

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 25 №1



Problems in medical mycology

Vol.25 №1

2023

EDITORIAL BOARD

Chief Editor —

N.V. Vasilyeva — Honored Scientist of the Russian Federation, Ph.D., prof. (Russia)

Deputies Chief Editor —

N.N. Klimko — M.D., prof. (Russia)

A.E. Taraskina — Ph.D. (Russia)

Responsible secretary —

T.S. Bogomolova — Ph.D. (Russia)

Manager of Editorial Office —

E.S. Gukova (elena.gukova@szgmu.ru)

SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD

Bennett J. — M.D. (USA), Dupont B. — M.D. (France), Hurzilava O.G. — M.D., prof. (Russia), Golubev V.I. — Ph.D. (Russia), Kashkin K.P. — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), Kolbin A.C. — M.D., prof. (Russia), Mazurov V.I. — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), Ozerskaya S.M. — Ph.D. (Russia), Polachek I. — M.D. (Israel), Samzov A.V. — M.D., prof. (Russia), Sidorenko S.V. — M.D., prof. (Russia), Raznatovsky K.I. — M.D., prof. (Russia), Shulgina M.V. — Ph.D. (Russia), Tietz H.-J. — M.D. (Germany), Viviani M.A. — M.D. (Italy), Zinzerling V.A. — M.D., prof. (Russia), Yamaguchi M. — Ph.D. (Japan), Zhang F. — M.D.&Ph.D. (China)

PROBLEMS IN MEDICAL MYCOLOGY

Vol. 25, № 1, 2023

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

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

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 25, № 1, 2023

Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н.Кашкина
© ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор —

Н.В. Васильева — Заслуженный деятель науки Российской Федерации, д.б.н., профессор (Россия)

Заместители главного редактора:

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

А.Е. Тараскина — к.б.н. (Россия)

Ответственный секретарь —

Т.С. Богомолова — к.б.н. (Россия)

Зав. редакцией —

Е.С. Гукова (elena.gukova@szgmu.ru)

НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беннетт Дж. — доктор медицины (США), Вивиани М.А. — доктор медицины (Италия), Голубев В.И. — д.б.н. (Россия), Б. Дюпон — доктор медицины (Франция), Кашкин К.П. — д.м.н., академик РАМН, профессор (Россия), Колбин А.С. — д.б.н., профессор (Россия), Мазуров В.И. — д.м.н., акад. РАМН, профессор (Россия), Озерская С.М. — д.б.н. (Россия), Полачек И. — доктор медицины (Израиль), Самцов А.В. — д.м.н., профессор (Россия), Сидоренко С.В. — д.м.н., профессор (Россия), Разнатовский К.И. — д.м.н., профессор (Россия), Титц Х-Й. — доктор медицины (Германия), Хурцилава О.Г. — д.м.н., проф. (Россия), Цинзерлинг В.А. — д.м.н., профессор (Россия), Чжан Ф. — доктор медицины (Китай), Шулгина М.В. — д.б.н. (Россия), Ямагучи М. — доктор медицины (Япония)

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

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ И ОБЗОРЫ

<i>Рябинин И.А.</i> Возможности MALDI-TOF-масс-спектрометрии и биоинформатики в обнаружении детерминант устойчивости к триазольным противогрибковым препаратам.....	3
<i>Хостелиди С.Н., Козлова О.П., Адильгереев И.А., Ровинский Ф.А., Ковыршин С.В., Успенская О.С., Сатурнов А.В., Рябыкина О.Е., Ружинская О.С., Мошкевич И.Р., Тараскина А.Е., Богомолова Т.С., Чилина Г.А., Босак И.А., Выборнова И.В., Мелехина Ю.Э., <u>Климко Н.Н.</u></i> Инвазивный микоз, обусловленный <i>Blastobotrys adenivorans</i> . Описание клинического случая и обзор литературы.....	12

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ И ДЕРМАТОВЕНЕРОЛОГИЯ

<i>Прокопьев В.В., Куклина Н.В., Емельянова И.В., Звездкина Г.С.</i> Анализ культивируемых грибов кишечника у пациентов с патологией желудочно-кишечного тракта и клинически здоровых людей.....	19
<i>Мухачева Д.А., Разнатовский К.И., Соболев А.В.</i> Новые биомаркеры в субтипировании атопического дерматита как основа персонализированной терапии.....	25
<i>Гринева Е.М., Корнишева В.Г., Разнатовский К.И., Вашкевич А.А.</i> Функциональное состояние щитовидной железы, индекс массы тела у женщин с очаговой склеродермией.....	31
<i>Грицкова И.А., Пономаренко И.Г.</i> Применение Карипаин Scar-ультрафонофореза у пациентов с рубцовыми изменениями кожи.....	38
<i>Кукушкина К.С., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Корнишева В.Г., Разнатовский К.И.</i> Показатели иммунитета у больных гнездой алопецией в зависимости от содержания витамина Д в сыворотке крови.....	43
<i>Платонова А.В., Эсавулова Л.Т., Пономаренко И.Г., Теличко И.Н.</i> Первичный сифилис половых органов с индуративным отеком и ложноотрицательными серологическими реакциями.....	51

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

<i>Кондратенко О.В., Зубова К.В., Бочкарева П.В., Исмагуллин Д.Д.</i> Распространенность представителей порядка <i>Flavobacteriales</i> у пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации.....	55
--	----

ХРОНИКА И ИНФОРМАЦИЯ

Памяти профессора Н.Н. Климко.....	60
------------------------------------	----

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

<i>Ryabinin I.A.</i> The opportunities of MALDI-TOF-mass spectrometry and bioinformatics in detection of resistance determinants for triazole antifungals.....	3
<i>Khostelidi S.N., Kozlova O.P., Adilgereev I.A., Rovinsky F.A., Kovyrshin S.V., Uspenskaya O.S., Saturnov A.V., Ryabykina O.E., Ruzhinskaya O.S., Moshkevich I.R., Taraskina A.E., Bogomolova T.S., Chilina I.A., Bosak I.A., Vybornova I.V., Melikhina Yu.E., <u>Klimko N.N.</u></i> Invasive mycosis caused by <i>Blastobotrys adenivorans</i> . Case report and literature review.....	12

CLINICAL MYCOLOGY AND DERMATOVENEROLOGY

<i>Prokopiev V.V., Kuklina N.V., Emelyanova I.V., Zvezdkina G.S.</i> Analysis of cultivated intestinal fungi in patients with pathology of the gastrointestinal tract and clinically healthy people.....	19
<i>Mukhacheva D.A., Raznatovsky K.I., Sobolev A.V.</i> New biomarkers in subtyping of atopic dermatitis as the basis of personalized therapy.....	25
<i>Grineva E.M., Kornisheva V.G., Raznatovsky K.I., Vashkevich A.A.</i> Functional state of the thyroid gland, body mass index in women with focal scleroderma.....	31
<i>Gritskova I.A., Ponomarenko I.G.</i> Application of the Karipain Scar-ultraphonophoresis technique in patients with scarring of the skin.....	38
<i>Kukushkina K.S., Frolova E.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Kornisheva V.G., Raznatovsky K.I.</i> Immunity parameters in patients with alopecia areata depending on the content of vitamin D in blood serum.....	43
<i>Platonova A.V., Esavulova L.T., Ponomarenko I.G., Telichko I.N.</i> Primary genital syphilis with indurative edema and false negative serological reactions.....	51

EXPERIMENTAL MICROBIOLOGY

<i>Kondratenko O.V., Zubova K.V., Bochkareva P.V., Ismatullin D.D.</i> Prevalence of representatives of the order <i>Flavobacteriales</i> in patients with cystic fibrosis in the Russian Federation.....	55
---	----

CHRONICLE AND INFORMATION

To the memory of professor N.N. Klimko.....	60
---	----

Для цитирования: Рябинин И.А. Возможности MALDI-TOF-масс-спектрометрии и биоинформатики в обнаружении детерминант устойчивости к триазольным противогрибковым препаратам. 2023; 25 (1): 3-11. DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-3-11

For citation: Ryabinin I.A. The opportunities of MALDI-TOF-mass spectrometry and bioinformatics in detection of resistance determinants for triazole antifungals. Problems in Medical Mycology. 2023; 25 (1): 3-11. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-3-11

ВОЗМОЖНОСТИ MALDI-TOF-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ В ОБНАРУЖЕНИИ ДЕТЕРМИНАНТ УСТОЙЧИВОСТИ К ТРИАЗОЛЬНЫМ ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ

Рябинин И.А. (ассистент кафедры, н.с.)*

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России (кафедра медицинской микробиологии; НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина), Санкт-Петербург, Россия

Цель исследования: разработка алгоритма индикации ассоциированных с резистентностью и видоспецифических аминокислотных сайтов в ферментах типа CYP51 с помощью кислотного протеолиза и масс-спектрометрии на примере *Aspergillus fumigatus* и *A. lentulus*.

Объектами исследования явились аминокислотные последовательности ланостерол-14 α -деметилазы (CYP51A) триазол-чувствительных штаммов *A. fumigatus* и пан-триазол-устойчивых штаммов *A. lentulus*. С использованием средств биоинформатики провели двухэтапный анализ, включающий прогнозирование сайтов и продуктов протеолиза избранных белков муравьиной кислотой, а также кластеризацию аминокислотных последовательностей.

Установлены различия в положении аминокислотных сайтов, по которым происходит кислотный протеолиз ферментов у представителей двух видов, а также различия в составе пептидов – продуктов протеолиза и различия их молекулярных масс, доступные для обнаружения с помощью масс-спектрометрии. Для подтверждения закономерности найденных феноменов получена «филограмма» последовательностей CYP51A, на которой последовательности ферментов из двух видов микромитозов оказались в двух изолированных кладах.

На основании установленных аминокислотных особенностей и с учетом развития современных методов выделения белков и детекции продуктов их деградации предложен алгоритм биохимического анализа, позволяющий проводить точную видовую идентификацию возбудителей инвазивного аспергиллеза с различающейся чувствительностью к противогрибковым препаратам триазольного ряда.

Ключевые слова: инвазивный аспергиллез, *Aspergillus* spp., ланостерол-14 α -деметилаза, биоинформатика, масс-спектрометрия

THE OPPORTUNITIES OF MALDI-TOF-MASS SPECTROMETRY AND BIOINFORMATICS IN DETECTION OF RESISTANCE DETERMINANTS FOR TRIAZOLE ANTIFUNGALS

Ryabinin I.A. (assistant of the department, scientific researcher)

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

*The aim of the study is development of the algorithm for indication of the resistance-associated and species-specific amino acid sites in CYP51-type enzymes with using acid proteolysis and mass-spectrometry on the example of *Aspergillus fumigatus* and *A. lentulus*. The objects of the study were the amino acid sequences of lanosterol-14 α -demethylases (CYP51A) from triazole-sensitive strains of *A. fumigatus* and pan-triazole-resistant strains of *A. lentulus*. Two-stage analysis including prediction of sites and products of proteolysis of selected proteins with formic acid, as well as clustering of amino acid sequences was carried out using bioinformatics approaches.*

Differences in the positions of amino acid sites at which acidic proteolysis of enzymes occurs in representatives of the two species, as well as differences in the composition of peptides, products of proteolysis, and differences in their molecular weights, which can be detected using mass spectrometry, have been established. To confirm the regularity of the detector phenomena, a «phylogram» of CYP51A sequences was obtained, in which the sequences of enzymes from two species of micromycetes were found in two isolated clades.

Based on the established amino acid features and taking into account the development of modern methods for isolating proteins and detection of their degradation products, a biochemical analysis algorithm that allows for accurate species identification of invasive aspergillosis pathogens with different sensitivity to triazole antifungal drugs has been proposed.

Key words: invasive aspergillosis, *Aspergillus* spp., lanosterol-14 α -demethylase, bioinformatics, mass spectrometry

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

ВВЕДЕНИЕ

На текущем этапе развития терапии инвазивных микозов (ИМ) доступны препараты нескольких групп, включая триазольные антимикотики, полиены, эхинокандины и аналоги азотистых оснований. В этом ряду наиболее существенное значение имеют производные триазола, которые сочетают в себе возможность применения представителей при всех основных нозоформах ИМ (инвазивный аспергиллез, инвазивный кандидоз, мукомикоз), наличие не только фунгистатического, но и фунгицидного действия (в сравнении с эхинокандинами), а также сравнительно ограниченный спектр побочных эффектов (в сравнении с полиенами). Поэтому раскрытие механизмов резистентности к триазолам, а также разработка протоколов их выявления в лабораториях референс-типа, а затем и в лабораториях, осуществляющих первичную микробиологическую диагностику, является одной из ключевых стратегий в борьбе с ИМ. На данный период у возбудителей ИМ выявлено несколько механизмов устойчивости к триазолам: аминокислотные замены в белке мишени (CYP51, ланостерол-14 α -деметилаза), в том числе с мутациями в промоторной области кодирующего гена; гиперэкспрессия структурного гена белка мишени; работа систем-«эффлюксов», аминокислотные замены в ферментах, катализирующих более ранние стадии стероидогенеза. Несмотря на разнообразие механизмов резистентности, по-видимому, аминокислотные замены в белке-мишени являются ведущим фактором, имеющим наиболее весомую клиническую значимость. Для их выявления необходимы технологии, основанные на секвенировании (определении последовательности) биополимеров. Используемая многими авторами в этой сфере техника ДНК-секвенирования эффективна и объективна в своих результатах, однако необходимое приборное оснащение и расходные средства не всегда доступны даже референс-лабораториям. Аминокислотное секвенирование белков сегодня получило новое воплощение в форме техники матрично-активированной лазерной ионизационно-десорбционной времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной фрагментацией (MALDI-TDS). Тем не менее, как показали собственные исследования, хотя этот подход в отличие от эдмановского секвенирования (метод отщепления аминокислот с N-конца) не требует больших концентраций белкового продукта, он очень сильно подвержен влиянию пептидных примесей и появлению атипичных сайтов фрагментации на результативность сборки «консенсусной» белковой последовательности [1]. Перспективным ходом в этой сфере считаем использование химической фрагментации, что в отношении ампликонов кодирующего гена может быть реализовано с помощью рестриктаз (с «гелевой» детекцией или

электроспрей-ионизационной масс-спектрометрии, ESI-MS), в отношении соответствующей информационной РНК – с помощью масс-спектрометрии и нуклеотид-специфичных рибонуклеаз (техника «PCR-MALDI», протокол типа «MassCleave»), а в отношении белкового продукта – с помощью масс-спектрометрии и протеолиза. Разработке последнего из указанных направлений посвящена данная работа.

Цель исследования: разработать алгоритм индикации ассоциированных с резистентностью и видоспецифических аминокислотных сайтов в ферментах типа CYP51 с помощью кислотного протеолиза и масс-спектрометрии на примере *Aspergillus fumigatus* и *A. lentulus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения избрали последовательности CYP51 двух возбудителей инвазивного аспергиллеза – *A. fumigatus* Fres. (включает триазол-чувствительные штаммы и штаммы с вторичной лекарственной устойчивостью), а также *A. lentulus* Balajee, K.A. Marr (вид отличается первичной устойчивостью к триазолам). Оба вида фактически слабо различимы в традиционном микологическом исследовании, включающем определение культуральных свойств и световую микроскопию. Последовательности CYP51 (изоформы A) выкопировали из базы «non-redundant protein sequences». В исследование включили последовательности CYP51A из штаммов *A. fumigatus*, чувствительных к вориконазолу, итраконазолу и позаконазолу, №№ XP_752137.1, ACF17708.1, AKE50948.1, ACF17709.1, а также последовательности CYP51 пан-триазол-устойчивых штаммов *A. lentulus* №№ AEB77690.1, AEB77695.1, ADI80344.1, AEB77692.1, AEB77687.1. Анализ продуктов протеолиза осуществляли с помощью редактора «PeptideCutter», в качестве протеолитического агента избрали муравьиную кислоту. Сортировку полученных данных и сопоставление результатов *in silico* протеолиза для разных последовательностей выполнили в MS Excel 2010 и LibreOffice Calc.

Анализ провели в два этапа: на первом – для последовательностей CYP51A штаммов *A. fumigatus* Af293 и *A. lentulus* CBS117884^T (№№ XP_752137 и AEB77690.1) установили возможность существования масс-спектрометрических различий в продуктах протеолиза CYP51, на втором – выяснили роль биохимического полиморфизма в последовательностях, отражающих своеобразие конкретных штаммов, на однозначность трактовки получаемых результатов. В последнем случае использовали редактор «Phylogeny.Fr» (алгоритм выравнивания «MUSCLE», коррекция результатов выравнивания «Gblocks», расчет дистанции и построения дендрограммы «PhyML», формирование картины дендрограммы «TreeDyn»).

Для формирования внегрупповой ветви в дендрограмме использована последовательность СYP51 *A. niger* QCL08207.1.

Предложены подходы к выделению, концентрированию СYP51A, а также методы масс-спектрометрической детекции продуктов протеолиза как маркеров, отражающих детерминанты резистентности, исходя из их химической природы и рассчитанных молекулярных масс.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для избранных модельных последовательностей ланостерол-14 α -деметираз получили расчётные сайты расщепления («неферментативного протеолиза») при обработке раствором муравьиной кислоты, как показано в таблице 1. Поскольку оба белка являются структурными гомологами и нумерация аминокислотных сайтов в их последовательностях совпадает,

их возможно сопоставлять; оба этих белка состоят из 515 аминокислотных остатков.

Из таблицы 1 видно, что сравниваемые белки различаются 3-мя сайтами протеолиза, из них 1 (161) имеется только у *A. fumigatus* Af293, а два других (488 и 512) – только у *A. lentulus* CBS117884^T. Таким образом, уже на основании специфических различий в действии на субстрат (СYP51) можно предположить различия в композиции (и, как следствие, в масс-спектре) получаемого пептидного перевара. Однако для более точного ответа на этот вопрос необходим анализ состава и молекулярных масс продуктов протеолиза. Подробный состав продуктов переваривания двух модельных белков муравьиной кислотой отражен в таблице 2. В таблице пептиды ранжированы по мере увеличения молекулярной массы, поскольку именно в таком порядке их пики будут видны в масс-спектре при ESI- или MALDI-ионизации.

