 195
 Горбунова И.А. 259
 Горобец О.Г. 288
 Горовой Л.Ф. 197
 Горшина Е.С. 262, 268
 Грамматикова Н.Э. 183
 Григорьян С.А. 114
 Гришина М.А. 17

Громовых Т.И. 213
 Громозова Е. Н. 31
 Гюлхасян В.М. 86

Д

Давидян Т.С. 288
 Даниленко А.Н. 183
 Дешевая Е.А. 63
 Джаболдинов А.С. 98
 Дудка И.А. 128

Е

Евсегнеева И.В. 95
 Евсенко М.С. 51
 Егоров В.И. 156
 Егорова Л.Н. 64
 Елинов Н.П. 295
 Ермолаева Е.В. 247

Ж

Желтикова Т.М. 67

З

Заврина О.А. 47
 Завьялова Л.А. 164
 Залогина М.А. 240
 Замараев В.С. 17
 Зароченцева И.А. 32
 Заславская М.И. 298
 Захарова Л.П. 141, 153
 Захарова Н.М. 105
 Зачиняев Я.В. 69
 Зачиняева А.В. 69

И

И.В. Евсегнеева 93
 Иванов А.В. 132, 146, 156
 Иванова И.П. 298, 300
 Иванченко О.Б. 134, 143
 Игнатенко С.В. 243, 257
 Иконникова Н.В. 174, 187
 Исакова Е.Б. 192
 Исланов Ю.Ш. 99

К

Каменных П.В. 33
 Капич А.Н. 189, 271
 Караулов А.В. 94, 95

Катлинский А.В. 183
 Катомина А.А. 232
 Качалай Д.П. 268
 Качева З.Б. 271
 Кизленко О.И. 141
 Киреева Н.А. 56, 70
 Кирик Н.Н. 125
 Кириченко И.М. 302
 Кириченко Н.А. 302
 Киселева М.Г. 153
 Климова Ю.А. 64
 Кобзистая О.П. 137
 Кокушков Д.В. 95, 97
 Коломиец Э.И. 185
 Костюк О.О. 159
 Котик А.Н. 160
 Крапивина Е.А. 139
 Краснопольская Л.М. 164, 192
 Кривошеин Ю.С. 302, 305
 Круглова И.Ф. 116
 Крылова Л.Ю. 313
 Кубышева Н.И. 247
 Кукина Т.П. 195
 Кукулянская Т.А. 197
 Кулько А.Б. 74
 Кураков А.В. 58
 Курченко В.П. 197
 Кьюз У. 176

Л

Лаврентьева Е.Б. 247, 268
 Лебедева Т.Н. 96
 Левитин М.М. 13
 Лесовой В.С. 17
 Лещенко В.М. 23, 25
 Либензон А.В. 192
 Ликов В.Ф. 95, 97
 Липницкий А.В. 17
 Литвинова Н.А. 25
 Лихачев А.Н. 72
 Лобанок А.Г. 243
 Ломберг М.Л. 223
 Лопатенто Ю.С. 243, 257
 Лощина Е.А. 201
 Лукина Н.М. 98
 Львова Л.С. 141, 153

М

Максимова Р.А. 226
 Маноян М.Г. 35, 37
 Мартынова Е.А. 134, 143
 Марфенина О.Е. 74
 Матвеева Е.Л. 146
 Матросова Л.Е. 132
 Медведева С.А. 185
 Мельник А.П. 99
 Миненкова И.Б. 307
 Минина С.В. 96
 Митропольская Н.Ю. 174, 246
 Михайлова М.А. 30, 295
 Михайлова О.Б. 254
 Мицкевич А.Г. 61
 Мокеева В.Л. 67
 Мокина Е.В. 23
 Мокринская Е.А. 105
 Мокроносова М.А. 114
 Молочков В.А. 302
 Монастырский О.А. 148
 Москаленко Л.Г. 246
 Мусселиус С.Г. 149
 Мысякина И.С. 232

Н

Назинян Е.Р. 82
 Нанагюлян С.Г. 273
 Наумов Г.И. 20
 Наумова Е.С. 20
 Никитина В.Е. 201
 Николаева И.С. 311
 Николаева С.Н. 271
 Николаенко М.А. 307
 Новикова Н.Д. 58, 63

О

Овчинников Р.С. 35, 37
 Огарков Б.Н. 206, 210
 Огаркова Г.Р. 206, 210
 Ожован И.М. 49
 Ооржак У.С. 213
 Осадчая О.В. 168, 171, 236
 Осинцева Л.А. 83
 Осипян Л.Л. 86
 Оспанова С.А. 98