Таблица 1

Сравнительные особенности расположения сайтов протеолиза муравьиной кислотой для модельных последовательностей СYP51 *A. fumigatus* и *A. lentulus*

Штамм / последовательность	Аминокислотные сайты последовательностей, по которым происходит протеолиз							
<i>A. fumigatus</i> Af293 / XP_752137	56	70	100	118	122	157	161	173
<i>A. lentulus</i> CBS117884 ^T / AEB77690.1	56	70	100	118	122	157	—	173
<i>A. fumigatus</i> Af293 / XP_752137	205	209	211	233	245	253	257	262
<i>A. lentulus</i> CBS117884 ^T / AEB77690.1	205	209	211	233	245	253	257	262
<i>A. fumigatus</i> Af293 / XP_752137	280	333	343	345	401	411	426	430
<i>A. lentulus</i> CBS117884 ^T / AEB77690.1	280	333	343	345	401	411	426	430
<i>A. fumigatus</i> Af293 / XP_752137	481	—	490	—	515			
<i>A. lentulus</i> CBS117884 ^T / AEB77690.1	481	488	490	512	515			

Таблица 2

Пептидные продукты, получаемые в результате обработки избранных модельных белков типа СYP51 муравьиной кислотой

№ п/п	Сайт протеолиза	Аминокислотная последовательность пептида (код FASTA)	Длина пептида, а/о	Молекулярная (средне-изотопная) масса получаемого пептида, Da
Продукты протеолиза СYP51 <i>A. fumigatus</i> Af293				
1	211	LD	2	246,263
2	345	LD	2	246,263
3	257	GEKD	4	447,445
4	430	KVVD	4	459,543
5	122	VVYD	4	494,545
6	209	LYHD	4	546,580
7	262	SQKSD	5	563,565
8	161	YLRD	4	565,627
9	490	GKKGVPETD	9	930,026
10	253	IITQRRLD	8	1014,193
11	343	GSLPPLQYKD	10	1117,267
12	411	EHFPNAGCWD	10	1175,240
13	173	SPNFQGSSGRVD	12	1250,290
14	245	AAHARMRSIYVD	12	1389,595
15	70	PYKFFACREKYGD	14	1771,023
16	426	PHRWENQATKEQEND	15	1881,936

№ п/п	Сайт протеолиза	Аминокислотная последовательность пептида (код FASTA)	Длина пептида, а/о	Молекулярная (средне-изотопная) масса получаемого пептида, Да
17	118	VNAEEVYSPLTTPVFGSD	18	1925,079
18	280	MIWNLMNSTYKNGQQVPD	18	2155,489
19	233	KGFTPIINFMLPWAPLPHNKKRD	22	2608,102
20	515	YSSLFSGPMKPSIIGWEKRSKNTSK	25	2829,267
21	100	IFTFILLGQKTTVYLG VQGNEFILNGKLD	30	3370,980
22	205	ISAAMAEITIFTAARALQGQEVRSKLTAEFAD	32	3410,890
23	157	CPNSKLMQKKFIKYGLTQSALESHVPLIEKEVLD	35	4017,711
24	481	YGYGAVSKGTSSPYLPGAGRHRRCIGEKFAFAYVNLG VILATIVRHLRLFNV D	51	5585,475
25	333	KEIAHMMITLLMAGQHSSSSISAWIMLRASQPKVLEELYQEQLANLGPAGPD	53	5806,768
26	401	KLPFHQHVIRETLRIHSSIHSMRKVKSPVPVPGTPYMIPPGRVLLASPGVTALSD	56	6177,372
27	56	MVPMLWLTAYMAVAVL TAILLN VVYQLFFRLWNRTEPPMVFWVVPYLGSTISYGID	56	6549,862
Продукты протеолиза CYP51 A. lentulus CBS117884[†]				
1	490	TD	2	234,209
2	211	LD	2	246,263
3	345	LD	2	246,263
4	515	SSK	3	320,346
5	257	GGKD	4	375,382
6	430	EVVD	4	460,485
7	122	VVYD	4	494,545
8	209	LYHD	4	546,58
9	262	SQKSD	5	563,565
10	488	GKKGVDP	7	699,805
11	253	IINQRRLD	8	1027,192
12	343	GNLPLQYKD	10	1144,293
13	411	EHFPNAGCWD	10	1175,24
14	245	AAHARMRSIYVD	12	1389,595
15	173	YLRNSPNFQSSSQVD	16	1768,86
16	70	PYKFFACRERYGD	14	1799,036
17	426	PHRWENQAAKEQEND	15	1851,91
18	118	VNAEEVYSPLTTPVFGSD	18	1925,079
19	280	MIWNLMNSTYKNGQQVPD	18	2139,428
20	233	KGFTPIINFMLPWAPLPHNKKRD	22	2608,102
21	512	YSSLFSGPMKPSIIRWEKRSKD	22	2613,03
22	100	IFTFILLGQKTTVYLG VQGNEFILNGKLD	30	3370,98
23	205	ISAAMAEITIFTAARALQGQEVRSKLTAEFAD	32	3410,89
24	157	CPNSKLMQKKFIKYGLTQSALESHVPLIEKEVLD	35	4017,711
25	481	YGYGAVSKGTSSPYLPGAGRHRRCIGEKFAFAYVNLG VILATIVRHLRLFNV D	51	5585,475
26	333	KEIAHMMITLLMAGQHSSSSISAWIMLRASQPQVLEELYQEQLANLGPAGPD	53	5848,805
27	401	KLPFHQHVIRETLRLHSSIHSLMRKVKSPVPVPGTPYVIPGRVLLASPGVTALSD	56	6131,286
28	56	MVSMLLL TAYTAVAMLT VILLNVVYQLFFRLWNRTEPPMVFWVVPFLGNTISYGID	56	6507,822

Как видно, композиция пептидов, возникающих при кислотной деградации целевых белков для штаммов двух видов, различается, тем не менее, необходимо понимать, в какой степени эти различия могут быть визуализированы в одном из доступных в данном случае методов масс-спектрометрии, позволяющем проводить «бережную» ионизацию пептидов без фрагментации в процессе ионизации. Такое сопоставление показано в таблице 3. Здесь распределение молекулярных масс пептидов из двух

белков наложено друг на друга, пептиды с идентичными или очень близкими величинами M_r выделены жирным шрифтом, различающиеся – показаны обычным. Полученное распределение позволило выявить различия в композиции потенциальных масс-спектров для диапазона съёмки 0,2-7 kDa по всей области диапазона. Последнее обстоятельство принципиально позволяет использовать несколько типов масс-спектрометрии для выявления различий исследуемых белков.

Реконструкция предполагаемой суперпозиции пептидных ионов в масс-спектрах двух модельных белков при формировании частиц с зарядом +1

Штамм	Сопоставление (в строках) молекулярных масс пептидов — продуктов переваривания по вероятному перекрытию в масс-спектре (Mr, Da)						
	<i>A. fumigatus</i> Af293	234,209	246,263	246,263	—	—	447,445
<i>A. lentulus</i> CBS117884 ^T	—	246,263	246,263	320,346	375,382	—	460,485
<i>A. fumigatus</i> Af293	494,545	546,58	563,565	565,627	—	930,026	1014,193
<i>A. lentulus</i> CBS117884 ^T	494,545	546,58	563,565	—	699,805	—	—
<i>A. fumigatus</i> Af293	—	1117,267	—	1175,24	1250,29	1389,595	1771,023
<i>A. lentulus</i> CBS117884 ^T	1027,192	—	1144,293	1175,24	—	1389,595	1768,86
<i>A. fumigatus</i> Af293	—	—	1881,936	1925,079	—	2155,489	2608,102
<i>A. lentulus</i> CBS117884 ^T	1799,036	1851,91	—	1925,079	2139,428	—	2608,102
<i>A. fumigatus</i> Af293	—	2829,267	3370,98	3410,89	4017,711	5585,475	5806,768
<i>A. lentulus</i> CBS117884 ^T	2613,03	—	3370,98	3410,89	4017,711	5585,475	—
<i>A. fumigatus</i> Af293	—	—	6177,372	—	6549,862	—	—
<i>A. lentulus</i> CBS117884 ^T	5848,805	6131,286	—	6507,822	—	—	—

Для установления факта отсутствия «перекрывающихся» аминокислотных мотивов в первичных структурах *A. fumigatus* и *A. lentulus*, существование которых помешало бы четкому различению ланостерол-14 α -деметилаз этих микромицетов, проведено построение дендрограммы-«филограммы» избранных первичных последовательностей от штаммов с определенной чувствительностью к противогрибковым препаратам. Результат построения показан на рисунке 1.

Как видно из результатов кластеризации последовательностей СУР51А, первичные структуры этих ферментов у двух анализируемых видов образуют обособленные (не перекрывающиеся) клады с отчетливой дистанцией. Внутри клад дистанция между последовательностями ярко не выражена. Таким образом, особенности первичной структуры СУР51А анализируемых видов подтверждают возможность четкой таксономической дифференцировки белков такого типа, в том числе с помощью предложенного протокола.

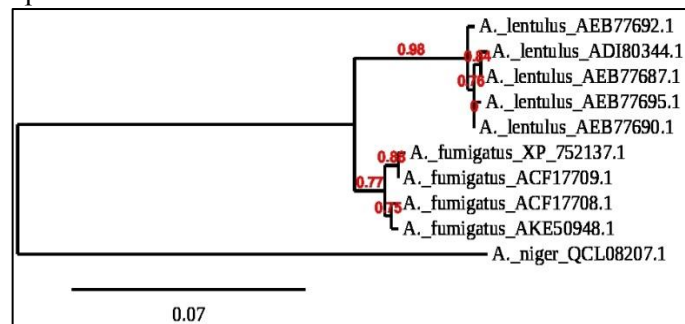


Рис. 1. «Филограмма», отражающая сходства и различия первичных последовательностей ферментов типа СУР51А штаммов *A. fumigatus* и *A. lentulus*. СУР51 *A. niger* – «внегрупповая» ветвь. Обозначены номера последовательностей. Цифровые индексы на масштабном отрезке и местах разветвления – условный показатель дистанции последовательностей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные различия в результатах «неферментативного протеолиза» СУР51А *A. lentulus* и *A. fumigatus* являются обоснованием применения протокола экстракции-протеолиза-масс-спектрометрии для экспертной идентификации этих грибов с контрастно различающейся антимикотической чувствительностью в клиническом анализе. В дальнейшем целесообразно оценить возможности такого подхода для дифференцировки других актуальных возбудителей ИМ.

Муравьиная кислота в качестве протеолитического агента избрана по ряду причин. Препараты протеаз дорогостоящие, имеют ограниченный срок годности, требуют специальных условий хранения и транспортировки. Для работы с муравьиной кислотой необходимы меры защиты органов дыхания, зрения и наружных покровов, однако при соблюдении элементарных принципов химической безопасности обращение с этим реагентом не вызывает проблем в рабочем процессе. Более того, коммерческие марки муравьиной кислоты имеют невысокую стоимость, а при надлежащем хранении длительно сохраняют активность. Кроме того, раствор муравьиной кислоты традиционно используют для кислотного травления клеток микромицетов и бактерий для подготовки к MALDI-TOF-масс-спектрометрии с целью видовой идентификации.

Протокол исследования, позволяющий определить различия в аминокислотной композиции СУР51А, должен состоять из ряда этапов. Принципиально такие этапы включают: 1) выращивание культуры микромицета – возбудителя ИМ (в рамках микологической диагностики); 2) разрушение клеток микромицета; 3) экстракцию (включая концентрирование, очистку) целевого продукта – СУР51А; 4)

фрагментацию белка муравьиной кислотой; 5) масс-спектрометрию пептидного перевара. На сегодня доступны различные способы разрушения клеток микромицетов, включая химические агенты, но более предпочтительные – с механическим разрушением («мельницы», прессы, центрифуги-вortexы с соударяющимися гранулами). Данный приборный элемент является, по существу, необходимым не только при реализации данного протокола, но и при проведении эффективной подготовки культуры к MALDI-TOF-масс-спектрометрии, а также при выделении ДНК для различных методов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот. Химическая обработка без механического воздействия в данных случаях позволяет получать меньший выход целевого продукта. Для высокоточного концентрирования целевого продукта доступны такие методы, как аффинная хроматография (на готовых мини-колонках, по упрощенной схеме), а также более привлекательное технически иммуно(пара)магнитное концентрирование, которое на современном этапе получило новое воплощение в приеме «immuno-MALDI» [2]. Анализ продуктов кислотного гидролиза для олигопептидов массой до 2 kDa может быть проведен с помощью двумерной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии с детектором типа «ионная ловушка», а для пептидов более крупного размера доступна электроспрей-ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия (однако требует глубокой очистки аналитов) и MALDI-TOF-масс-спектрометрия как линейного типа, так и (при наличии соответствующей функции у имеющегося прибора) в режиме TOF/TOF (MS/MS, «танденная» масс-спектрометрия).

Затронутые в этой работе виды возбудителей ИМ избраны для анализа не только в силу различий в антимикотической чувствительности, но и по причине своеобразия других фенотипических свойств. При культурально-морфологическом исследовании они слабо различимы [3]. Устройство конидиеносцев почти идентично; у *A. lentulus* отмечали иногда небольшой изгиб и сужение конидиеносца при переходе в терминальное расширение, но этот признак «терядся» в полиморфизме штаммов. Спороношение у *A. lentulus* появляется отсрочено, в колонии развито слабо, но и у *A. fumigatus* встречаются такие штаммы [4]. Наиболее объективным из доступных тестов, позволяющих отличить *A. fumigatus* от других представителей секции *Fumigati*, является оценка способности роста изолята при 50 °C [5]. Этот приём прост и не затратен, но практический опыт показывает, что для получения чёткого результата необходимо несколько суток инкубации, таким образом, получение диагностического ответа оказывается отсроченным [6]. Напротив, наши наблюдения позволили уточнить различия белков типа СУР51А *A. fumigatus* и *A. lentulus*, связанные не только с различ-

ной аффинностью этих ферментов к ингибиторам триазолам, но и видоспецифическими особенностями [7].

Продолжение работ в этом направлении позволит выявить различия в ферментах типа СУР51А у других возбудителей ОИМ, что послужит универсализации разработанного алгоритма для лабораторной диагностики микозов различной этиологии.

Для понимания возможностей внедрения представленного протокола в работу микробиологических лабораторий необходимо представить его сравнительные возможности по отношению к существующим техникам, сходным по целевому назначению. На сегодня большинство тест-систем и диагностических протоколов в сфере медицинской микологии еще не сочетают в себе возможность видовой идентификации и определение детерминант резистентности в один прием. Подобные решения разработаны, например, для диагностики туберкулеза (тест-системы на основе ПЦР в реальном времени, ДНК-микрочипов), а также для урогенитального микоплазмоза и уреоплазмоза (в форме панели с упрощенной биохимической идентификацией и разведениями антибиотиков). В отношении возбудителей аспергиллеза, в том числе затронутых в данном исследовании, такое сочетание пока не достигнуто. Традиционная морфологическая идентификация после получения колоний, которая включает анализ свойств колонии, а также микроскопию препарата из культуры, при наличии достаточного опыта микробиолога занимает 15-20 минут. Однако получаемый ответ имеет доверительную, а не гарантированную вероятность. Устанавливаемый таким образом таксон обычно соответствует наиболее частому виду среди группы внутри рода: *A. niger* – секция *Nigri* (с двумя рядами стеригм); *A. fumigatus* – секция *Fumigati*; *A. glaucus* – секция *Aspergillus* (телеоморфный род *Eurotium*) и т. д. (в данном случае избранные модельные микромицеты – *A. fumigatus* и *A. lentulus* – практически не различимы). Идентификация *Aspergillus* spp. с помощью MALDI-TOF-MS существенно облегчает получение ответа для микробиолога с ограниченной практикой обращения с культурами микроскопических грибов, а также позволяет определить плеоморфные штаммы аспергиллов, иногда встречающиеся в практике. MALDI-идентификация *Aspergillus* spp. может быть выполнена для культур на плотной или жидкой питательной среде (в последнем случае может потребоваться рекультивирование от 24 ч). Практические наблюдения показывают, что она занимает около 40-60 минут (включая процесс экстракции, съемки и идентификации MALDI-масс-спектра). Масс-спектро-профили (МСП) *A. fumigatus* включены практически во все коммерческие диагностические базы (библиотеки) для микробиологических целей, но на данный пери-

од лишь одна база типовых МСП дает возможность идентифицировать *A. lentulus*.

Собственная разработка сотрудников НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина позволила частично объединить в себе и возможность видовой идентификации, и принадлежность к группе штаммов с определенным фенотипом лекарственной (противогрибковой) чувствительности [8]. Удалось установить, что у некоторых видов *Aspergillus spp.* особенности MALDI-масс-спектра коррелируют с определенными диапазонами минимальных ингиби-

рующих концентраций итраконазола и амфотерицина В. На рисунке 2 отражен данный феномен для выборки изолятов *A. niger*, для которых чувствительность к итраконазолу выявили по рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2021)» (<https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf>). Кроме того, на рисунке 2 показано взаимное отношение различных форм представления группы масс-спектров.