П

Панин А.Н. 35, 37
 Панина Л.К. 28, 32
 Перова Н.В. 259
 Перунова Н.Б. 308
 Петерс В.В. 311
 Петрасюк О.А. 310
 Петров А.Н. 278
 Петрова-Никитина А.Д. 67
 Пименова В.В. 152
 Пиняскина Е.В. 39
 Пленина Л.В. 243, 257
 Поддубко С.В. 63
 Поединок Н.Л. 276
 Поспелова А.В. 47, 101, 103, 317
 Пролетарский А.Ю. 28
 Псурцева Н.В. 215
 Пучкова Т.А. 168, 171, 218
 Пушкина Т.В. 311, 313

Р

Рамина Ю.С. 105
 Рекалова Е.М. 116
 Ровбель Н.М. 61, 187, 221
 Рожкова З.А. 168, 218
 Розанов С.Е. 278
 Романовская Т.Р. 243, 257
 Рудько А.П. 302, 305

С

Савинова Т.Б. 312
 Савченко С.С. 17
 Сайлауова К.С. 98
 Сакеян К.З. 178
 Самусенок Л.В. 206, 210
 Самышкина Н.Е. 47, 101, 103, 105, 317
 Саркисян Э.Ю. 86
 Светашов О.В. 314
 Свирцевская Е.В. 108
 Свистов В.В. 302
 Седова И.Б. 141, 153
 Сенюк О.Ф. 197
 Сергеев А.Ю. 6, 9, 23, 25, 51
 Сергеев Ю.В. 6, 9, 23, 25
 Сергейчев А.И. 132
 Серикбаева М.М. 98

Синицкая И.А. 42, 43
 Сирунян А.Л. 273
 Скворцова М.М. 247, 262, 268
 Смирнов Д.А. 218
 Смирнов И.В. 305
 Соколов А.В. 96
 Соколова Н.Ю. 192
 Соколова Т.В. 114
 Соловьева О.В. 83
 Соломенникова И.И. 69
 Соломко Э.Ф. 223, 254
 Спиридонова И.А. 183
 Становая О.В. 17
 Стебаева Л.Ф. 311, 313
 Степанов В.И. 132
 Степанова А.А. 42, 43
 Степанова Л.В. 201
 Сухаржевский С.М. 28
 Сухотина Н.Н. 20
 Сушинская Н.В. 197

Т

Таслахчян М.Г. 273
 Тверской Р.М. 99
 Теплякова Т.В. 210, 226, 259
 Тер Степанян М.М. 82
 Ткаченко Г.А. 17
 Тонконогова Н.В. 98
 Тремасов М.Я. 132, 146, 156
 Труфанова В.А. 159, 160
 Тутельян В.А. 122

У

Усов А.И. 192
 Ушанова В.М. 213

Ф

Фарутина И. 32
 Федотов В.П. 314
 Феофилова Е.П. 231
 Фещенко Ю.И. 116
 Филимонова Т.В. 171
 Филимонова Т.В. 236
 Фомичева Г.М. 74
 Фунтикова Н.С. 232

Х

Харченко С.Н. 315

Хлюстов С.В. 243
 Хомич Ю.С. 47, 101, 317

Ц

Цивилева О.М. 201
 Цуканова В.Т. 28
 Цыганенко Е.С. 234

Ч

Чекрыга Г.П. 83
 Чекунова Л.Н. 67
 Чернов Ю.И. 47, 105, 317
 Черноок Т.В. 257
 Чилина Г.А. 30
 Чичерина Л.А. 319
 Чорна А.В. 160

Ш

Шариков А.М. 213
 Шарова С.А. 319
 Шевкунов С.В. 99
 Шевченко М.А. 108
 Шевчук Е.Ю. 246
 Шеваков М.А. 320
 Шелюк А.И. 281
 Шеховцова Е.Л. 108
 Шнырева А.В. 21
 Шульга Е.В. 44
 Шхагапсоев С.Х. 139

Щ

Щерба В.В. 168, 171, 174, 218, 236, 243
 Щербо С.Н. 23, 25

Э

Эллер К.И. 122, 152

Я

Яковлев И.М. 99
 Яковлева Н.С. 181
 Ясьрь С.Г. 116

Y

Yli-Mattila T. 13

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
-------------------	---

Глава 1.

Молекулярная генетика в медицинской микологии. Геномы грибов и диагностика в генодиагностике грибковых заболеваний человека

Исследования геномов патогенных грибов сегодня. <i>Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В.</i>	6
Направления и возможности постгеномных исследований в медицинской микологии. <i>Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В.</i>	9
Сравнение методов выделения ДНК из биомассы литобионтных грибов. <i>Быков В.Ю., Богомолова Е.В.</i>	12
Использование метода ПЦР для выявления и идентификации грибов рода <i>Fusarium</i> и трихотеценовых токсинов. <i>Гагкаева Т.Ю., Левитин М.М., Yli-Mattila T.</i>	13
Сравнительный анализ ПЦР и традиционных методов диагностики кокцидиоидомикоза на ранней стадии заражения. <i>Гришина М.А., Ткаченко Г.А., Савченко С.С., Становая О.В., Антонов В.А., Лесовой В.С., Замараев В.С., Липницкий А.В.</i>	17
Сравнительный молекулярно-генетический анализ госпитальных штаммов <i>Kluyveromyces lactis</i> . <i>Сухотина Н.Н., Наумова Е.С., Наумов Г.И.</i>	20
Методы геносистематики в решении практических задач микологии. <i>Шнырева А.В.</i>	21
Российский опыт и перспективы генодиагностики главных форм дерматофитии. <i>Сергеев А.Ю., Щербо С.Н., Богуш П.Г., Лещенко В.М., Сергеев Ю.В., Мокина Е.В.</i>	23
Первый опыт прямой генодиагностики микроспории в клиническом материале. <i>Сергеев А.Ю., Богуш П.Г., Щербо С.Н., Литвинова Н.А., Лещенко В.М., Сергеев Ю.В.</i>	25

Глава 2.

Новые данные о природе и патогенных свойствах грибов, имеющих значение для медицины

Спектры ЭПР темноокрашенных микромицетов в изменяющейся среде. <i>Богомолова Е.В., Панина Л.К., Пролетарский А.Ю., Сухаржевский С.М., Цуканова В.Т.</i>	28
Активность внеклеточных ферментов клинических изолятов <i>Cryptococcus neoformans</i> . <i>Васильева Н.В., Богомолова Т.С., Чилина Г.А., Михайлова М.А., Выборнова И.В.</i>	30

Механизм резистентности дрожжевых клеток к ряду фунгицидных антибиотиков, вызванной электромагнитным излучением. <i>Громозова Е. Н., Войчук С.И.</i>	31
Влияние некоторых фармакологических агентов на морфологию клеток микроскопических грибов. <i>Зароченцева И.А., Фарутина И., Панина Л.К.</i>	32
Сканирующее электронно-микроскопическое исследование ногтевых пластинок пальцев ног человека в норме и при онихомикозах. <i>Каменных П.В.</i>	33
Видовая идентификация дерматофитов на основе морфологических и физиологических свойств. <i>Маноян М.Г., Овчинников Р.С., Панин А.Н.</i>	35
Морфологические и физиологические особенности изолятов <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , выделенных от различных видов животных. <i>Овчинников Р.С., Маноян М.Г., Панин А.Н.</i>	37
Защитное действие низкоинтенсивного красного света на дрожжи при действии UVA-излучения и видимого света. <i>Пиняскина Е.В.</i>	39
Электронно-микроскопическое изучение латеральных клеточных оболочек и септального порового аппарата клеток вегетативного мицелия <i>Aspergillus versicolor (Vuill.) Tiraboschi</i> . <i>Степанова А.А., Сунецкая И.А., Авдеенко Ю.Л.</i>	42
Электронно-микроскопическое изучение клеток вегетативного мицелия <i>Aspergillus versicolor (Vuill.) Tiraboschi</i> . <i>Степанова А.А., Сунецкая И.А.</i>	43
Исследование антагонистического взаимодействия между <i>Lentinula edodes</i> и <i>Trichoderma spp.</i> <i>Шульга Е.В.</i>	44
Характер адгезивной способности природных и клинических изолятов грибов рода <i>Candida</i> к буккальному эпителию здорового человека. <i>Бурмистрова А.Л., Хомич Ю.С., Чернов Ю.И., Самышкина Н.Е., Поспелова А.В., Бахарева Л.И., Заверина О.А.</i>	47
Киллерная активность дрожжей <i>Candida albicans</i> . <i>Арзуманян В.Г., Ожован И.М.</i>	49
К характеристике патогенных свойств дерматофитов. <i>Евсенко М.С., Сергеев А.Ю.</i>	51

Глава 3.