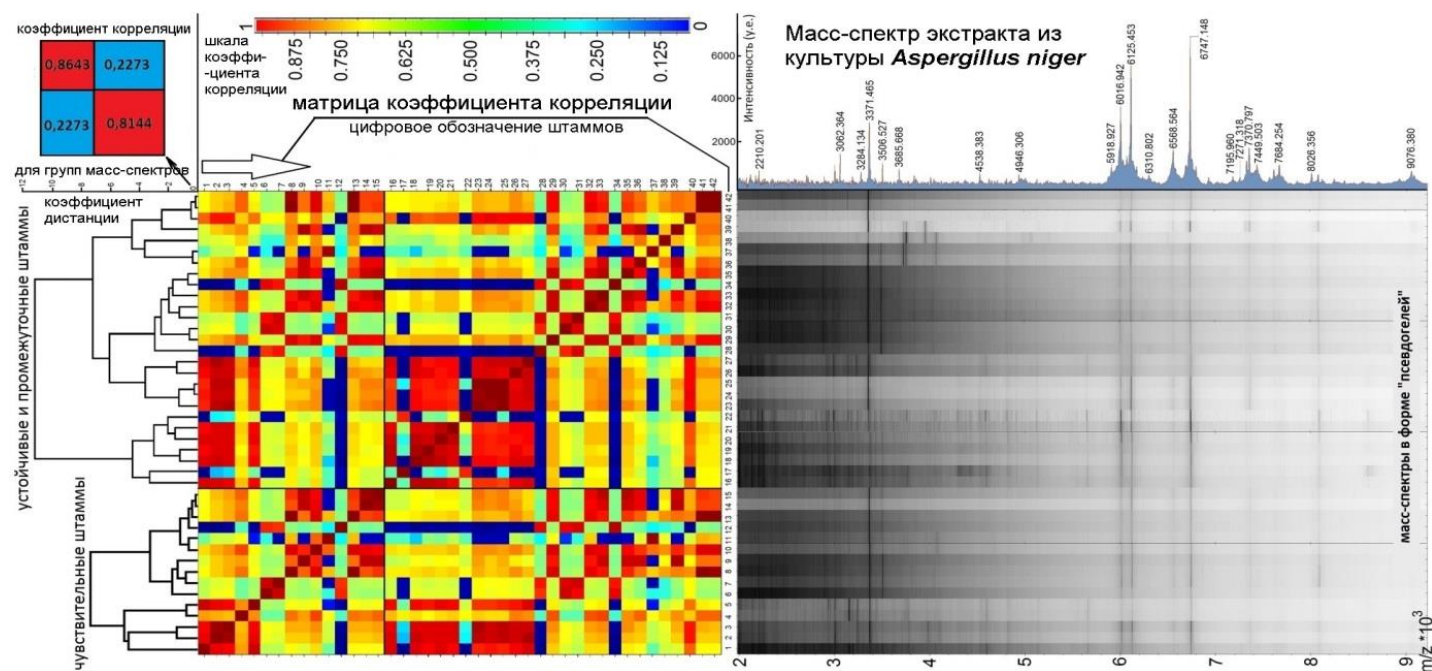


Рис. 2. Распределение MALDI-масс-спектров штаммов *A. niger* с различной чувствительностью к итраконазолу (по материалам сообщения на 8th Advances Against Aspergilliosis, с изменениями [8]). Объяснение в тексте.

В левом верхнем углу помещен отдельный типичный MALDI-масс-спектр коллекционного штамма *A. niger* (размечены величины m/z), ниже – группа масс-спектров устойчивых и чувствительных штаммов в форме «псевдогелей»: полосы псевдогелей соответствуют пикам спектра. Левее представлена матрица сложного коэффициента корреляции (КК) для попарного сравнения MALDI-масс-спектров в выборке, в большой матрице каждый штамм (своим масс-спектром) показан индивидуально, виден выраженный полиморфизм внутри групп. У левого края матрицы расположены соответствующие каждой группе дендрограммы иерархической кластеризации (эвклидова дистанция, объединение по Уорду). В левом верхнем углу представлена малая матрица коэффициента корреляции, отображающая сравнение групп MALDI-масс-спектров штаммов чувствительных, устойчивых и промежуточных к избранному препарату (на большой матрице эти группы разделены темными линиями). На данной малой матрице отражен ключевой итог анализа: у групп MALDI-масс-спектров штаммов *A.*

niger с различной чувствительностью к итраконазолу, при их относительной гомогенности (высокие значения КК), имеются выраженные различия (низкое значение КК). Таким образом, собранные в данном исследовании МСП штаммов *A. niger* (и других групп *Aspergillus spp.*, для которых такой эффект получен), можно использовать для комплектования специальной базы МСП (например, созданной НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина базы «AMPSL» [9]), позволяющей после такой доработки одновременно с процессом видовой идентификации отнести изолят к группе с определенным фенотипом чувствительности.

Ранее методология MALDI-TOF-MS для оптимизации протоколов определения противогрибковой чувствительности *Aspergillus spp.* и *Candida spp.* (в большей степени) внедрена на уровне сравнения штаммов (также типа построения матриц коэффициента корреляции), выращенных в питательной среде с различными разведениями антимикотиков [10-14]. Ряд авторов в своих работах высказывается критически об этом приеме, указывая на отсутствие у него

явных преимуществ перед традиционным протоколом определения антимикотической чувствительности [14].

Более ранние версии таких протоколов занимали 1,5-2 рабочие смены микробиолога и больше подходили для круглосуточных лабораторий [10], а более поздние версии уже позволили производить тестирование за одну рабочую смену [11]. Однако в последнем случае такой подход разработали только для представителей рода *Candida*, а не для других возбудителей ИМ. Обнаружение принадлежности к определенному резистентному генотипу (фенотипу) с помощью MALDI-TOF-MS по обычному масс-спектру клеточного экстракта (для идентификации) в зарубежной литературе пока было высказано только на уровне гипотезы для *Candida auris* [13].

Перспективная, сравнительно быстрая технология ДНК-микрочипов разработана для идентификации возбудителей ИМ [15-17], но для определения детерминант резистентности опыт ее использования пока очень ограничен [18].

Для разработанного нами алгоритма с учетом современных средств проведения анализа предполагаем возможность исполнения исследования за одну стандартную рабочую смену врача-микробиолога. О необходимости использования в лаборатории гомогенизатора клеток указано выше, а широкое внедрение протоколов с иммуномагнитным концентрированием позволит разработать и другие приемы микробиологического анализа, основанные на прецизионной детекции и изучении свойств полипептидов. Таким образом, предлагаемый алгоритм имеет по-

тенциальные связи с перспективными тенденциями развития диагностической медицинской микробиологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема лечения инвазивных микозов в современных условиях все более и более осложняется резистентностью микромицетов – возбудителей к противогрибковым препаратам. При ряде патологий данного круга как можно более раннее назначение эффективной этиотропной терапии является единственной мерой, обеспечивающей выживание пациента. Поэтому разработку быстрых средств и методов выявления детерминант резистентности возбудителей ИМ как природных, так и приобретенных следует считать приоритетной задачей развития лабораторной микологии в России.

Эволюция основных возбудителей ИМ, в результате которой они приобрели способность разрушать ткани организма человека и животных, а в дальнейшем – адаптироваться к этиотропному терапевтическому воздействию, привела к появлению уникальных для отдельных групп и видов микромицетов аминокислотных сайтов в белках вирулентности и резистентности. Данное обстоятельство делает внедрение современных физико-химических технологий для индикации и исследования свойств микробных полипептидов в сферу диагностической микробиологии не только оправданным, но и необходимым.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рябинин И.А., Чернец Е.В., Лунина С.С. Исследование свойств препарата каталазы методом tandem MALDI-TOF-масс-спектрометрии с лазерной фрагментацией. Материалы IV Национального конгресса бактериологов и международного симпозиума «Микроорганизмы и биосфера «Microbios-2018». Омск, 2018; с. 61. [Ryabinin I.A., Chernets E.V., Lunina S.S. Study of the properties of the catalase preparation by tandem MALDI-TOF mass-spectrometry with laser fragmentation. Proceedings of the IV National Congress of Bacteriologists and the International Symposium «Microorganisms and the Biosphere «Microbios-2018». Omsk, 2018; p. 61 (in Russ.)].
2. Popp R., Li H., Borchers C.H. Immuno-MALDI (iMALDI) mass-spectrometry for the analysis of proteins in signaling pathways. Expert. Rev Proteomics. 2018; 15 (9): 701-708. doi: 10.1080/14789450.2018.1516147
3. Balajee S.A., Gribskov J.L., Hanley E., et al. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot Cell. 2005; 4 (3): 625-32. doi: 10.1128/EC.4.3.625-632.2005
4. Рябинин И.А., Чилина Г.А., Богомолова Т.С., Васильев О.Д. Полиморфизм возбудителя внутрибольничного аспергиллеза – *Aspergillus fumigatus*. «Профилактическая медицина –2014». Материалы Всероссийской конференции с международным участием. 26 ноября 2014 г. / под ред. д.м.н. А.В. Силина, д.м.н. А.В. Мельцера. СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2014: 125-128. [Ryabinin I.A., Chilina G.A., Bogomolova T.S., Vasiliev O.D. Polymorphism of the causative agent of nosocomial aspergillosis - *Aspergillus fumigatus*. «Preventive medicine – 2014». Materials of the All-Russian conference with international participation. November 26, 2014. Ed. by A.V. Silin & A.V. Meltzer. SPb.: Publishing house of SZGMU n.a. I.I. Mechnikov. 2014: 125-128 (in Russ.)].
5. Рябинин, И.А. Расулова С.С. Разработка синоптического ключа для идентификации медицински значимых *Aspergillus* spp. Синергия наук. 2018; 21: 249-264. [Ryabinin I.A., Rasulova S.S. Development of synoptic key for the identification of medically significant *Aspergillus* spp. Synergy of Sciences. 2018; 21: 249-264 (in Russ.)]. <http://synergy-journal.ru/archive/article1939>

6. Рябинин И.А., Васильева Н.В., Богомолова Т.С. и др. Выявление родственных связей у клинических изолятов *Aspergillus fumigatus* Fres. и *A. niger* v. Tiegh. посредством анализа масс-спектров их протеомов. Проблемы медицинской микологии. 2014; 16 (1): 50-56. [Ryabinin I.A., Vasilyeva N.V., Bogomolova T.S., et al. Detection of relationship among clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* Fres. and *A. niger* V. Tiegh. by analysis of mass-spectra of their proteomes. Problems in Medical Mycology. 2014; 16 (1): 50-56 (in Russ.)].
7. Рябинин И.А. Структурные особенности СYP51 – маркера эпидемической опасности штаммов возбудителей микозов. Здоровье населения и качество жизни: электронный сборник материалов IV Всероссийской с международным участием заочной с научно-практической конференции. Под ред. з.д.н. РФ, проф. В.С. Лучкевича. СПб., 2017: с. 269-277. [Ryabinin I.A. Structural features of CYP51 as a marker of the epidemic danger of strains of mycotic pathogens. Health of the population and quality of life: electronic collection of materials of the IV All-Russian scientific and practical correspondence conference with international participation. Ed. by h.d.s prof. V.S. Luchkevich. SPb., 2017: 269-277. (in Russ.)].
8. Vasilyeva N.V., Riabinin I.A., Bogomolova T.S., Borzova J.V. Mass-spectrometric differences of *Aspergillus* spp. with different sensitivity to itraconazole and amphotericin B. *Aspergillus & Aspergillosis Website*. 2018. Mode of access: https://www.aspergillus.org.uk/conference_abstracts/mass-spectrometric-differences-of-aspergillus-spp-with-different-sensitivity-to-itraconazole-and-amphotericin-b/.
9. Vasilyeva N.V., Riabinin I.A., Alieva L.V., et al. Development of main spectral profiles database for MALDI-identification of common aspergillosis causative agents from the colonies obtained in liquid medium. 9th Advances Against Aspergillosis and Mucoromycosis. Abstract Book. Lugano, 2020: 240-241. <https://aaam2020.org/wp-content/uploads/2020/03/Poster-157.pdf>.
10. De Carolis E., Vella A., Florio A.R., et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50 (7): 2479-83. doi: 10.1128/JCM.00224-12
11. Vella A., De Carolis E., Vaccaro L., et al. Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51 (9): 2964-9. doi: 10.1128/JCM.00903-13
12. Vella A., De Carolis E., Mello E., et al. Potential use of MALDI-ToF mass spectrometry for rapid detection of antifungal resistance in the human pathogen *Candida glabrata*. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 9099. doi: 10.1038/s41598-017-09329-4
13. Delavy M., Dos Santos A.R., Heiman C.M., et al. Investigating Antifungal Susceptibility in *Candida* Species With MALDI-TOF MS-Based Assays. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9: 19. doi: 10.3389/fcimb.2019.00019
14. Gitman M.R., McTaggart L., Spinato J., et al. Antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* spp. by using a Composite Correlation Index (CCI)-Based Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry method appears to not offer benefit over traditional broth microdilution testing. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55 (7): 2030-2034. doi: 10.1128/JCM.00254-17
15. Spiess B., Seifarth W., Hummel M., et al. DNA microarray-based detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 (11): 3743-53. doi: 10.1128/JCM.00942-07
16. Sakai K., Trabasso P., Moretti M.L., et al. Identification of fungal pathogens by visible microarray system in combination with isothermal gene amplification. *Mycopathologia.* 2014; 178 (1-2): 11-26. doi: 10.1007/s11046-014-9756-2
17. Sturaro L.L., Gonoï T., Busso-Lopes A.F., et al. Visible DNA microarray system as an adjunctive molecular test in identification of pathogenic fungi directly from a blood culture bottle. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56 (5): e01908-17. doi: 10.1128/JCM.01908-17
18. Tsai H.F., Sammons L.R., Zhang X., et al. Microarray and molecular analyses of the azole resistance mechanism in *Candida glabrata* oropharyngeal isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54 (8): 3308-17. doi: 10.1128/AAC.00535-10.

Поступила в редакцию журнала 20.03.2023

Принята к печати 27.03.2023



Для цитирования: Хостелиди С.Н., Козлова О.П., Адильгереев И.А., Ровинский Ф.А., Ковыршин С.В., Успенская О.С., Сатурнов А.В., Рябыкина О.Е., Ружинская О.С., Мошкевич И.Р., Тараскина А.Е., Богомолова Т.С., Чилина Г.А., Босак И.А., Выборнова И.В., Оганесян Э.Г., Мелехина Ю.Э., Климко Н.Н. Инвазивный микоз, обусловленный *Blastobotrys adenivorans*. Описание клинического случая и обзор литературы. Проблемы медицинской микологии. 2023; 25 (1): 12-18. DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-12-18

For citation: Khostelidi S.N., Kozlova O.P., Adilgereev I.A., Rovinsky F.A., Kovyrshin S.V., Uspenskaya O.S., Saturnov A.V., Ryabykina O.E., Ruzhinskaya O.S., Moshkevich I.R., Taraskina A.E., Bogomolova T.S., Chilina I.A., Bosak I.A., Vybornova I.V., Melekhina Yu.E., Klimko N.N. Invasive mycosis caused by *Blastobotrys adenivorans*. Case report and literature review. Problems in Medical Mycology. 2023; 25 (1): 12-18. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-12-18

ИНВАЗИВНЫЙ МИКОЗ, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ *BLASTOBOTRYS ADENINIVORANS*. ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

¹Хостелиди С.Н. (доцент)*, ¹Козлова О.П. (доцент), ¹Адильгереев И.А. (студент), ¹Ровинский Ф.А. (студент), ¹Ковыршин С.В. (студент), ²Успенская О.С. (зав. отд.), ²Сатурнов А.В. (зав. отд.), ²Рябыкина О.Е. (врач-гематолог), ²Ружинская О.С. (врач-гематолог), ²Мошкевич И.Р. (врач-бактериолог), ¹Тараскина А.Е. (зав. лаб.), ¹Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ¹Чилина Г.А. (зав. лаб.), ¹Босак И.А. (с.н.с.), ¹Выборнова И.В. (н.с.), ¹Мелехина Ю.Э. (доцент), ¹Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова; ²Ленинградская областная клиническая больница, Санкт-Петербург, Россия

*В статье представлен случай клинического наблюдения инвазивного микоза, обусловленного редким дрожжевым возбудителем – *Blastobotrys adenivorans*, у пациентки с острым лейкозом. Основным фактором риска развития инвазивного микоза был длительный агранулоцитоз. Диагноз установили на основании повторного выделения культуры гриба из крови. Проведенная антимикотическая терапия была неэффективна.*

Ключевые слова: *Blastobotrys adenivorans*, редкие дрожжи, MALDI-TOF масс-спектрометрия, ДНК-секвенирование, острый миелобластный лейкоз, инвазивный микоз, фунгемиа

INVASIVE MYCOSIS CAUSED BY *BLASTOBOTRYS ADENINIVORANS*. CASE REPORT AND LITERATURE REVIEW

¹Khostelidi S.N. (associate professor), ¹Kozlova O.P. (associate professor), ¹Adilgereev I.A. (student), ¹Rovinsky F.A. (student), ¹Kovyrshin S.V. (student), ²Uspenskaya O.S. (head of the clinical department), ²Saturnov A.V. (head of the clinical department), ²Ryabykina O.E. (hematologist), ²Ruzhinskaya O.C. (hematologist), ²Moshkevich I.R. (bacteriologist), ¹Taraskina A.E. (head of the laboratory), ¹Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ¹Chilina G.A. (head of the laboratory), ¹Bosak I.A. (senior scientific researcher), ¹Vybornova I.V. (scientific researcher), ¹Melekhina Yu.E. (associate professor), ¹Klimko N.N. (head of the department)

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; ²Leningrad Regional Clinical Hospital, St. Petersburg, Russia

*The article presents a case of clinical observation of invasive mycosis caused by a rare yeast pathogen – *Blastobotrys adenivorans*, in a patient with acute leukemia. The main risk factor for the development of invasive mycosis was prolonged agranulocytosis. The diagnosis was established on the basis of repeated isolation of the fungal culture from blood. The conducted antimycotic therapy was ineffective.*

Key words: *Blastobotrys adenivorans*, rare yeast, MALDI-TOF mass spectrometry, DNA sequencing, acute myeloblastic leukemia, invasive mycosis, fungemia

* Контактное лицо: Хостелиди Софья Николаевна, e-mail: sofianic@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Микотические инфекции, вызванные редкими дрожжевыми возбудителями (не относящимися к *Candida* spp. и *Cryptococcus* spp.), все чаще наблюдаются по всему миру. В 2021 г. опубликованы международные рекомендации по диагностике и лечению микозов, обусловленных редкими дрожжами, включая *Geotrichum* spp., *Saprochate/Magnusiomyces* spp., *Trichosporon* spp., *Kodamaea ohmeri*, *Malassezia* spp., *Pseudozyma* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp., *Sporobolomyces* spp. [1]. Однако среди возбудителей инвазивных микозов встречаются и более редкие виды дрожжей. Идентификация этих грибов при выделении из биоматериалов больных представляет проблему для микробиологических лабораторий, так как в базах данных биохимических анализаторов и приборов для масс-спектрометрии они отсутствуют. Необходимо применять молекулярно-генетические методы исследования.