Микоэкология. Болезнетворные грибы и современное окружение человека

Микозы и микогенная аллергия как антропогенно-очаговые заболевания. <i>Антонов В.Б.</i>	54
Оценка влияния нефтепродуктов на накопление оппортунистических микромицетов в почве с помощью математической модели. <i>Водопьянов В.В., Киреева Н.А.</i>	56
Распространение оппортунистических грибов в микробиоте биоповреждений полимеров космической техники. <i>Геворкян С.А., Кураков А.В., Новикова Н.Д., Гогинян В.Б.</i>	58

Экспресс-оценка эффективности защиты материалов от плесневых грибов. <i>Гончарова И.А., Мицкевич А.Г., Ровбель Н.М.</i>	61
Проблема микрoэкологического риска в обитаемых космических объектах. <i>Дешевая Е.А., Новикова Н.Д., Поддубко С.В.</i>	63
Сапротрофные микромицеты в воздухе различных помещений г. Владивостока. <i>Егорова Л.Н., Климова Ю.А.</i>	64
Значение биоценологических отношений между плесневыми грибами и аллергенными клещами домашней пыли в формировании экспозиции бытовых аллергенов. <i>Желтикова Т.М., Антропова А.Б., Биланенко Е.Н., Моисеева В.Л., Чекунова Л.Н., Петрова-Никитина А.Д.</i>	67
Характеристика микро-аллергенной контаминации почв промышленных регионов России. <i>Зачиняева А.В., Зачиняев Я.В., Соломенникова И.И.</i>	69
Накопление условно патогенных микромицетов в нефтезагрязненных почвах и при рекультивации. <i>Киреева Н.А., Бакаева М.Д., Галимзянова Н.Ф.</i>	70
Места и источники концентрации пропагул микромицетов в помещениях. <i>Лихачев А.Н.</i>	72
Экологические условия развития потенциально патогенных мицелиальных грибов. <i>Марфенина О.Е., Фомичева Г.М., Кулько А.Б.</i>	74
Микромицеты – контаминанты стеклотекстолитов. <i>Мотейо́ните О., Лугаускас А.</i>	77
Распространенность носителей грибов рода <i>Candida</i> в некоторых больницах. <i>Назинян Е.Р., Амбардзумян А.Дз., Арутюнян К.Э., Тер Степанян М.М.</i>	82
Санитарно-микологическая оценка пылецевой обложки с пазов западной Сибири. <i>Осинцева Л.А., Чекрыга Г.П., Соловьева О.В.</i>	83
Микотическая загрязненность воздуха больничных палат центра перинатологии, гинекологии и акушерства Армении. <i>Осиян Л.Л., Абрамян Р.А., Саркисян Э.Ю., Голхасян В.М.</i>	86

Глава 4.

Микогенная аллергия и иммунопатология, связанная с грибами

Клиническая и алерго-иммунологическая характеристика эндогенной бронхиальной астмы пециломикозной этиологии. <i>Ахунова А.М.</i>	90
Дрожжевые грибы, как источник возможных аллергенов в домашней пыли. <i>Глушакова А.М.</i>	91
Изучение растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы у больных сахарным диабетом второго типа, осложненных вирусной и грибковой инфекцией. <i>И.В. Евсегнеева</i>	93
Иммунитет к грибковым инфекциям: состояние проблемы и возможности иммунокоррекции. <i>Караулов А.В.</i>	94

Поддержание экологии и эффективного иммунного ответа как основа профилактики грибковой инфекции при респираторных инфекциях. <i>Караулов А.В., Ликов В.Ф., Евсегнеева И.В., Кокушков Д.В.</i>	95
Состояние антиоксидантной системы у больных кандидозом и атопическим дерматитом с микогенной сенсibilизацией. <i>Лебедева Т.Н., Соболев А.В., Минина С.В., Баранцевич Е.П.</i>	96
Использование имудона в профилактике кандидозов при рецидивирующих респираторных инфекциях. <i>Ликов В.Ф., Кокушков Д.В.</i>	97
Сенсibilизация к дрожжевым грибам – причина обострений атопического дерматита. <i>Лукина Н.М., Абдушкурова А.М., Сайлауова К.С., Оспанова С.А., Тонконогова Н.В., Серикбаева М.М., Джаболдинов А.С.</i>	98
Немедикаментозные методы и иммунокорректоры в комплексном лечении микотической патологии. <i>Мельник А.П., Тверской Р.М., Яковлев И.М., Исламов Ю.Ш., Шевкунов С.В.</i>	99
Влияние грибов рода <i>Candida</i> на синтез интерферона-гамма иммунными клетками периферической крови человека <i>in vitro</i> . <i>Поспелова А.В., Бурмистрова А.Л., Хомич Ю.С., Самышкина Н.Е., Бахарева Л.И.</i>	101
Влияние грибов рода <i>Candida</i> на синтез провоспалительных/противовоспалительных цитокинов иммунными клетками периферической крови человека <i>in vitro</i> . <i>Поспелова А.В., Бурмистрова А.Л., Хомич Ю.С., Самышкина Н.Е., Бахарева Л.И.</i>	103
Сравнение фагоцитарной активности лейкоцитов доноров в отношении клинических и природных штаммов <i>Candida spp.</i> . <i>Самышкина Н.Е., Бурмистрова А.Л., Чернов Ю.И., Рамина Ю.С., Бахарева Л.И., Мокринская Е.А., Захарова Н.М.</i>	105
Повышение аффинности антител к основным белкам гриба <i>Aspergillus fumigatus</i> зависит от дозы антигена и формирования герминальных центров. <i>Свирицевская Е.В., Шевченко М.А., Вискова Н.Ю., Шеховцова Е.Л.</i>	108
Клинико-иммунологические и бактериологические параллели у больных кандидозом кожи и слизистых оболочек. <i>Соколова Т.В., Мокроносова М.А., Григорьян С.А.</i>	114
Уровень противокандидозных иммуноглобулинов ϵ в крови иммунокомпетентных больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких. <i>Фещенко Ю.И., Рекалова Е.М., Круглова И.Ф., Ясырь С.Г.</i>	116

Глава 5.

Микотоксинология. Новые методы диагностики и лечения микотоксикозов и отравлений грибами

Актуальность проблемы контаминации охратоксином А пищевых продуктов. <i>Аксёнов И.В., Эллер К.И., Тутельян В.А.</i>	122
---	-----

Фузариоз колоса – явная и скрытая опасность и генетический путь решения проблемы. <i>Бабаянц О.В., Бабаянц Л.Т.</i>	123
Токсичность грибов изолированных из корневой системы ярового рапса. <i>Бондарь Т.И., Кирик Н.Н.</i>	125
Грибные отравления среди населения Украины в последнее десятилетие. <i>Дудка И.А.</i>	128
Изучение детоксицирующего действия микромицетов на микотоксины <i>Иванов А.В., Матросова Л.Е., Сергейчев А.И., Степанов В.И., Тремасов М.Я.</i>	132
Механизмы генотоксичности микотоксина фумонизина В1. <i>Иванченко О.Б., Мартынова Е.А.</i>	134
Комбинированное действие макроциклических трихотеценов на дрожжи и зеленые водоросли. <i>Кобзистая О.П.</i>	137
Ядовитые грибы Западной части Центрального Кавказа. <i>Кривина Е.А., Шхагапсоев С.Х.</i>	139
Изучение микофлоры зерна кукурузы и продуктов ее переработки. <i>Львова Л.С., Кизленко О.И., Седова И.Б., Захарова Л.П.</i>	141
Регуляция экосистемы кишечника человека и животных микотоксином фумонизином В1. <i>Мартынова Е.А., Иванченко О.Б.</i>	143
Патоморфологические изменения при смешанных микотоксикозах. <i>Матвеева Е.Л., Иванов А.В., Тремасов М.Я.</i>	146
Сельскохозяйственные аспекты медицинской микологии. <i>Монастырский О.А.</i>	148
Неотложные мероприятия по удалению из организма грибного токсина. <i>Мусселлус С.Г.</i>	149
Методические подходы к одновременному определению охратоксина А и цитринина в пищевых продуктах. <i>Пименова В.В., Аксенов И.В., Аристархова Т.В., Эллер К.И.</i>	152
Изучение загрязненности зерна кукурузы и продуктов ее переработки фузариотоксинами. <i>Седова И.Б., Захарова Л.П., Киселева М.Г., Львова Л.С.</i>	153
О сочетанном воздействии пиретроидов и микотоксинов. <i>Тремасов М.Я., Галяутдинова Г.Г., Егоров В.И., Иванов А.В.</i>	156
Влияние гипохлорита натрия на концентрацию общего белка, альбумина и активность аланинаминотрансферазы плазме крови цыплят при Т-2 токсикозе. <i>Труфанова В.А., Костюк О.О.</i>	159
Контаминация микотоксинами кормов для птицы. <i>Труфанова В.А., Котик А.Н., Чорна А.В.</i>	160

Глава 6.