В классическом трехтомном определителе дрожжей, вышедшем в 2011 г. под редакцией Курцмана К., Фелла Дж. и Бекута Т. [2], *Blastobotrys adeninivorans* описан в разделе, посвященном анаморфным родам и видам аскомицетов [3]. Первоначально гриб назвали *Trichosporon adeninivorans* (Middelhoven W.J., Hoogkamer-Te Niet M.C., Kreger-Van Rij N.J., 1984) из-за морфологического сходства с представителями рода *Trichosporon* (формирование мицелия, артроспор). Позднее вид был перенесен в род аскомицетовых дрожжей *Arxula* (*A. adeninivorans*) (Van der Walt J.P., Smith M.T., Yamada Y., 1990), а затем, на основании филогенетических исследований, включен в род *Blastobotrys* (*B. adeninivorans*) (Kurtzman C.P., Robnett C.J., 2007).

В статье представлен первый случай диссеминированного микоза, вызванного *B. adeninivorans*, у пациентки с острым лейкозом в России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Представлен клинический случай инвазивного микоза, вызванного *B. adeninivorans*, у больной острым лейкозом на фоне цитостатической химиотерапии. Для постановки диагноза инвазивного микоза использовали клинические и лабораторные критерии EORTC/MSG, 2020 [4]. Также авторы провели анализ данных научной литературы в базах PubMed, ClinicalKey и e-library (декабрь 2022 г.).

При обследовании пациентки применяли методы клинической, инструментальной и лабораторной диагностики. Провели компьютерную томографию (КТ) лёгких, околоносовых пазух, магнитно-резонансную томографию (МРТ) органов брюшной полости и головы. Лабораторная диагностика состо-

яла из микроскопического, культурального и патогистологического исследований.

Выполняли повторные посевы крови с инкубацией в гемокультиваторе BactAlert, посевы бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), перитонеальной жидкости, раневого отделяемого мочи. Проведен тест на галактоманнан *Aspergillus* spp. в сыворотке крови. Идентификацию выделенных культур грибов и бактерий выполняли методами MALDI-TOF масс-спектрометрии (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry) и ДНК-секвенирования.

Поиск информации осуществляли по следующим ключевым словам: *Trichosporon adeninivorans*, *Arxula adeninivorans*, *Blastobotrys adeninivorans*, редкие дрожжеподобные возбудители, острый лейкоз, острый миелобластный лейкоз, микотический сепсис, инвазивный микоз, фунгемия.

Описание клинического случая

Пациентка В., возраст – 61 год, госпитализирована в гематологическое отделение Ленинградской областной клинической больницы (ЛОКБ) с диагнозом «острый лейкоз» 3 августа 2022 г. При поступлении предъявляла жалобы на субфебрильную температуру, нарастание общей слабости, одышку, усиливающуюся при физической нагрузке, постепенное нарастание профузной ночной потливости, ощущение сердцебиения, боли в животе, кровоточивость десен, появление спонтанных гематом, петехий на туловище.

При объективном осмотре общее состояние относительно удовлетворительное. Кожные покровы сухие, обычной окраски. Лимфатические узлы не увеличены. Дыхание самостоятельное. Над областью лёгких дыхание жесткое, проводится во все отделы, хрипов нет, частота дыхательных движений – 22 в минуту. Сатурация – 94%. При аускультации сердца тоны ясные, ритмичные, шумов нет. Артериальное давление – 120/80 мм рт.ст. Частота сердечных сокращений – 120 в мин. Живот при пальпации мягкий, перистальтические шумы отсутствуют. Печень и селезенка не увеличены. Отеки нижних конечностей. Температура тела – 36,2 °С.

Из анамнеза заболевания выяснено, что пациентка считает себя больной с начала июля 2022 г., когда впервые отметила появление вышеперечисленных жалоб. При обращении к терапевту по месту жительства была обнаружена гепатомегалия. В клиническом анализе крови: эритроциты – $2,97 \times 10^{12}$ /л, гемоглобин – 100 г/л, тромбоциты – 17×10^9 /л, лейкоциты – $158,4 \times 10^9$ /л (бласты – 3%, промиелоциты – 4%, миелоциты – 6%). Пациентка была госпитализирована в терапевтическое отделение Киришской клинической межрайонной больницы.

При дообследовании выявлены признаки почечной и печеночной недостаточности (креатинин – 310 мкмоль/л, мочевины – 16,1 ммоль/л, АЛТ – 103 Ед/л, АСТ – 105 Ед/л). По данным миелограммы: бласты – 47,4%. Была начата инфузионная терапия и согласован перевод в Ленинградскую областную больницу (ЛОКБ) на онкогематологическое отделение №2.

В ЛОКБ в клиническом анализе крови: лейкоциты – $203,5 \times 10^9$ /л (бласты – 33%, промиелоциты – 4%, миелоциты – 2%, метамиелоциты – 1%, палочкоядерные – 2%, сегментоядерные – 17%, лимфоциты – 4%, моноциты – 37%); в биохимическом анализе крови: ЛДГ – 3105 Ед/л, креатинин – 242 мкмоль/л, мочевины – 18,03 ммоль/л, АЛТ – 50,1 Ед/л, АСТ – 41,0 Ед/л, амилаза – 127, СРБ – 18,08 мг/л.

Был диагностирован острый моноцитарный лейкоз – М5 по классификации Fab.

При дополнительном обследовании на КТ грудной полости обнаружены множественные разноплотностные плевроппульмональные тяжи в обоих легких в краниокаудальном направлении, очаг в S9 левого легкого, аортосклероз и коронаросклероз.

По данным ультразвукового исследования органов брюшной полости: гепатоспленомегалия, умеренные диффузные изменения паренхимы печени, незначительные диффузные изменения паренхимы поджелудочной железы; одиночное кистозное включение левой доли печени; одиночный лимфоузел ворот печени – $2,4 \times 0,8$ см.

С 05.08.22 г. начата инфузионно-метаболическая и циторедуктивная терапия (гидроксимочевина – 6 гр/сут.). Также проводили гемоконпонентную заместительную терапию (вводили эритроцитную массу, тромбоцитарную массу, свежезамороженную плазму).

На следующие сутки (06.08.22) у пациентки развилась фебрильная нейтропения, и было принято решение об антибактериальной терапии пиперациллином и тазобактамом. В этот же период была начата профилактика оппортунистических инфекций (ко-тримоксазол, ацикловир, флуконазол) в стандартных дозах. Был установлен центральный венозный катетер (ЦВК). Выполнена эхокардиография: фракция выброса – 69%, концентрическое ремоделирование стенок левого желудочка, умеренные атеросклеротические изменения аорты, створок артериального и митрального клапана. В общем анализе ликвора: цитоз – 0,6 (100% лимфоциты). На МРТ (07.08.22 г.) головного мозга очаговых изменений не выявили.

На 5 сутки госпитализации начат курс полихимиотерапии (ПХТ) – «7+3 mito» (цитозар – 200 мг/м^2 (400 мг), митоксантрон – 10 мг/м^2 (20 мг) + метотрексат 15 мг (однократно), цитарабин – 30 мг, дексаметазон – 4 мг. Через три дня от старта ПХТ у па-

циентки появились спастические боли в животе и диарея до 4 раз в сутки, что расценили как развитие энтероколита смешанного генеза и начали лечение метронидазолом и ванкомицином.

На 8 сутки госпитализации наблюдали повторный эпизод лихорадки выше $38,5^\circ\text{C}$, в связи с чем произведена коррекция антибактериальной терапии с заменой на пиперациллин, меропенем, была начата антифунгальная профилактика вориконазолом 400 мг в сутки, с нагрузочной дозой 800 мг в первые сутки.

На 10 сутки госпитализации (15.08.22 г.), в связи с нарастанием абдоминальной симптоматики, к терапии добавили альфа-нормикс 400 мг 3 раза в сутки и спазмолитики, с положительным эффектом. Однако через 3 дня (на 13 сутки) было отмечено нарастание белково-энергетической недостаточности, в том числе развитие значимой гипоальбунемии. Начато заместительное введение альбумина и энтеральное питание.

22.08.22 г. (19 сутки госпитализации) с учетом сохраняющихся симптомов интоксикации (субфебрилитета до $37,7^\circ\text{C}$) пациентке был выполнен ПЦР тест на SARS-CoV-2. На основании положительного ПЦР теста выставлен диагноз «коронавирусная инфекция COVID-19», и проведен курс противовирусной терапии ремдесивиром. В этот же период начали введение колониестимулирующего фактора (филграстим). Выполнен тест на галактоманнан в крови – результат отрицательный.

Несмотря на введение стимуляторов гемопоэза, в клиническом анализе крови сохранялись агранулоцитоз и лимфоцитопения. В биохимическом анализе крови значительно повышен уровень СРБ (206 мг/л) и прокальцитонина (9,7 нг/мл), а также сохранялись высокие значения креатинина (169 мкмоль/л) и мочевины (12,7 ммоль/л). На основании клинических и лабораторных данных критерияльно верифицирован микробиологически неидентифицированный сепсис. В связи с чем 27.08.22 г. (24 сутки госпитализации), на фоне нарастания признаков полиорганной недостаточности, пациентка была переведена в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ).

В условиях ОРИТ вориконазол был отменен, в качестве эмпирической терапии инвазивного кандидоза назначен микафунгин (100 мг в сутки в/в капельно). Была скорректирована антибактериальная терапия (авибактам+цефтазидим, тигециклин, азтреонам).

28.08.22 г. выполнили рентгенконтрастное исследование органов брюшной полости, где отмечали прогрессирование пареза кишечника. На КТ органов грудной полости: правосторонний гидроторакс, пневмофиброз, субсегментарные ателектазы. В биохимическом анализе крови: вновь рост прокальцитонина до 18,05 нг/мл.

На 25 сутки госпитализации была выполнена смена ЦВК (на 20 день после постановки). В этот же период отметили восстановление общего числа лейкоцитов до $1,59 \times 10^9/\text{л}$, нейтрофилов – $1,35 \times 10^9/\text{л}$ сохранялась лимфоцитопения – $0,2 \times 10^9/\text{л}$.

29.08.22 г. (26 сутки госпитализации) проведена операция верхне-срединной лапаротомии, в брюшной полости – около литра серозно-геморрагического выпота без фибрина, выявлены множественные язвенно-некротические изменения без перфорации проксимальных отделов тонкой кишки, выполнена резекция нежизнеспособной части тонкой кишки.

30.08.22 г. и 31.08.22 г. – серия повторных релапаротомий с целью ушивания ранее выявленных участков язв в связи с перфорацией. Наложено 2 анастомоза «бок-в-бок» и «конец-в-конец». Повторные исследования крови на стерильность – отрицательны.

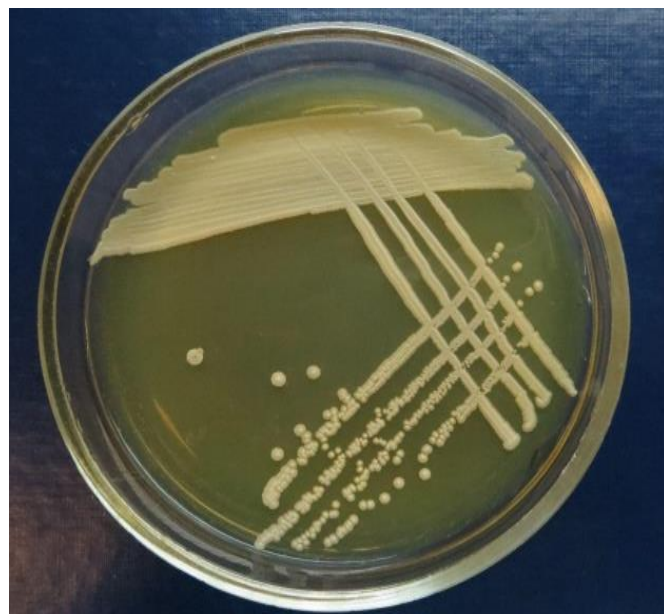
На 28 сутки госпитализации (01.09.22 г.) пациентка не лихорадила, наблюдали восстановление уровня сознания, гемодинамика стабильная без инотропной поддержки, продолжали искусственную вентиляцию лёгких (ИВЛ) в связи с неэффективностью самостоятельного дыхания.

Из образца крови, взятого 27.08.22 г. из ЦВК, получен рост дрожжеподобных грибов, морфологически сходных с *Candida* sp. (наличие псевдомицелия и дрожжевых почкующихся клеток) и *Trichosporon* sp. (наличие септированного мицелия). Определить вид возбудителя методом MALDI-TOF масс-спектрометрии не удалось, в связи с чем культура была передана в НИИ медицинской микологии П.Н. Кашкина для идентификации молекулярно-генетическим методом.

На 33 сутки (06.09.22 г.) ПЦР тест на SARS-CoV2 – отрицательный. В связи с нарастанием почечной недостаточности инициирован гемодиализ.

07.09.22 г. в посеве мочи отмечен рост *Candida guilliermondii*, из зева – рост *Candida* spp. Пациентка консультирована клиническим микологом: на основании наличия факторов риска, клинических и лабораторных данных диагностирован диссеминированный микоз, вызванный дрожжеподобным микромицетом. Рекомендовано усилить антимикотическую терапию комбинацией эхинокандинов и вориконазола (до получения результатов чувствительности культуры из крови), стартовая доза – 800 мг в 1 сутки, затем – 400 мг в сутки. Проведена повторная смена ЦВК (на 12-е сутки от постановки).

Методом секвенирования региона ITS рибосомальной ДНК возбудитель идентифицирован как *Blastobotrys adeninivorans* (Рис. 1).



А)



Б)

Рис. 1. Культуральные и морфологические особенности штамма *Blastobotrys adeninivorans*, выделенного из крови пациентки В. А) Культура *B. adeninivorans* на среде Сабуро. 3 сут., 35 °С. Б) Микроморфология: 1 – септированный мицелий; 2 – бластоконидии; 3 – дрожжевые почкующиеся клетки (увеличение $\times 1000$).

Описание культуры *B. adeninivorans*.

На агаре Сабуро культура желтовато-белая, покрыта коротким пушком, край бахромчатый (Рис. 1А). При микроскопии культуры можно обнаружить дрожжевые почкующиеся клетки округлой и овальной формы, размеры клеток – $2,0-2,5 \times 4,0-4,8$ мкм. Имеется обильный разветвленный септированный мицелий, диаметр гиф – $2,0-2,5$ мкм, по бокам которого или на коротких зубчиках расположены сферические и овоидные бластоконидии размером $1,7-2,4 \times 2,5-4,7$ мкм (Рис. 1Б).

С помощью колориметрической панели Auxacolor™ 2 (BioRad) установлено, что штамм ассимилирует большое количество источников угле-

рода: глюкозу, мальтозу, сахарозу, галактозу, раффинозу, инозит, целлобиозу, трегалозу, адонит, меллицитозу, ксилозу, арабинозу, не ассимилирует лактозу. Растет при 40 °С.

По фенотипическим свойствам штамм соответствует описанию, приведенному в Определителе дрожжей [2].

Методом микроразведений по протоколу EUCAST E.def.7.3.2 (2020) для штамма *B. adenivorans* установлены минимальные подавляющие концентрации (мг/л): амфотерицина В – 0,25, флуконазола – 32, вориконазола – 0,5, позаконазола – 0,03, каспофунгина – 0,03.

При последующих посевах крови *B. adenivorans* был выделен еще трижды (последний высеив из крови от 20.09.22 г.), а также из центрального венозного катетера.

При посеве других биосубстратов (БАЛ, отделяемого из дренажей) грибы не обнаружили.

Для выявления/исключения очагов диссеминации проводили КТ органов грудной полости (09.09.22 г.). Выявили инфильтративные изменения в обоих легких с консолидацией в нижних отделах, малый гидроторакс справа. На КТ органов брюшной полости обнаружили кистозное образование левой доли печени (7 мм) и правой почки (14 мм), конкремент лоханки левой почки, диффузные изменения поджелудочной железы. МРТ головы: данных за очаговые изменения головного мозга нет.

В биохимическом анализе крови снова отмечен рост СРБ более 200 мг/л, прокальцитонин – 20,3 нг/мл.

10.09.22 г. были получены результаты гистологического исследования послеоперационного материала (стенки резецированной кишки №О06008/22): некроз стенки тонкой кишки с фибринозным перитонитом, в краях резекции некротических изменений не обнаружено.

Повторная консультация миколога от 12.09.22 г. (40 сутки госпитализации): по результатам дообследования очаги диссеминации не обнаружены; на основании теста чувствительности к антимикотикам комбинированную терапию рекомендовано продолжить с учетом перехода на внутривенную форму вориконазола. Пациентке была продолжена комбинированная терапия микафунгином – 100 мг/сутки и вориконазолом – 400 мг/сутки.

На 43 сутки госпитализации (16.09.22 г.) в миелограмме: миелокарициты – 160, бласты – 0,6%, констатировано достижение ремиссии с неполным восстановлением гемопоэза. В тоже время нарастали явления перитонита.