Грибные биотехнологии – эпоха новых лекарственных препаратов и биологически активных веществ

Изучение физиологических характеристик штаммов <i>Ganoderma lucidum</i> (Curt.: Fr.) P. Karst. <i>Автономова А.В., Завьялова Л.А., Гарибова Л.В., Краснопольская Л.М.</i>	164
---	-----

Изучение изменения антиоксидантной активности <i>Laetiporus sulphureus</i> на модели острого отравления печени крыс. <i>Агафонова С.В., Боровский Г.Б., Пензина Т.А., Яковлев А.Ю., Лепихова С.А.</i>	166
Антиоксидантная активность <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq. Fr.) Kumm., ароматические соединения гриба. <i>Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А., Осадчая О.В., Рожкова З.А.</i>	168
Глубинный мицелий гриба <i>Pleurotus ostreatus</i> – основа новых функциональных препаратов. <i>Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А., Осадчая О.В., Филимонова Т.В.</i>	171
Антиокислительное и генопротекторное действие лекарственных базидиальных грибов <i>Inonotus obliquus</i> и <i>Phellinus robustus</i> . <i>Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Иконникова Н.В., Бисько Н.А., Митропольская Н.Ю., Билай В.Т.</i>	174
Скрининг антиоксидантной активности некоторых коприноидных грибов. <i>Бадалян С.М., Кьюз У., Аветисян Г.К.</i>	176
Лекарственные свойства некоторых дереворазрушающих грибов из порядка <i>Aphyllphorales</i> . <i>Бадалян С. М., Сакеян К.З.</i>	178
Биосинтетические особенности лигнотрофных медицински значимых базидиомицетов. <i>Белова Н.В., Яковлева Н.С.</i>	181
Сравнительная биологическая активность антибиотиков группы олигомицинов. <i>Бибикова М.В., Грамматикова Н.Э., Спиридонова И.А., Даниленко А.Н., Катлинский А.В.</i>	183
Дрожжеподобные грибы – источник получения биологически активных добавок. <i>Волчатова И.В., Медведева С.А., Беловежец Л.А., Коломиец Э.И.</i>	185
Сорбционная способность биомассы меланинсинтезирующего базидиомицета <i>Phellinus robustus</i> М-10. <i>Иконникова Н.В., Гончарова И.А., Ровбель Н.М.</i>	187
Антиоксидантные и прооксидантные свойства ксилотрофных базидиомицетов. <i>Капич А.Н.</i>	189
Система скрининга экстрактов базидиальных грибов, обладающих противоопухолевой активностью. <i>Краснопольская Л.М., Белицкий И.В., Автономова А.В., Соболева Н.Ю., Усов А.И., Исакова Е.Б., Либензон А.В., Бухман В.М.</i>	192
Грибы как источник полипреинов. <i>Кукина Т.П., Горбунова И.А., Баяндина И.И.</i>	195
Механизм сорбции тяжелых металлов грибами меланинами. <i>Курченко В.П., Сушинская Н.В., Кукулянская Т.А., Горовой Л.Ф., Сенюк О.Ф.</i>	197
Поиск группоспецифичных лектинов грибного происхождения. <i>Никитина В.Е., Цивилева О.М., Степанова Л.В., Лощинина Е.А.</i>	201
Пути создания некоторых лекарственных препаратов из микро- и макромицетов. <i>Огарков Б.Н., Огаркова Г.Р., Самусенко Л.В.</i>	206