22.09.22 г. проведена релапаротомия, ушивание острой язвы тонкой кишки, санация и дренирование брюшной полости. При посеве перитонеальной жидкости получен обильный рост бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, из операционной раны – обильный рост *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *E. cloacae*.

В послеоперационном периоде нарастали признаки полиорганной недостаточности, гемодинамика была нестабильная, требовала увеличения дозы вазопрессоров и, несмотря на проводимые реанимационные мероприятия, 22.09.22 г. в 19:10 была констатирована биологическая смерть.

В посмертном посеве крови получен обильный рост бактерий *K. pneumoniae*, *E. cloacae* и рост единичных колоний дрожжевого гриба.

Общая продолжительность антимикотической монотерапии микафунгином составила 12 дней, комбинированной антимикотической терапии (микафунгин и вориконазол) – 16 дней.

ОБСУЖДЕНИЕ

B. adenivorans – термотолерантные, осмо- и ксерофильные дрожжи, обладающие метаболической гибкостью. Используют широкий спектр источников углерода и азота, способны деградировать *n*-бутанол, пурины. Применяются в биотехнологии и фундаментальных генетических исследованиях. Обнаружены в почве и гидролизатах древесины, силосе [2, 5].

Нами представлен первый случай инвазивного микоза, обусловленного *B. adenivorans*, выявленный в России.

Грибковые инфекции, вызванные видами рода *Blastobotrys*, встречаются крайне редко. Как следует из данных литературы, приведенных в таблице, заболевание развивается преимущественно у иммунокомпрометированных больных, у пациентов с муковисцидозом после трансплантации легких и при перитонеальном диализе.

Таблица 1

Опубликованные клинические случаи инвазивных микозов, вызванных *Blastobotrys* spp.

Публикация	Пол, возраст	Основное заболевание, факторы риска	Клинический вариант, вид возбудителя	Лечение	Исход
Quirin N., et al. 2007 [6] Франция	Муж. 46 лет	Хронический перитонеальный диализ	Перитонит, <i>Blastobotrys proliferans</i>	Липосомальный амфотерицин В 3 мг/кг/сут. 3 недели	Излечение
Wong J.Y., et al. 2014 [7] Канада	ребенок	Муковисцидоз, трансплантация легкого	Пневмония, плеврит, <i>Blastobotrys raffinosisfermentans</i>	Амфотерицин В 0,3 мг/кг/сут.	Излечение
Kumar A., et al. 2014 [8] Индия	муж. 29 нед.	Недоношенность, перитонеальный дренаж	Острый диссеминированный микоз, <i>Blastobotrys serpentis</i>	Флуконазол 6 мг/кг сут., амфотерицин В 1,5 мг/кг сут., вориконазол 2 мг/кг два раза в сут.	Летальный
Kumar A., et al. 2014 [8] Индия	жен. 8 лет	Рабдомиосаркома, полихимиотерапия, постоянный ЦВК	Фунгемия <i>Blastobotrys proliferans</i>	Флуконазол 10 мг/кг/сут., удаление ЦВК	Клиническое улучшение
Roehmel J.F., et al. 2015 [9] Германия	муж. 34 года	Муковисцидоз, сахарный диабет, цирроз печени	Пневмония и фунгемия, <i>Blastobotrys adenivorans</i>	Амфотерицин В 18 мг в день (0,3 мг/кг/сут.) и флуцитозин 150 мг/кг/сут.) 17 дней	Излечение
Al-Obaidi M., et al. 2021 [10] США	Жен. 27	Муковисцидоз, двусторонняя трансплантация легких, иммуносупрессивная терапия, глюкокортикостероиды	Пневмония трансплантата, плеврит, <i>Blastobotrys raffinosisfermentans</i>	Микафунгин 100 мг, ингаляции амфотерицина В – ухудшение, изавуконазол – всего антимикотическая терапия 78 дней	Излечение

В качестве возбудителей микозов человека выявлены 4 вида рода *Blastobotrys*, в том числе описан один клинический случай, обусловленный *B. adenivorans* [9].

Нами представлен первый случай инвазивного микоза, обусловленного *B. adenivorans*, выявленный в России. У больной были множественные факторы риска развития инвазивного микоза: длительные, более 20 дней, агранулоцитоз и лимфоцитопения, продолжительное применение ЦВК, ИВЛ, релапаротомии, наличие дренажей в брюшной полости, гемодиализ, длительное пребывание в ОРИТ и сопутствующая бактериемия.

По данным зарубежных авторов, *Blastobotrys* spp. наиболее часто вызывали пневмонию и плеврит, реже – перитонит и фунгемия. У описываемой нами больной мы наблюдали фунгемия, сохранявшуюся в течение четырех недель, несмотря на двукратную замену ЦВК и проводившуюся антимикотическую терапию.

Исследования клинических изолятов *Blastobotrys* spp., проведенные *in vitro*, показали низкую чувствительность этих грибов к флуконазолу: МПК – 64

мг/л и выше [8, 10]. МПК флуконазола в отношении штаммов *B. adenivorans*, выделенных из крови описываемой нами пациентки, составили 32 мг/л. По опубликованным данным, низкая чувствительность *Blastobotrys* spp. отмечена также к эхинокандинам, итраконазолу, вориконазолу и позаконазолу. Наибольшей активностью в отношении этих микромицетов *in vitro* обладают изавуконазол и амфотерицин В [10]. У наблюдаемой нами больной проводили стандартную терапию, рекомендованную для лечения инвазивных микозов, вызванных дрожжеподобными микромицетами [11]. На неблагоприятный исход лечения повлияла сопутствующая бактериемия. Данный фактор описан как отрицательный предиктор выживаемости у пациентов с редкими дрожжеподобными грибами [12].

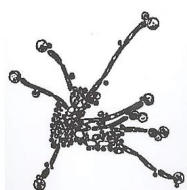
Представленный клинический случай и приведенные данные литературы показывают, что *Blastobotrys adenivorans* – новый резистентный возбудитель инвазивных микозов у иммунокомпрометированных пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chen S.C., Perfect J., Colombo A.L., et al. Global guideline for the diagnosis and management of rare yeast infections: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. *Lancet Infect. Dis.* 2021; 21: e375-86. doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00203-6
2. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (ed.) *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 5th ed. Elsevier: 2011; 2: 962.
3. Smith M.T., de Hoog G.S., Stazzell-Tallman A., Kurtzman C.P. *Blastobotrys von Klopotek*. In: Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (ed.). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5th ed. Elsevier: 2011; 2: 959-977. doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00087-2
4. Donnelly J.P., Chen S.C., Kauffman C.A., et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71: 1367- 1376. doi: 10.1093/cid/ciz1008
5. Kunze G., Gaillardin C., Czernicka M., et al. The complete genome of *Blastobotrys (Arxula) adenivorans* LS3 – A yeast of biotechnological interest. *Biotechnology for Biofuels*. 2014; 7: 66. doi: 10.1186/1754-6834-7-66
6. Quirin N., Desnos-Ollivier M., Cantin J.F., et al. Peritonitis due to *Blastobotrys proliferans* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J. Clin. Microbiol.* 2007. 45: 3453-3455. doi: 10.1128/JCM.00967-07.
7. Wong J.Y., Chambers A.L., Fuller J., et al. Successful lung transplant in a child with cystic fibrosis and persistent *Blastobotrys raffinifermentans* infection. *Pediatr. Transplant.* 2014. 18: E169-E173. doi: 10.1111/petr.12294
8. Kumar A., Babu R., Bijulal S., et al. Invasive mycosis due to species of *Blastobotrys* in immunocompromised patients with reduced susceptibility to antifungals. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52 (11): 4094-9. doi: 10.1128/JCM.01977-14
9. Roehmel J.F., Tintelnot K., Bernhardt A., et al. *Arxula adenivorans* causing invasive pulmonary mycosis and fungaemia in cystic fibrosis. *Lancet.* 2015; 385 (9976): 1476. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60260-4
10. Al-Obaidi M., Badali H., Cañete-Gibas C., et al. Pulmonary infection secondary to *Blastobotrys raffinifermentans* in a cystic fibrosis patient: Review of the literature. *Mycoses.* 2021; 64 (6): 616-623. doi:10.1111/myc.13252
11. Климко Н.Н., Рубинчик В.Е., Соболев М.М. и др. Результаты проспективного многоцентрового исследования применения анидулафунгина – ЭРА. *Проблемы медицинской микологии.* 2018; 20 (3): 21-25. [Klimko N.N., Rubinchik V.Ye., Sobol M.M., et al. Multicenter observational study on anidulafungin using – ERA (Eraxis in Russia). *Problems in Medical Mycology.* 2018; 20 (3): 21-25. (In Russ)].
12. Kuo S.H., Lu P.L., Chen Y.C., et al. The epidemiology, genotypes, antifungal susceptibility of *Trichosporon* species, and the impact of voriconazole on *Trichosporon* fungemia patients. *J. Formos. Med. Assoc.* 2021; 120 (9): 1686-1694. doi: 10.1016/j.jfma.2020.12.007

Поступила в редакцию журнала 29.03.23

Принята к печати: 03.04.2023



Для цитирования: Прокопьев В.В., Куклина Н.В., Емельянова И.В., Звездкина Г.С. Анализ культивируемых грибов кишечника у пациентов с патологией желудочно-кишечного тракта и клинически здоровых людей. 2023; 25 (1): 19-24. DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-19-24

For citation: Prokopiev V.V., Kuklina N.V., Emelyanova I.V., Zvezdkina G.S. Analysis of cultivated intestinal fungi in patients with pathology of the gastrointestinal tract and clinically healthy people. Problems in Medical Mycology. 2023; 25 (1): 19-24. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-19-24

АНАЛИЗ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ГРИБОВ КИШЕЧНИКА У ПАЦИЕНТОВ С ПАТОЛОГИЕЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА И КЛИНИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

^{1,2}Прокопьев В.В. (доцент, врач-бактериолог)*, ¹Куклина Н.В. (доцент), ³Емельянова И.В. (врач-бактериолог), ³Звездкина Г.С. (зав. лаб.)

¹Алтайский государственный медицинский университет (кафедра эпидемиологии, микробиологии и вирусологии); ²ООО КДЛ «Здоровье»; ³Краевая клиническая больница, Барнаул, Россия

В нашем исследовании мы сравнили частоту выявления плесневых грибов и дрожжей из кала пациентов с различными поражениями желудочно-кишечного тракта и от клинически здоровых людей, проходящих плановый медицинский осмотр. Выделенные с помощью культурального метода грибы были идентифицированы на основе их морфологических, культуральных свойств, а также при помощи масс-спектрометрии. Установлено, что частота обнаружения и средняя концентрация высеваемых из кала грибов существенно выше у пациентов с клиническими поражениями кишечника по сравнению с контрольной группой клинически здоровых людей. Также отмечено, что видовой состав микромицетов, выделенных из кишечника, весьма разнообразен и не ограничивается *Candida spp.* и *Aspergillus spp.* Особое внимание было обращено на грибы *Rhodotorula mucilaginosa* и *Geotrichum candidum*, частота которых в случае патологии была выше в 11,8 и 6,3 раза соответственно.

Ключевые слова: микобиота кишечника, дрожжи, плесневые грибы, масс-спектрометрия, *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula mucilaginosa*

ANALYSIS OF CULTIVATED INTESTINAL FUNGI IN PATIENTS WITH PATHOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT AND CLINICALLY HEALTHY PEOPLE

^{1,2}Prokopiev V.V. (associate professor, bacteriologist), ¹Kuklina N.V. (associate professor), ³Emelyanova I.V. (bacteriologist), ³Zvezdkina G.S. (head of the laboratory)

¹Altai State Medical University (Department of Epidemiology, Microbiology and Virology); ²LLC CDL "Health"; ³Regional Clinical Hospital, Barnaul, Russia

*In our study, we compared the incidence of molds and yeasts from the feces of patients with various lesions of the gastrointestinal tract with a group of clinically healthy people undergoing a routine medical examination. The fungi isolated by the culture method were identified based on their morphological, cultural properties, as well as by mass spectrometry. We found that the frequency of detection and the average concentration of fungi isolated from the faeces is significantly higher in patients with clinical lesions of the intestine, compared with a group of clinically healthy people. It was also noted that the species composition of the intestinal fungi found by us is very diverse, and not limited to *Candida spp.* and *Aspergillus spp.* Particular attention was paid to the fungi *Rhodotorula mucilaginosa* and *Geotrichum candidum*, the frequency of which in the case of gastrointestinal pathology was 11,8 and 6,3 times higher, respectively.*

Key words: intestinal mycobiota, yeasts, molds, mass spectrometry, *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula mucilaginosa*

ВВЕДЕНИЕ

Человек, как и другие организмы, населяющие нашу планету, находится в непрерывном взаимодействии с другими организмами. Особым вариантом этого взаимодействия является система организма человека и обитающих в нем микроорганизмов (вирусов, бактерий, архей, грибов, простейших), которые в своей совокупности получили название микробиота. В данной системе могут складываться как мутуалистические, так и паразитические отношения

* Контактное лицо: Прокопьев Василий Валерьевич, e-mail: vasily78@mail.ru

между организмом хозяина и населяющими его микроорганизмами. Все биотопы человека, контактирующие с внешней средой, в той или иной степени заселены микроорганизмами. Общая масса микробиоты человека – 0,2 кг, что составляет приблизительно 10^{14} бактерий [1], это сопоставимо с общим количеством клеток организма человека.

Микробиота кишечника является самой многочисленной в организме человека. Так, в одном грамме фекалий содержится до 10^{12} микроорганизмов, 95% из которых являются анаэробами [2]. В микробиоту кишечника входят более 700 родов бактерий и 2500 различных видов микроорганизмов [3]. Общее количество генов метагенома микроорганизмов кишечника составляет 10 миллионов, что в 100 раз больше генома человека [4, 5]. Таким образом, вполне естественно, что благодаря своему метаболизму это сообщество, зачастую значительно отличающееся от метаболизма человека, оказывает существенное влияние на физиологические функции последнего [6]. Существует мнение о том, что микробиота не поддается классификации, а находится в постоянном изменении состава [7], однако большинство ученых считает, что по своему значению микробиота кишечника может быть рассмотрена как отдельный орган или система человека, функционально связанный с другими системами организма и играющий важную роль в поддержании гомеостаза организма [8].

К основным функциям кишечной микробиоты можно отнести полостное пищеварение, барьерную функцию, синтез витаминов, обмен веществ, неврологическую активность, метаболизм фармацевтических препаратов, влияние на воспаление и иммунитет и др. [9].

В течение долгого времени изучение кишечной микробиоты осуществляли только культуральными методами, что существенно ограничивало исследование анаэробных микроорганизмов, преобладающих в желудочно-кишечном тракте. Появившиеся в последнее время методики, такие как секвенирование нового поколения (NGS) и масс-спектрометрия, позволили значительно расширить знания о таксономическом составе микроорганизмов и их роли в организме человека. На сегодняшний день основным подходом для анализа микробиоты кишечника является секвенирование участка ДНК, кодирующего 16S рибосомальную РНК, соответственно, данный метод направлен исключительно на бактериальный компонент. Таким образом, другие компоненты микробиоты кишечника (грибы, простейшие и вирусы) остаются за рамками рассмотрения.

Несмотря на всё более возрастающий интерес исследователей к микробиоте человека, изучение микробиоты кишечника встречается в ограниченном количестве работ как отечественных, так и зарубежных авторов [10]. Кроме того, даже имеющиеся статьи в большей степени посвящены исследованиям грибов рода *Candida*. Это связано не столько с распространённостью кандидозов, сколько с отсутстви-

ем или малой доступностью методик, позволяющих идентифицировать микромицеты других таксономических групп. Однако в последнее время стали появляться работы, в которых представлено влияние оппортунистических грибов, обитающих в кишечнике, на важные физиологические процессы организма человека. Так, авторами [11-13] показана роль микробиоты кишечника в индукции Т-хелперов, являющихся ключевыми клетками иммунного ответа. Подобные работы вызывают новый интерес к анализу грибов-комменсалов [14].

В нашем исследовании мы акцентировали внимание на изучении культивируемой части микробиоты [15] кишечника у пациентов с патологией желудочно-кишечного тракта по сравнению с группой клинически здоровых людей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучали видовой состав грибов в кишечнике клинически здоровых людей и пациентов с различной симптоматикой со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Исследовали 178 образцов кала на дисбиоз, выделенных от больных с диагнозами: синдром раздраженного кишечника, синдром избыточного бактериального роста, иммунодефицит неясной этиологии, дивертикулит и др. В качестве контрольной группы проанализировано 1052 образца кала, изолированных от клинически здоровых лиц, проходивших плановый медицинский осмотр. Биологически материал засеивали на среду Сабуро с 2% глюкозы и хлорамфениколом (0,04 г/л) и инкубировали 72 часа при 35 °С, далее чашки в течение трех недель хранили при комнатной температуре.

Для идентификации колоний грибов, морфологические и культуральные свойства которых позволяли предположить их принадлежность к роду *Candida*, использовали хромогенный агар фирмы HiCrome (Индия), на который засеивали выросшие на среде Сабуро колонии и инкубировали при 35 °С в течение 48 часов. Видовую принадлежность грибов оценивали согласно рекомендациям производителя: *Candida albicans* образует гладкие зеленые колонии, *C. krusei* – расплывчатые колонии пурпурного цвета, *C. tropicalis* – синие или синие с металлическим оттенком выпуклые колонии, *C. glabrata* – колонии от кремового до белого цветов.

Идентификацию плесневых грибов и, в меньшей степени, дрожжей проводили на основе их морфологических и культуральных свойств при помощи «Atlas of Clinical Fungi» de Hoog G.S., et al., 4th edition (2020) и интернет ресурса www.clinicalfungi.org.