Комбинированный грибной препарат с высокой антиоксидантной активностью. <i>Огарков Б.Н., Теплякова Т.В., Огаркова Г.Р., Самусенок Л.В.</i>	210
Химический состав и биологическая активность экстрактов, полученных из <i>Fomitopsis officinalis</i> (Vill.: Fr.) Bond. Et Sing. <i>Ооржак У.С., Шариков А.М.¹, Громовых Т.И., Ушанова В.М.</i>	213
Таксономическая идентификация и верификация культур макромицетов, представляющих интерес для медицины. <i>Псурцева Н.В.</i>	215
Полисахариды глубинного мицелия и культуральной жидкости грибов <i>Ganoderma lucidum</i> и <i>Lentinus edodes</i> . <i>Пучкова Т.А., Щерба В.В., Смирнов Д.А., Рожкова З.А.</i>	218
Предпочтительность сорбции ионов тяжелых металлов биомассой базидиальных грибов. <i>Ровбель Н.М., Гончарова И.А.</i>	221
Альтернативные субстраты для культивирования лекарственных грибов. <i>Соломко Э.Ф., Ломберг М.Л., Балагура А.Н.</i>	223
Морфологические и физиолого-биохимические особенности гриба <i>Arthrobotrys longa</i> в связи с нематофаговыми свойствами и активностью фибринолитических ферментов. <i>Теплякова Т.В., Максимова Р.А., Воробьева И.Г.</i>	226
Межклеточные взаимодействия в микробных популяциях как основа современной биотехнологии. <i>Феофилова Е.П.</i>	231
Получение -линоленовой кислоты с использованием непрерывного культивирования дрожжеподобных клеток гриба <i>Mucor lusitanicus</i> ИНМИ. <i>Фунтикова Н.С., Мысякина И.С., Катомина А.А.</i>	232
Оптимизация условий культивирования <i>Aspergillus parvulus</i> для биосинтеза биологически активного метаболита. <i>Цыганенко Е.С.</i>	234
<i>Crinipellis shevchenkovi</i> (Buchalo) – перспективный объект биотехнологии. <i>Щерба В.В., Бабицкая В.Г., Филимонова Т.В., Осадчая О.В.</i>	236

Глава 7.

Медицинское использование культивируемых грибов.

Фунготерапия

<i>Phallus impudicus</i> L.: Pers. – перспективы использования в медицине. <i>Бабаянц О.В., Бушулян М.А., Залогина М.А.</i>	240
«Рейшидин» – новая биологически активная добавка к пище. <i>Бабицкая В.Г., Лобанок А.Г., Пленина Л.В., Хлюстов С.В., Лопатенто Ю.С., Щерба В.В., Романовская Т.Р., Игнатенко С.В.</i>	243
Высшие базидиальные лекарственные грибы – основа биологически активных добавок серии “Микосвит”. <i>Бисько Н.А., Москаленко Л.Г., Шевчук Е.Ю., Митропольская Н.Ю.</i>	246
БАД «Мипро-ВИТ» в лечении бронхиальной астмы у детей. <i>Богданова Т.А., Кубышева Н.И., Ермолаева Е.В., Лаврентьева Е.Б., Скворцова М.М.</i>	247
Грибы – источник биологически активных веществ. <i>Брагинцева Л.М.</i>	252

Лекарственные препараты и пищевые добавки из макромицетов. <i>Бухало А.С., Соломко Э.Ф., Вассер С.П., Михайлова О.Б.</i>	254
Биологически активная добавка на основе мицелия гриба <i>Laetiporus sulphureus</i> и ее функциональное назначение. <i>Гвоздкова Т.С., Черноок Т.В., Пленина Л.В., Лопатенто Ю.С., Романовская Т.Р., Игнатенко С.В.</i>	257
Лекарственные грибы юга Западной Сибири. <i>Горбунова И.А., Перова Н.В., Теплякова Т.В.</i>	259
Трамелан – отечественная биологически активная добавка на основе сухой биомассы лекарственного базидиомицета <i>Trametes pubescens</i> (Schumach.) Pil t и другие препараты грибов рода <i>Trametes</i> (<i>Coriolus</i>). <i>Горшина Е.С., Скворцова М.М.</i>	262
Применение порошков зернового мицелия лекарственных грибов вешенки, ганодермы и шиитаке для лечения токсической гепатодистрофии у поросят. <i>Евдокимова О.А., Алехин Ю.Н.</i>	266
БАД «Мипро-ВИТ» в детской гастроэнтерологии. <i>Качалай Д.П., Лаврентьева Е.Б., Скворцова М.М., Горшина Е.С.</i>	268
Противовирусная активность экстрактов мицелия базидиального гриба <i>Laetiporus sulphureus</i> . <i>Квачева З.Б., Капич А.Н., Вотяков В.И., Николаева С.Н.</i>	271
Материалы к изучению микофильных грибов Армении. <i>Нанаголян С.Г., Абрамян Дж. Г., Таслахчян М.Г., Сирунян А.Л., Амирян А.А.</i>	273
Лечебные свойства гериция шиповатого и перспективы его использования в биотехнологии и медицине. <i>Поединок Н.Л.</i>	276
Препараты на основе мицелиальной культуры <i>Cordyceps</i> , как перспективный метод иммунотерапии. <i>Розанов С.Е., Петров А.Н.</i>	278
Фунготерапия – естественная медицина будущего. <i>Филиппова И.А., Фунтик Т.В.</i>	279
Перспективы использования биологически активных и питательных веществ зимнего опенка <i>Flammulina velutipes</i> (FR.) P. KARST. Шелюк А.И., Бисько Н.А.	281
К перспективе применения препаратов, полученных из грибов. <i>Юцковский А.Д., Черных С.В., Новикова Е.В.</i>	284

Глава 8.