Идентификацию дрожжей, морфологически и культурально отличных от грибов рода *Candida*, а также части плесневых грибов осуществляли при помощи масс-спектрометра Microflex производителя Bruker Daltonik GmbH & Co. KG (Германия), с уникальным программным обеспечением MALDI Biotyper, используя референтную базу данных (содержит более 2500 видов МО и 7800 штаммов).

Анализ и статистическая обработка данных был проведён при помощи расчёта доверительных интервалов в модификации Вальда с помощью программы GraphPad QuickCalc. Поскольку 95% всех значений нормального распределения лежат в пределах 1,96 стандартных отклонений от среднего, $z = 1,96$ для 95% доверительных интервалов ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методики, примененные в настоящей работе, не позволяют нам претендовать на всеобъемлющее описание видового состава кишечной микобиоты. Тем не менее полученные нами результаты в некоторой степени позволяют оценить количество и видовой состав культивируемых плесневых грибов и дрожжей кишечника человека.

Нами было обнаружено существенное отличие в частоте встречаемости, концентрации и видовом составе дрожжей и плесневых грибов у клинически здоровых людей по сравнению с группой, имевшей клиническую симптоматику со стороны ЖКТ.

Согласно полученных данным, частота встречаемости дрожжей в случае патологии составила 61,8% при средней концентрации 10^6 , в то время как у клинически здоровых лиц дрожжи в кале выявляли лишь у 15,6% обследованных при средней концентрации 2×10^3 .

Плесневые грибы чаще наблюдали при патологических состояниях – 18% в отличие от контрольной группы – 3,4%, в концентрациях 10^5 и 6×10^2 соответственно.

В обнаруженных ассоциациях грибов также отмечали различия. При патологии ЖКТ сочетание двух видов дрожжей встречалось в 6,7% случаев, в контрольной группе – в 0,6%, сочетание дрожжей и плесневых грибов – в 7,3% и 0,2% соответственно. Сочетания двух видов плесневых грибов в нашем исследовании не выявили.

Частота встречаемости дрожжей представлена в таблице 1.

Таблица 1

Видовой состав и частота обнаружения дрожжей у клинически здоровых людей и пациентов с патологией ЖКТ

Микроорганизм	Дисбиоз (количество из 178)	Дисбиоз %	Контрольная группа (количество из 1052)	Контрольная группа %
<i>Candida albicans</i>	38	21,3	83	7,9
<i>Candida tropicalis</i>	18	10,1	18	1,7
<i>Candida glabrata</i>	6	3,4	14	1,3
<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	1	0,6	0	0,0
<i>Trichosporon asahii</i>	1	0,6	2	0,3
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	10	5,6	5	0,5
<i>Geotrichum candidum</i>	16	9,0	15	1,4
<i>Pichia kudriavzevii</i>	16	9,0	27	2,8
<i>Pichia kluyveri</i>	2	1,1	0	0,0
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	2	1,1	0	0,0
Всего:	110	61,8	164	15,6

Данные, представленные в таблице 1, показывают, что видовой состав в обеих группах не имел существенных различий, но отмечались выраженные отличия в частоте встречаемости различных видов дрожжей. При патологии кишечника частота обнаружения дрожжей возросла в среднем в 4 раза. Обращает на себя внимание увеличение встречаемости *C. tropicalis* в 5,9 раз, *Geotrichum candidum* – в 6,3, *Rhodotorula mucilaginosa* – в 11,8.

Грибы *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia kluyveri*, *Wickerhamiella pararugosa*, вероятно, являются транзитной микробиотой, т.к. описанная патология человека, вызванная данными микроорганизмами, в литературе нами не найдена.

Частота встречаемости плесневых грибов представлена в таблице 2.

Таблица 2

Видовой состав и частота встречаемости плесневых грибов у больных с патологией ЖКТ и контрольной группы

Микроорганизм	Дисбиоз (количество из 178)	Дисбиоз %	Контрольная группа (количество из 1052)	Контрольная группа %
<i>Rhizopus</i> spp.	1	0,6	0	0,0
<i>Aspergillus candidus</i>	1	0,6	0	0,0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	1,1	0	0,0
<i>Aspergillus flavus</i>	2	1,1	2	0,2
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0	0,0	1	0,1
<i>Aspergillus niger</i>	0	0,0	1	0,1
<i>Penicillium</i> spp.	6	3,4	8	0,8
<i>Curvularia</i> spp.	2	1,1	0	0,0
<i>Lichtheimia</i> spp.	1	0,6	1	0,1
<i>Mucor</i> spp.	2	1,1	5	0,5
<i>Fusarium</i> spp.	1	0,6	1	0,1
<i>Alternaria alternata</i>	7	4,2	0	0,0
Неидентифицированные плесневые грибы	7	3,9	17	1,6
Всего:	32	18,0	36	3,4

Интерпретация данных, представленных в таблице 2, более затруднительна в виду биологических особенностей плесневых грибов, не позволяющих определить в какой форме (споровой или вегетативной) микроорганизм находился в кишечнике.

Другой проблемой является широкое распространение плесневых грибов в окружающей среде, не исключающее контаминацию на разных этапах исследования. Также невозможно с точностью сказать является ли обнаруженный грибок представителем микробиоты кишечника или транзитным микроорганизмом, полученным из окружающей среды.

Таким образом, как и в случае с дрожжами, встречаемость плесневых грибов у пациентов с патологией ЖКТ в среднем 5,2 раза превышала их количество в контрольной группе. Изменение средней концентрации было менее выраженным по сравнению

нию с дрожжами и составляло $\sim 10^4$ в случае патологии и $\sim 10^3$ – в контроле.

Согласно СП 1.3.3118-13, более частое выявление плесневых грибов III группы патогенности (*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*) и грибов IV группы патогенности (*Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. candidum*, *A. niger*, *A. niger*, *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Trichosporon* spp., *Curvularia* spp., *Fusarium* spp.) может косвенно указывать на роль данных микроорганизмов в патологии кишечника.

В ходе исследования обнаружили значительные отличия в концентрации и частоте встречаемости культивируемых грибов в кале при патологии желудочно-кишечного тракта в отличие от материала, полученного от здоровых людей, что, с высокой долей вероятности, свидетельствует о вовлеченности грибов в патологический процесс ЖКТ.

Причина недостаточного внимания к микозам человека и микозам кишечника в частности связана с отсутствием соответствующих нормативных документов. В отраслевом стандарте «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» от 09 июля 2003 г. №231 в качестве микобиоты кишечника упоминаются только *Aspergillus* и грибы рода *Candida*, превышение концентрации которых более 10^4 КОЕ/г является показателем дисбиоза кишечника. В приказе Минздрава России от 25.12.1997 г. №380 также нет этиологической расшифровки грибковой патологии, указаны только дрожжи рода *Candida* и *Aspergillus*. Единственным документом, выпущенным в нашей стране, регламентирующим бактериологическое исследование кала, были Методические рекомендации «Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника» утв. Минздравом РСФСР 14 апреля 1977 г. В данном руководстве рекомендуют с целью обнаружения патогенных грибов производить их посева на среде Сабуро и инкубировать в течение 3-5 дней при 28-30°.

Несмотря на скептическое отношение многих клиницистов к анализу кала на дисбиоз, данное исследование до сих пор выполняется во многих бактериологических лабораториях по всей стране. В рамках данного исследования бактериологи придерживаются вышеописанных рекомендаций 1977 г. по выращиванию грибов, т.е. рост на среде Сабуро редко оценивается после 72 часов инкубации. Таким образом, остаются упущенным рост этиологически значимых медленно растущих дрожжей и плесневых грибов III-IV групп патогенности, колонии которых могут появляться в течение нескольких недель инкубации. В результате мы имеем этиологически нерасшифрованную патологию ЖКТ, что, в свою очередь, приводит к неадекватной терапии.

Не полностью очевидна роль некоторых выделенных нами грибов в патогенезе заболеваний кишечника.

Способность к адгезии, синтез гидролитических ферментов, гемолизина, эндотоксина и другие факторы патогенности грибов рода *Candida* подробно описаны в литературе [16], и их роль в патогенезе поражений желудочно-кишечного тракта бесспорна [17].

Патогенность *Aspergillus* spp. связана с их способностью к синтезу разнообразных ферментов: амилолитических, протеолитических, липолитических, а также ферментов, разрушающих роговое покрытие (хитин, кератин), что способствует колонизации различных биотопов живых организмов. Факторами патогенности этих микромицетов являются также эластазы, способные разрушать эластические волокна легких при глубоком аспергиллезе [18]. Этиологическая роль *Aspergillus* spp. в патологии желудочно-кишечного тракта также не вызывает сомнения [19].

В нашем исследовании мы неоднократно обнаруживали *Alternaria alternata* (идентифицированную при помощи масс-спектрометрии) у пациентов с патологией ЖКТ. Способность этих грибов, выделенных из кишечника, синтезировать микотоксины, в том числе и с генотоксичной активностью [20], косвенно свидетельствует о возможной роли данных микроорганизмов в патологии кишечника.

Роль других выявленных нами плесневых грибов в патологии кишечника маловероятна, и их присутствие, вероятно, связано с транзитным носительством.

В последнее время возросло количество работ, описывающих поражение различных органов, вызванных *R. mucilaginosa* [21]. Было даже отмечено более частое обнаружение этих грибов при колоректальном раке [22]. В нашем исследовании встречаемость *R. mucilaginosa* в случае патологии кишечника была в 11,8 раз чаще по сравнению с контрольной группой. Данные результаты свидетельствуют о высокой вероятности роли данных микроорганизмов в патологии кишечника и требуют дальнейшего изучения.

G. candidum широко распространен в природе, но может являться этиологическим агентом геотрихоза человека. В основном описаны случаи поражения *G. candidum* кожи, легких, почек или системные инфекции [23-25] у иммунокомпрометированных пациентов. Роль в патологии кишечника представлена в работе Vasei M. & Imanieh M.H. «Duodenal colonization by *Geotrichum candidum* in a child with transient low serum levels of IgA and IgM: a case report» (1999), где показан случай колонизации дуоденального содержимого у ребенка с иммуносупрессией. При исследовании мы обнаружили встречаемость данного гриба в 6,3 раза чаще при патологии кишечника по сравнению с контрольной группой, что также служит показателем возможной вовлеченности этого микроорганизма в патологический про-

цесс желудочно-кишечного тракта человека и также нуждается в дальнейшем изучении.

ВЫВОДЫ

Результаты, полученные в нашем исследовании, показали существенные различия в частоте встречаемости грибов, выделенных из кала, и их концентрации у пациентов с клиническими проявлениями поражения желудочно-кишечного тракта по сравнению с группой клинически здоровых людей. Отмечена более высокая частота встречаемости как плесневых

грибов, так и дрожжей. Биологические особенности и распространенность плесневых грибов делает доказательство их роли в патологии кишечника весьма проблематичной, тогда как увеличение частоты встречаемости дрожжей, особенно *R. mucilaginosa* и *G. candidum*, у больных с патологией кишечника требует дальнейшего углубленного изучения факторов патогенности и их возможного участия в патогенезе заболеваний желудочно-кишечного тракта.

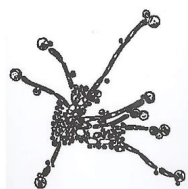
ЛИТЕРАТУРА

1. Sender R., Fuchs S., Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. PLoS Biology. 2016; 14 (8):e1002533. doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533
2. Покровский В.И. Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. [2. Pokrovsky V.I. Medical microbiology. Moscow: GEOTAR-Media, 2007. (In Russ)].
3. Falony G., Joossens M., Vieira-Silva S., et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. Science. 2016; 352 (6285): 560-564. doi.org/10.1126/science.aad3503
4. Li J., Jia H., Cai X., et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. Nature Biotechnology. 2014; 32 (8): 834-841. doi.org/10.1038/nbt.2942
5. Moya A., Ferrer M. Functional redundancy-induced stability of gut microbiota subjected to disturbance. Trends in Microbiology. 2016; 24 (5): 402-413. doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.002
6. Neish A.S. Microbes in gastrointestinal health and disease. Gastroenterology. 2009; 136 (1): 65-80. doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.080
7. Yong E. Gut microbial «enterotypes» become less clear-cut. Nature. 2012. doi: 10.1038/nature.2012.10276
8. Юдина Ю.В., Корсунский А.А., Аминова А.И. и др. Микробиота кишечника как отдельная система организма. Доказательная гастроэнтерология. 2019; 8 (4): 36-43. [Yudina Yu.V., Korsunsky A.A., Aminova A.I., et al. Gut microbiota as a separate body system. Russian Journal of Evidence-Based Gastroenterology. 2019; 8 (4): 36-43. (In Russ). doi.org/10.17116/dokgastro2019804-05136
9. Thomas S., Izard J., Walsh E., et al. The host microbiome regulates and maintains human health: a primer and perspective for non-microbiologists. Cancer Res. 2017; 77 (8): 1783-1812. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2929
10. Perez J.C., Johnson A.D. Regulatory circuits that enable proliferation of the fungus *Candida albicans* in a mammalian host. PLoS Pathog. 2013; 9: e1003780. doi.org/10.1371/journal.ppat.1003780
11. Fiers W.D., Gao I.H., Iliev I.D. Gut mycobiota under scrutiny: fungal symbionts or environmental transients? Curr. Opin. Microbiol. 2019; 50: 79-86. doi.org/10.1016/j.mib.2019.09.010
12. Kong H.H., Segre J.A. Cultivating fungal research. Science. 2020; 368: 365-366. doi.org/10.1126/science.aaz8086
13. Perez J.C. *Candida albicans* dwelling in the mammalian gut. Curr. Opin. Microbiol. 2019; 52: 41-46. doi.org/10.1016/j.mib.2019.04.007
14. Perez J.C. Fungi of the human gut microbiota: roles and significance. Int. J. Med. Microbiol. 2021; 311 (3): 1514330. doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.151490
15. Limon J.J., Skalski J.H., Underhill D.M., Commensal Fungi in health and disease. Cell Host Microbe 2017; 22: 156-165. doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.002
16. Карустина О.А., Карташова О.Л. Факторы патогенности грибов рода *Candida* и возможность их регуляции эфирными маслами. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2013; 1: 1-10. [Karustina O.A., Kartashova O.L. Pathogenicity factors of *Candida* fungi and the possibility of their regulation by essential oils. Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. 2013; 1:1-10. (In Russ)].
17. Козлова И.В., Лекарева Л.И., Быкова А.П. и др. Кандидоз желудочно-кишечного тракта. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2016; (3): 40-46. [Kozlova I.V., Lekareva L.I., Bykova A.P., et al. Candidiasis gastrointestinal tract. Experimental and Clinical Gastroenterology. 2016; (3): 40-46. (In Russ.).]
18. Баязитова А.А., Куприянова-Аушина Ф.Г., Халдеева Е.В., Ильинская О.Н. Первичные патогены- возбудители поверхностных микозов. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015; 11: 241-

248. [Bayazitova A.A., Kupriyanova-Ashina F.G., Haldeeva E.V., Ilinskaya O.N. Primary pathogens inducing surface skin mycosis. International Journal of Applied and Fundamental Research. 2015; 11: 241-248. (In Russ)].
19. Шадринова О.В., Шевяков М.А. и др. Инвазивный аспергиллез органов брюшной полости и желудочно-кишечного тракта (инвазивный аспергиллез брюшной полости и желудочно-кишечного тракта). Проблемы медицинской микологии. 2016; 18 (2): 127. [Shadrivova O.V., Shevyakov M.A., et al. Invasive aspergillosis of the abdominal cavity and gastro intestinal tract. Problems in Medical Mycology. 2016; 18 (2): 127. (In Russ)].
20. Crudo F., Aichinger G., Mihajlovic J., et al. In vitro interactions of *Alternaria* mycotoxins, an emerging class of food contaminants, with the gut microbiota: a bidirectional relationship. Arch. Toxicol. 2021; 95 (7): 2533-2549. doi: 10.1007/s00204-021-03043-x
21. Wirth F. & Goldani L.Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. Interdiscip. Perspect. Infect Dis. 2012; 2012: 465717. doi: 10.1155/2012/465717
22. Zhang L., Zhan H., Xu W., et al. The role of gut mycobiome in health and diseases. Therap. Adv. Gastroenterol. 2021; 14: 17562848211047130. doi: 10.1177/17562848211047130
23. Keene S., Sarao M.S., McDonald P.J., Veltman J. Cutaneous geotrichosis due to *Geotrichum candidum* in a burn patient. Access Microbiol. 2019; 1 (1): e000001. doi: 10.1099/acmi.0.000001
24. Ghosh P., Boler A.K. *Geotrichum candidum*: A rare primary pathogen in pulmonary geotrichosis. Indian J. Med. Res. 2020; 152 (Suppl 1): S123-S124. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_2202_19
25. Yegneswaran Prakash P., Seetaramaiah V.K., Thomas J., et al. Renal fungal bezoar owing to *Geotrichum candidum*. Med. Mycol. Case Rep. 2012; 1 (1): 63-65. doi: 10.1016/j.mmcr.2012.08.001

Поступила в редакцию журнала 15.12.2022

Принята к печати 27.12.2022



Для цитирования: Мухачева Д.А., Разнатовский К.И., Соболев А.В. Новые биомаркеры в субтипировании атопического дерматита как основа персонализированной терапии. 2023; 25 (1): 25-30. DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-25-30

For citation: Mukhacheva D.A., Raznatovsky K.I., Sobolev A.V. New biomarkers in subtyping of atopic dermatitis as the basis of personalized therapy. Problems in Medical Mycology. 2023; 25 (1): 25-30. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-25-30

НОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ В СУБТИПИРОВАНИИ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА КАК ОСНОВА ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

Мухачева Д.А. (аспирант, врач-дерматовенеролог)*, Разнатовский К.И. (зав. кафедрой), Соболев А.В. (профессор кафедры)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Атопический дерматит (АД) – генетически детерминированное хроническое заболевание кожи, характеризующееся различными фенотипами в зависимости от возраста пациентов и оказывающее существенное влияние на их иммунную и нервную системы, а также на психологическое состояние. Ведение больных с данной патологией требует оценки спектра клинических и иммунологических подтипов заболевания. В данной статье рассмотрена значимость персонализированного подхода в лечении АД, основанного на анализе различных биомаркеров этого заболевания.