Поиск перспективных антимикотиков. Чувствительность и резистентность к современным противогрибковым препаратам

Штамм бактерий с выраженной противогрибковой активностью. <i>Авакян З.Г., Давидян Т.С.</i>	288
---	-----

Бактериоцины как объект исследований в микологии. <i>Блинкова Л.П., Горобец О.Г.</i>	288
Изделия из антисептических материалов в профилактике микозов стоп. <i>Важбин Л.Б.</i>	290
Антимикробные пептиды животных – новая группа противогрибковых средств. <i>Валышев А.В.</i>	291
Вариабельность чувствительности микромицетов к некоторым азоловым препаратам. <i>Васильева Н.В., Выборнова И.В., Елинов Н.П., Михайлова М.А.</i>	295
Антифунгальная активность мази на основе нового аминопроизводного адамантана. <i>Врынчану Н.А.</i>	297
Кандидацидный эффект некогерентного импульсного света. <i>Иванова И.П., Заславская М.И.</i>	298
Механизм фунгицидного действия некогерентного импульсного света. <i>Иванова И.П.</i>	300
Экспериментальное обоснование использования новой лекарственной формы мирамистина геля «Митрипан» в дерматологии. <i>Кириченко И.М., Молочков В.А., Воробьёв А.А., Кириченко Н.А., Рудько А.П., Свистов В.В., Кривошеин Ю.С.</i>	302
Мирамистин – отечественный антисептик широкого спектра действия (стратегия создания новых лекарственных форм мирамистина для дерматологии). <i>Кривошеин Ю.С., Рудько А.П., Свистов В.В., Смирнов И.В.</i>	305
Бациллярные штаммы с фунгицидной активностью, предназначенные для защиты культурных растений. <i>Миненкова И.Б., Николаенко М.А., Азизбекян Р.Р.</i>	307
Антикандидозная активность эфирных масел растений. <i>Перунова Н.Б.</i>	308
Изучение фунгистатического действия препарата «Йодорант» на некоторые штаммы грибов - дерматофитов <i>in vitro</i> . <i>Петрасюк О.А., Гафаров М.М., Басченко И.А.</i>	310
Изучение спектра биологической активности нового антимикотика производного тиазолидин-2,4-диона. <i>Пушкина Т.В., Николаева И.С., Петерс В.В., Стебаева Л.Ф.</i>	311
Исследование эмбриотоксичной активности нового оригинального антимикотика производного тиазолидин-2,4, диона. <i>Савинова Т.Б.</i>	312
Электронно-микроскопическое исследование влияния нового оригинального антимикотика производного тиазолидин-2,4-диона на структуру клетки <i>Candida albicans</i> и <i>Microsporium canis</i> в опытах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> . <i>Стебаева Л.Ф., Крылова Л.Ю., Пушкина Т.В.</i>	313
Сравнительный биофармакологический анализ антифунгальной активности препаратов группы тербинафина. <i>Федотов В.П., Светашов О.В.</i>	314

Антифунгальная активность некоторых пробиотиков по отношению к грибам-возбудителям микозов и микотоксикозов. <i>Харченко С.Н.</i>	315
Сравнение чувствительности к антифунгальным препаратам природных и клинических изолятов грибов рода <i>Candida</i> . <i>Хомич Ю.С., Бурмистрова А.Л., Чернов Ю.И., Самышкина Н.Е., Поспелова А.В., Бахарева Л.И.</i>	317
Изучение общетоксических свойств нового оригинального антимикотика производного тиазолидин-2,4, диона. <i>Шарова С.А., Чичерина Л.А.</i>	319
К вопросу об изучении местной антифунгальной резистентности при рецидивирующем кандидозе пищевода. <i>Шевяков М.А., Авдеенко Ю.Л.</i>	320
Именной указатель.....	322

Научное издание

Успехи медицинской микологии

Под общей научной редакцией
Ю.В. Сергеева

Том V

Издательство «Национальная академия микологии»
<http://www.mycology.ru>

Подписано в печать 28.02.2005 г. Формат 60x90/16.
Печать офсетная. Печ. л. 21. Тираж 900 экз