В исследовании проведено изучение корреляционных взаимосвязей нейромедиаторов с известными и применяемыми в практике биомаркерами АД. Пациентам с атопическим дерматитом на различных стадиях заболевания в образцах, приготовленных из сыворотки крови, проводили определение уровня нейромедиаторов и биомаркеров. Последующий анализ позволил сравнить уровень нейромедиаторов и биомаркеров АД на различных стадиях.

Установлено, что повышение уровня биомаркеров атопического дерматита в острой фазе заболевания связано с повышением уровня серотонина, в то время как уровень 5-гидрокситриптофана и гомованиловой кислоты снижается. Определено, что показатели уровней других нейромедиаторов, таких как тирозин, 5-гидроксииндолуксусная кислота и триптофан, достоверно не показали никакой корреляционной зависимости ни от тяжести заболевания, ни от уровня известных биомаркеров.

С целью более точной дифференцировки атопического дерматита на эндотипы вместе с известными применяемыми методиками в качестве биомаркеров заболевания могут быть использованы серотонин, 5-гидрокситриптофан и гомованилиновая кислота.

Ключевые слова: атопический дерматит, биомаркеры, нейромедиаторы, эндотип атопического дерматита

NEW BIOMARKERS IN SUBTYPING OF ATOPIC DERMATITIS AS THE BASIS OF PERSONALIZED THERAPY

Mukhacheva D.A. (postgraduate student, dermatovenerologist), Raznatovsky K.I. (head of the department), Sobolev A.V. (professor of the department)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

Atopic dermatitis (AD) is a chronic skin lesion that affects a person's physical health, immune and nervous systems, and psychological state. The management of patients with this pathology requires assessment of adult growth and immunological disease subtypes. This article discusses the importance of a personalized approach in the treatment of AD based on the analysis of various biomarkers of this disease.

To develop a passport of biomarkers of atopic dermatitis by studying the correlation relationships of neurotransmitters with known and used in practice biomarkers of AD. To evaluate the prognostic value of neurotransmitters as segregation of atopic dermatitis into endotypes.

In patients with atopic dermatitis at different stages of the disease, the level of neurotransmitters and biomarkers was determined in samples prepared from blood serum. Subsequent analysis made it possible to compare the level of neurotransmitters and biomarkers of atopic dermatitis at different stages of the disease.

An increase in the level of biomarkers of atopic dermatitis in the acute phase of the disease is associated with an increase in serotonin levels, while the level of 5-hydroxytryptophan and homovanilic acid decreases. Indicators of the levels of other neurotransmitters- tyrosine, 5-hydroxyindolacetic acid and tryptophan show no correlation with either the severity of the disease or the level of known biomarkers.

Taking into account the data obtained, in order to more accurately differentiate atopic dermatitis into endotypes, in the aggregate analysis, together with the known methods used, serotonin, 5-hydroxytryptophan and homovanillic acid can be used as disease biomarkers.

Key words: atopic dermatitis, biomarkers, neuromediators, endotype of atopic dermatitis

* Контактное лицо: Мухачева Дарья Алексеевна,
e-mail: muxacheva.darya@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Атопический дерматит (АД) представляет собой заболевание кожи с наследственной предрасположенностью, характеризующееся различными фенотипами в зависимости от возраста пациента, течения, этнической принадлежности, мутационного статуса филаггрина и иммуноглобулина Е (IgE) общего, а также лежащих в основе его патогенеза молекулярных эндотипов [1].

Современное понимание патогенеза АД основано на иммунологических особенностях лимфоцитарного инфильтрата с примесью дендритных клеток, повышенным уровнем медиаторов воспаления в пораженных тканях и дефектами кожного барьера [2]. Молекулярный профиль пораженной кожи пациента с АД напрямую связан с поляризованной иммунной осью 2-го типа. АД, как гетерогенное заболевание [3], можно разделить на несколько клинических фенотипов в зависимости от лежащего в основе молекулярного паспорта – эндотипа [4]. Эндотип определяет ключевые патологические аспекты и механизмы, лежащие в формировании определенного фенотипа [5]. По сути, эндотип – это субтип болезни, который определяется отличительными патобиологическими механизмами (генетическими, фармакологическими, физиологическими, биологическими, иммунологическими) [6].

АД отличается фенотипическим разнообразием, к которому можно отнести, к примеру, клиническую неоднородность высыпаний у пациентов детского и взрослого возраста, различия в течении АД у представителей европейской и азиатской рас [7, 8]. Кроме этого, АД характеризуется весьма вариативным набором эндотипов, в основе некоторых из которых лежит иммунная активация Th1/Th2 и Th17/Th22 с нарушением эпидермального барьера, включая терминальную дифференцировку и нарушения липидного слоя кожи [9, 10].

Многообразие участников иммунного ответа в патогенезе АД предопределяет его клиническую неоднородность и фенотипическую гетерогенность. В свою очередь, количественное определение уровня конкретных показателей этого иммунного ответа позволяет обнаружить их свойства как биомаркеров АД.

Наиболее четкое определение понятия биомаркера даёт Европейское агентство по надзору за лекарственными средствами: «биомаркером является любая биологическая молекула, обнаруженная в крови, других жидкостях организма или тканях, которую можно использовать для отслеживания патологических процессов или заболеваний в организме человека или подопытных животных» [11]. Так, принято считать, что весьма значимыми биомаркерами, коррелирующими с клинической тяжестью некоторых заболеваний, включая АД, являются сы-

вороточная лактатдегидрогеназа [12], С-реактивный белок (СРБ) [13] и уровень эозинофилов в периферической крови (Kagi M., et al., 1992).

Некоторые иммунологические показатели, такие как цитокины и хемокины, определяемые в периферической крови, коррелируют с тяжестью АД и могут быть использованы как биомаркеры. Наиболее изученными из них являются основной маркер для Th2 IL13 и ключевой для Th22 родственной цитокин IL-22 [14].

Хемокин CCL17 (также известный как TARC) конститутивно экспрессируется в тимусе, однако в первые месяцы жизни может быть выделен практически из всех тканей организма. Маркер может определяться как в периферической крови, так и в пораженной коже, экспрессируясь на кератиноцитах, эндотелиальных клетках, Т-клетках и дендритных клетках. Количественное определение его содержания в плазме крови привлекло внимание медицинского мира после того, как были получены доказательства его свойств как прогностического маркера для определения активности саркоидоза и системных проявлений этого заболевания [15-17]. В настоящее время имеются неопровержимые доказательства повышения его уровня в плазме при тяжёлом течении АД или высоком индексе SCORAD [18]. Именно этот биомаркер считается наиболее чувствительным к изменениям в течении АД распространённых высыпаний [19].

CCL26, или эозинофил-привлекающий хемокин (эотаксин-3), оказывает хемотаксическое действие на эозинофилы и базофилы, связываясь с хемокиновым рецептором на поверхности этих клеток, а также коррелирует высокими уровнями в плазме с тяжестью клинических проявлений АД (Kagami S., et al., 2005). Однако выявление этого маркера в периферической крови затруднено в связи с техническими трудностями, что делает его малоинформативным в большинстве случаев [20].

Хемокин CCL27/CTACK – биомаркер для злокачественных опухолей [21] конститутивно связан с возвращением Т-клеток памяти в кожу и играет существенную роль в опосредованном Т-клетками воспалении кожи. Он экспрессируется во многих тканях, включая половые железы, тимус, плаценту и кожу. В последние 9 лет он широко используется в диагностике аллергодерматозов как биомаркер, характеризующий степень поражения кожи.

Хемокин макрофагов (MDC – macrophage-derived chemokine, CCL22) широко известен в медицинской литературе после ряда исследований с ВИЧ. Подавляя репликацию вируса в первичных макрофагах (но не в Т-лимфоцитах), он активируется после проникновения вируса в клетку. Эта молекула обнаруживается у больных со средней и тяжелой степенью тяжести АД, в то время как у пациентов с

легким течением не выявляется вовсе (Angelova - Fisher I., et al., 2006).

Серотонин является мощным индуктором острого и хронического зуда, что объясняется связыванием его с рецептором HTR7 (серотониновый рецептор 5-HT подтипа 7), расположенным на сенсорных нейронах кожи, и дальнейшей активацией ионных каналов TRPA1 (катионный канал переходного рецепторного потенциала) мембран клеток, ответственных за негистаминергический афферентный путь передачи импульса [22]. Серотонин повышает проницаемость сосудов, усиливает хемотаксис и миграцию лейкоцитов в очаг воспаления, увеличивает содержание эозинофилов в крови, усиливает дегрануляцию тучных клеток и высвобождение других медиаторов аллергии и воспаления [23]. Серотонин также оказывает антидепрессивное действие, является предшественником мелатонина, регулирует настроение, определяет моторные, когнитивные, вегетативные функции, поэтому при нарушениях его синтеза и изменении концентрации может возрасти значимость субъективных симптомов АД. Имеются данные о том, что наибольшие изменения в метаболизме нейромедиаторов (в частности серотонина) в сторону их повышения приходится на период обострения атопического дерматита [24].

В качестве метода выбора может использоваться гистологическое исследование участка кожи для определения биомаркеров иммунного воспаления и нарушений эпидермального барьера при АД. Среди биомаркеров, характеризующих барьерную дисфункцию, наиболее актуальными являются филаггрин, лорикрин, фактор естественного увлажнения, а также клаудин [25].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на I дерматовенерологическом отделении микологической клиники НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России. В исследование были включены 37 пациентов с диагнозом «атопический дерматит», среди которых 22 женщины (59,45%) и 15 мужчин (40,55%), средний возраст – $36,5 \pm 10,0$ года (от 19 до 71 лет).

Больные были распределены на две группы: в первую группу вошли 19 человек с клиническим диагнозом «атопический дерматит в фазе обострения», поступивших на стационарное лечение в первые два дня; во вторую группу – 18 человек с запланированной выпиской из стационара в связи с улучшением течения АД и переходом заболевания в фазу ремиссии.

Всем обследованным проводили двукратный забор периферической крови. Использовали венозную кровь, взятую из кубитальной вены в количестве 5

мл в одно и то же время утром (09:00) натощак. За 30 минут до взятия крови пациент находился в покое. Лабораторная диагностика включала общеклинический, биохимический анализ крови и её иммунологическое исследование.

Исследование выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе ILab-300 с коммерческими реактивами «Instrumentation laboratory». Концентрацию С-реактивного белка (СРБ) устанавливали высокочувствительным количественным методом с реактивами Вектор-Бест. Определение относительного количества эозинофильных гранулоцитов осуществляли с помощью автоматического гематологического анализа импедансным методом с подсчетом лейкоцитарной формулы. Абсолютное количество эозинофилов рассчитывали по пропорции, исходя из данных лейкоцитарной формулы. Активность фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови определяли на биохимическом анализаторе – спектрофотометре фирмы "Labsystem" с набором тест-систем при длине волны 340 нм, по методу Варбурга. Верхней границей нормального уровня ЛДГ в сыворотке крови считали $< 7,5$ мккат/л. В образцах сыворотки крови выявляли уровень нейромедиаторов и их метаболитов (тирозин (Tyr), триптофан (TRP), серотонин, 5-гидрокситриптофана (5-OH-trp), 5-гидроксииндолуксусная кислота (5-HIAA), гомованилиновая кислота (HVA)). Определение содержания нейромедиаторов в сыворотке крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на анализаторе SHIMADZULC-20-HPLC (Япония). Концентрации IL-13-22 устанавливали на электроиммунохемилюминесцентном анализаторе Elecsys 201, а уровень хемокинов CCL- 17, -22, -26 – на иммунохемилюминесцентном анализаторе Immulite-1000.

Полученные данные обрабатывали с помощью статистической программы Statistica 6.0. Сравнение средних величин двух выборок выполняли с помощью t- критерия Стьюдента. Корреляционные связи показателей проверяли по коэффициенту корреляции Спирмена. Данные представлены в виде среднего с указанием 95% доверительного интервала. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе полученных результатов было выявлено достоверно значимое повышение уровней СРБ, абсолютного числа эозинофилов, уровня ЛДГ. У подавляющего числа пациентов первой группы отмечена значимая клинически эозинофилия периферической крови с абсолютным содержанием эозинофилов не менее $0,4 \times 10^9$ /л, что составляло более 5% от общего числа лейкоцитов и расценивалось как

лёгкая степень эозинофилии. У 5 больных той же группы была выявлена средняя степень эозинофилии, количество эозинофильных гранулоцитов составляло в среднем $6173,0 \pm 109,6$ кл/мкл.

Таблица

Результаты определения уровня биомаркеров атопического дерматита в сыворотке крови у пациентов двух исследуемых групп

Биомедиатор	Показатели в периферической крови	
	I группа (n =19)	II группа (n =18)
СРБ (мг/л), $p < 0,05$	11,72 мг/л [6,32; 17,12]	$n \geq 5$ мг/л [5,95; 11,03]
Эф абс. (кл/мкл) $p < 0,001$	$5060 \pm 102,6$ [3670; 6450]	$325,3 \pm 81,5$ [120; 530,6]
ЛДГ (мккат/л) $p < 0,001$	$8 + 0,57$ [7,53; 8, 47]	5,34 [3,41; 7,27]
IL-13 (пг/мл) $p < 0,001$	15,95 [14,6; 17,3]	11,79 [10,4; 13,18]
IL-22 (пг/мл) $p < 0,001$	277,17 [243,11; 311,23]	70,59 [61,98; 79,21]
CCL-17 (пг/мл) $p < 0,001$	$201,2 \pm 1,4$	$176,5 \pm 5,4$
CCL-22 (пг/мл) $p < 0,001$	661 [417; 915]	405 [288; 508]
CCL-26 (пг/мл) $p < 0,001$	13, 91 [4,63; 34, 29]	3, 20 [1,86; 2, 15]
Тур (мкг/мл) $p < 0,001$	$13,45 \pm 6,00$	$12,23 \pm 3,12$
TRP (мкг/мл) $p < 0,001$	$11,38 \pm 2,14$	$6,84 \pm 3,23$
5-OH-tp (нг/мл) $p < 0,001$	$40,1 \pm 13,8$	$83 \pm 9,24$
5-НИАА $p < 0,001$	$53,24 \pm 72,64$	$32,14 \pm 51,38$
HVA (мкг/мл) $p < 0,001$	$34,4 \pm 21,3$ нг/мл	$229 \pm 9,24$
5-НТ (нг/мл) $p < 0,001$	$104,7 \pm 36,8$ нг/мл	$48,73 \pm 36,8$

У 12 (63,15%) больных первой группы уровень IL-22 превышал верхний предел нормы (80 пг/мл) в 3,5 раза; средняя концентрация IL-22 составила 277,17 пг/мл. Отметим, что у обследованных лиц на момент забора биоматериала наблюдали выраженные распространённые высыпания, процесс поражения кожи был универсальным. В первой группе также выявлено повышение уровня цитокина IL-13 по сравнению со второй группой, в которую были включены пациенты в фазе ремиссии (15,95 против 11,79; $p < 0,001$).

В образцах плазмы крови больных с острой стадией заболевания в сравнении с образцами пациентов с ремиссией отмечали достоверно повышенное содержание СС-хемокинов: CCL17/TARC – $201,2 \pm 1,4$ пг/мл против $176,5 \pm 5,4$ пг/мл, $p < 0,001$; CCL22 – 661 пг/мл против 405 пг/мл, $p < 0,001$; CCL26 – 13, 91 пг/мл против 3,2 пг/мл, $p < 0,001$. Эти данные сопоставимы с результатами ранее проводимых исследований [26, 27]. Примечательно, что уровни 5-гидрокситриптофана ($40,1 \pm 13,8$ нг/мл) и гомованилиновой кислоты ($34,4 \pm 21,3$ нг/мл) были достоверно снижены у пациентов первой группы при поступлении и достигли референтных значений перед выпиской из стационара. Уровень серотонина у

больных АД в острый период заболевания был значительно выше референтного значения ($104,7 \pm 36,8$ против 94,0 нг/мл) при поступлении. Показатели уровней тирозина, 5-гидроксииндолуксусной кислоты и триптофана в сыворотке крови у пациентов обеих групп находились в пределах референтных интервалов во все этапы госпитализации.

Во второй группе обследованных лиц непосредственно перед выпиской показатели биомаркеров АД и нейромедиаторов были в пределах нормы и не выходили за рамки референтных значений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования установлено повышение уровня серотонина наряду с другими уже известными и активно применяемыми на практике биомаркерами, а также впервые выявленное снижение уровней 5-гидрокситриптофана и гомованилиновой кислоты в острую фазу атопического дерматита. На основании полученных данных, закономерным является вывод о том, что серотонин и уже применяемые в практике биомаркеры имеют общий коэффициент параллельной корреляции. Повышение уровня биомаркеров АД сопряжено с повышением уровня серотонина. Кроме того, обнаружена обратная корреляционная взаимосвязь между повышением уровней биомаркеров АД и понижением уровня таких нейромедиаторов, как 5-гидрокситриптофан и гомованилиновая кислота.

Необходимы дальнейшие исследования по изучению сопряжённого повышения/понижения уровня нейромедиаторов по сравнению с изменением уровня биомаркеров АД для выявления особенностей этих изменений и их характера.

Для оптимизации паспорта фено- и эндотипа атопического дерматита с применением новых биомаркеров также требуются расширенные исследования на более значительной выборке пациентов с различными подтипами АД.

Разработка паспорта биомаркеров АД играет важную роль в определении не только эндотипа, но и позволяет прогнозировать течение кожного процесса, добиться эффективности терапии и предотвратить рецидив заболевания. Совокупный анализ и создание оптимального паспорта биомаркеров с одновременным поиском новых биомаркеров атопического дерматита является важнейшей задачей современной дерматологии, аллергологии и иммунологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Yoshiki T., Satoshi H.* Subtypes of atopic dermatitis: From phenotype to endotype. *Allergy International*. 2022; 71 (1): 14-24. doi.org/10.1016/j.alit.2021.07.003
2. *Nakahara T., Kido-Nakahara M., Tsuji G., Furue M.* Basics and recent advances in the pathophysiology of atopic dermatitis. *The Journal of Dermatology*. 2021; 48: 130-139. doi.org/10.1111/1346-8138.15664
3. *Chovatiya R., Silverberg J.* The heterogeneity of atopic dermatitis. *Journal of drugs in dermatology*. 2022; 21 (2): 172-176. doi.org/10.36849/JDD.6408
4. *Cabanillas B., Ann-Christin Brehler A.-C., Novak N.* Atopic dermatitis phenotypes and the need for personalized medicine. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017; 4 (17): 309-315. doi.org/10.1097/ACI.0000000000000376
5. *Реброва С.А.* Клиническая характеристика маркеров воспаления дыхательных путей при бронхиальной астме и аллергическом рините. Дисс...на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. 2020. [Rebrova S.A. Clinical characteristics of markers of respiratory tract inflammation in bronchial asthma and allergic rhinitis. Diss... for the degree of Candidate of Medical Sciences. 2020. (In Russ)].
6. *Российское Респираторное общество.* Бронхиальная астма 2019; С. 6, 11-12. [Russian Respiratory Society. Bronchial asthma 2019; pp. 6, 11-12. (In Russ)]. URL: http://spulmo.ru/upload/kr_bronhastma_2019.pdf.
7. *Wen H., Czarnowicki T., Noda S., et al.* Serum from Asian patients with atopic dermatitis is characterized by TH2/TH22 activation, which is highly correlated with nonlesional skin measures. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018; 142: 324-328. doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.047
8. *Czarnowicki T., He H., Canter T., et al.* Evolution of pathologic T-cell subsets in patients with atopic dermatitis from infancy to adulthood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020; 145 (1): 215-228. doi.org/10.1016/j.jaci.2019.09.031
9. *Brunner P., Leung D., Guttman-Yassky E.* Immunologic, microbial, and epithelial interactions in atopic dermatitis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2018; 120: 34-41. doi.org/10.1016/j.anai.2017.09.055
10. *Бурьгина Е.В., Мельникова А.В., Козлова Я.И. и др.* Клинико-иммунологические характеристики больных хронической крапивницей: анализ данных регистра 2018-2019 года. *Проблемы медицинской микологии*. 2020; 22 (1): 36-42. [Burygina E.V., Melnikova A.V., Kozlova Y.I., et al. Clinical and immunological features of the patients with chronic urticaria: analysis of the register data 2018-2019. *Problems in Medical Mycology*. 2020; 22 (1): 36-42. (In Russ)]. doi:10.24412/1999-6780-2020-1-36-42
11. *The European Medicines Agency's corporate website* <https://www.ema.europa.eu/en/glossary/biomarker>
12. *Morishima Y., Kawashima H., Takekuma K., Hoshika A.* Changes in serum lactate dehydrogenase activity in children with atopic dermatitis. *Pediatrics International*. 2010; 52: 171-174. doi.org/10.1111/j.1442-200X.2009.02908.x
13. *Vekaria A., Brunner P., Aleisa A., et al.* Moderate-to-severe atopic dermatitis patients show increases in serum C-reactive protein levels, correlating with skin disease activity. *F1000 Research*. 2017; 6: 1712. doi.org/10.12688/f1000research.12422.2
14. *Аак О.В., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е. и др.* Микогенная сенсibilизация и степень тяжести атопического дерматита. *Проблемы медицинской микологии*. 2013; 15 (3): 10-13. [Aak O.V., Frolova E.V., Uchevatkina A.E., et al. Mold sensitization and the severity of atopic dermatitis. *Problems in Medical Mycology*. 2013; 15 (3): 10-13. (In Russ)].
15. *Лазарева Н.М., Баранова О.П., Кудрявцев И.В. и др.* Хемокины CCL17 и CCL22 при саркоидозе. *Медицинская иммунология*. 2021; 23 (4): 24. [Lazareva N.M., Baranova O.P., Kudryavtsev I.V., et al. Chemokines CCL17 and CCL22 in sarcoidosis. *Medical Immunology*. 2021; 23 (4): 791-798. doi.org/10.15789/1563-0625-ССА-2340
16. *Козлова Я.И., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е. и др.* Иммунологические маркеры воспаления у больных бронхиальной астмой с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. *Врач*. 2021; 32 (10): 74-79. [Kozlova Ya.I., Frolova E.V., Uchevatkina A.E., et al. Immunological markers of inflammation in patients with asthma with sensitization to *Aspergillus* spp. *Vrach (The Doctor)*. 2021; 32 (10): 74-79. (In Russ)]. doi.org/10.29296/25877305-2021-10-15
17. *Козлова Я.И., Фролова Е.В., Аак О.В. и др.* Способ диагностики аллергического бронхолегочного аспергиллеза у больных бронхиальной астмой. Патент на изобретение 2759772 С1, 17.11.2021. Заявка №2020137773 от 03.02.2021. [Kozlova Ya.I., Frolova E.V., Aak O.V., etc. A method for diagnosing allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma. Patent for invention 2759772 С1, 17.11.2021. Application No. 2020137773 dated 03.02.2021. (In Russ)].
18. *Yasukochi Y., Nakahara T., Abe T., et al.* Reduction of serum TARC levels in atopic dermatitis by topical anti-inflammatory treatments. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 2014; 32: 240-245. doi.org/10.12932/AP0419.32.3.2014

19. *Kyoza M., Kawakami T., Soma Y.* Serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and interleukin-31 levels as biomarkers for monitoring in adult atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Science*. 2014; 20 (75): 204-207. doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.06.001
20. *Gittler J., Shemer A., Suarez-Farinas M., et al.* Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012; 130: 1344-1354. doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.012
21. *Mao Mj., Xue N., Wang Xp., et al.* Chemokine CCL27 is a novel plasma biomarker for identification the nasopharyngeal carcinoma patients from the Epstein-Barr virus capsid antigen-specific IgA seropositive population. *BMC Cancer*. 2018; 18 (9): 24. doi.org/10.1186/s12885-017-3718-2
22. *Тамразова О.В., Глухова Е.А., Дубовец Н.Ф., Гончарова Л.В.* Значение зуда, патогенетические механизмы его формирования и оценка клинических проявлений при атопическом дерматите. *Практика педиатра*. 2022; 2. [Tamrazova O.V., Glukhova E.A., Dubovets N.F., Goncharova L.V. The significance of itching, pathogenetic mechanisms of its formation and assessment of clinical manifestations in atopic dermatitis. *Pediatrician's practice*. 2022; 2. (In Russ)].
23. *Попович Ю.А., Федотов В.П.* Роль триптофана и его метаболитов в патогенезе атопического дерматита у больных различных возрастных групп. *Дерматовенерология. Косметология. Сексопатология*. 2015; 1: 16-19. [Popovich Yu.O., Fedotov V.P. The role of tryptophan and its metabolites in the pathogenesis of atopic dermatitis in patients of different age groups. *Dermatovenerology. Cosmetology. Sexopathology*. 2015; 1: 16-19. (In Russ)].
24. *Rasul A., El-Nour H., Lonne-Rahm S.* Serotonergic markers in atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol*. 2016; 96 (6): 732-6. doi: 10.2340/00015555-2354
25. *Kezic S., O'Regan G., Lutter R., et al.* Filaggrin loss-of-function mutations are associated with enhanced expression of IL-1 cytokines in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis and in a murine model of filaggrin deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012; 129: 1031-1039. doi.org/10.1016/j.jaci.2011.12.989
26. *Thijs L., Strickland I., Carla A.* Atopic dermatitis and inflammatory skin disease Moving toward endo-types in atopic dermatitis: Identification of patient clusters based on serum biomarker analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017; 140 (3): 730-737. doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.023
27. *Jiao X., Si M., Lu T.* The correlation of serums CCL11, CCL17, CCL26, and CCL27 and disease severity in patients with urticaria. *Disease Markers*. 2016; 1381760. doi.org/10.1155/2016/1381760

Поступила в редакцию журнала 13.02.2023

Принята к печати 27.01.2023



Для цитирования: Гринева Е.М., Корнишева В.Г., Разнатовский К.И., Вашкевич А.А. Функциональное состояние щитовидной железы, индекс массы тела у женщин с очаговой склеродермией. 2023; 25 (1): 31-37. DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-31-37

For citation: Grineva E.M., Kornisheva V.G., Raznatovsky K.I., Vashkevich A.A. Functional state of the thyroid gland, body mass index in women with focal scleroderma. Problems in Medical Mycology. 2023; 25 (1): 31-37. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-31-37

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ИНДЕКС МАССЫ ТЕЛА У ЖЕНЩИН С ОЧАГОВОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ

Гринева Е.М. (аспирант)*, Корнишева В.Г. (профессор кафедры), Разнатовский К.И. (зав. кафедрой), Вашкевич А.А. (доцент)

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

Очаговая склеродермия (ОС) является редким аутоиммунным заболеванием неизвестной этиологии. В исследование включили 132 пациента в возрасте от 19 до 76 лет с ОС, среди которых преобладали женщины (94,7%). У большей части больных (72,7%) выявлена патология щитовидной железы, уровень ТТГ выше нормы > 4,2 мМЕ/л диагностирован у 16,7% пациентов. Преобладающее большинство женщин (77%) с ОС и патологией щитовидной железы имели избыточную массу тела и ожирение. Согласно результатам оценки влияния индекса массы тела (ИМТ) на течение ОС установлено, что с увеличением ИМТ статистически значимо нарастала степень тяжести кожного процесса ($p < 0,05$). Клинически у пациенток ОС с избыточной массой тела преобладали генерализованная форма (41,2%) и бляшечная склеродермия в сочетании со склероатрофическим лихеном (44,8%, $p < 0,05$).

Ключевые слова: очаговая склеродермия, склероатрофический лишай, индекс массы тела, ожирение, избыток массы тела, патология щитовидной железы, аутоиммунный тиреозит, ТТГ, тяжесть течения

FUNCTIONAL STATE OF THE THYROID GLAND, BODY MASS INDEX IN WOMEN WITH FOCAL SCLERODERMA

Grineva E.M. (postgraduate student), Kornisheva V.G. (professor of the department), Raznatovsky K.I. (head of the department), Vashkevich A.A. (associate professor)

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

Focal scleroderma (FS) is a rare autoimmune disease of unknown etiology. The study included 132 patients aged 19 to 76 years with FS, among whom women predominated (94,7%). Thyroid pathology was detected in most patients (72,7%), Thyroid-stimulating hormone (TSH) levels above normal > 4,2 mMU/l were diagnosed in 16,7% of patients. The overwhelming majority of women (77%) with FS and thyroid pathology were overweight and obese. According to the results of the assessment of the effect of body mass index (BMI) on the course of FS, it was found that with an increase in BMI, the severity of the skin process increased statistically significantly ($p < 0,05$). Clinically, generalized form (41,2%) and plaque scleroderma in combination with scleroatrophic lichen prevailed in patients with overweight FS (44,8%, $p < 0,05$).

Key words: focal scleroderma, scleroatrophic lichen, body mass index, obesity, excess body weight, thyroid pathology, autoimmune thyroiditis, TSH, severity of course

ВВЕДЕНИЕ

За последнее десятилетие ожирение стало серьезной проблемой здравоохранения во всем мире. Это вызвано чрезмерным потреблением пищи, низкой физической активностью и рядом других факторов окружающей среды, которые взаимодействуют с генетической предрасположенностью. Согласно последним данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2016 году 39% взрослых в возрасте 18 лет и старше имели избыточный вес, а 13% – страдали ожирением [1, 2]. В последние годы частота метаболических нарушений и аутоиммунных

* Контактное лицо: Гринева Екатерина Михайловна, e-mail: katerina.grineva88@mail.ru

заболеваний щитовидной железы одновременно увеличилась [3]. Аутоиммунный тиреодит (АИТ) является наиболее распространенным аутоиммунным заболеванием щитовидной железы [4], имеющим растущую тенденцию [5]. АИТ поражает преимущественно женское население с повышением заболеваемости в среднем возрасте [6, 7]. У женщин вероятность развития АИТ примерно в восемь раз выше, чем у мужчин [8]. Точные механизмы, лежащие в основе патогенеза АИТ, до конца не изучены. Многочисленные факторы внешней среды и генетический фон способствуют развитию АИТ [6, 9, 10], который связан с различными функциональными состояниями щитовидной железы, начиная от эутиреоидного, субклинического и заканчивая явным гипотиреозом [11].

Очаговая склеродермия (ОС) – редкое аутоиммунное заболевание соединительной ткани с различными клиническими проявлениями, с ежегодной частотой 0,4-2,7 случая на 100 000, характеризующееся воспалением, склерозом кожи и подлежащих мягких тканей [12]. ОС имеет уникальные демографические и клинические особенности, причем женщины более восприимчивы к этому заболеванию. Пик заболеваемости у взрослых приходится на пятое десятилетие [13]. Патогенез ОС до конца не ясен. Взаимодействие между генетическими факторами, эпигенетическими модификациями, иммунной и сосудистой дисфункцией, а также воздействием окружающей среды рассматриваются как основные факторы, влияющие на патогенез ОС [14]. Эндокринопатии занимают первое место среди коморбидной патологии у пациентов, страдающих очаговой склеродермией [15]. Современные авторы указывают на необходимость дальнейших исследований с целью полного понимания экологических, системных, местных, генетических и иммунопатологических факторов, лежащих в основе патогенеза ОС [16].

Цель данного исследования: изучить функциональное состояние щитовидной железы у больных очаговой склеродермией с учетом индекса массы тела.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С 2010 г. по 2020 г. в отделении дерматовенерологии НИИ медицинской микологии им П.Н. Кашкина было проведено открытое проспективное исследование, в которое были включены 132 пациента с ОС.

С целью выявления патологии щитовидной железы у больных определяли гормоны щитовидной железы (ТТГ, Т3, Т4), уровень антител к тиреопероксидазе, тиреоглобулину и проводили ультразвуковую диагностику щитовидной железы. Все пациенты консультированы эндокринологом.

Для оценки распространенности и степени тяжести заболевания, активности кожного процесса использовали балльную оценку по Ramsden и Silman [17]. По 3-х балльной шкале в каждой анатомической области оценивали плотность кожи: 0 баллов – норма, 1 балл – легкое уплотнение кожи, 2 балла – умеренное уплотнение кожи (кожу невозможно защипнуть в складку), 3 балла – сильное уплотнение кожи (утрата подвижности). Баллы, начисленные за все анатомические области, суммировались. Определяли степень тяжести кожного процесса: I степень – от 1 до 14 баллов, II степень – от 13 до 29 баллов, III степень – от 30 до 39 баллов, IV степень – более 40 баллов.

Для оценки степени склероатрофических поражений аногенитальной зоны у больных применяли индекс степени поражения и атрофии половых органов и перианальной области [17]. У женщин выделены 7 анатомических областей, у мужчин – 4. В каждой анатомической области оценивали выраженность атрофии.

Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывали по формуле: масса тела (кг), деленная на квадрат роста (м²). Согласно данным ВОЗ, результаты расчетов ИМТ были разделены на следующие категории: $18,5 < \text{ИМТ} < 25$ – нормальная масса тела, $30 > \text{ИМТ} \geq 25$ – избыток массы тела, $\text{ИМТ} \geq 30$ – ожирение [18].

Сравнение изучаемых количественных параметров выполняли с использованием критериев Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова, медианного хи-квадрата и модуля ANOVA. Описательные статистики количественных признаков включали в себя оценку среднего арифметического, среднего квадратичного отклонения, ошибки среднего значения, медиану и квартили, а также минимум и максимум. Статистический анализ качественных показателей проводили на основе данных, сгруппированных в аналитические таблицы сопряженности, с применением критерия согласия Пирсона χ^2 и точного метода Фишера. Корреляционный анализ показателей осуществляли методом Спирмена.

Для визуализации структуры исходных данных и полученных результатов использовали графические возможности системы Statisticafor Windows и модуль построения диаграмм системы Microsoft Office. Количественные показатели в различных исследуемых подгруппах для полноты описания и удобства восприятия и сравнения представили в форме «Box & Whisker Plot», когда на одном поле при различных группировках на основе качественных критериев отражены среднее значение, ошибка среднего и стандартного отклонения для указанного параметра. Критерием статистической значимости, получаемых выводов, считали величину $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обследовано 132 пациента, из них 125 (94,7%) женщин и 7 (5,3%) мужчин в возрасте от 19 до 76 лет (средний возраст – 53,9±14,7 года). При анализе данных анамнеза обследованных больных установлено, что продолжительность ОС варьировала от 0,5 до 36 лет, средняя продолжительность заболевания составила 5,2 лет.

Клиническая характеристика пациентов с ОС представлена в таблице 1.

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов с очаговой склеродермией

Показатель	Абс.		%	
	Абс.	%	Абс.	%
Возраст, годы Ме (Q1,Q3)	58 (42; 64)			
Пол (женщины)	125		94,7	
Продолжительность очаговой склеродермии, годы Ме (Q1,Q3)	3 (1;7)			
Возраст дебюта очаговой склеродермии, годы Ме (Q1,Q3)	54 (37; 59)			
Клиническая форма очаговой склеродермии				
Бляшечная склеродермия	71		53,9	
Очаговая склеродермия и склероатрофический лишай кожи	29		22	
Генерализованная склеродермия	17		12,9	
Линейная склеродермия	10		7,5	
Глубокая склеродермия	4		3	
Буллезная склеродермия	1		0,7	

В зависимости от клинической формы ОС распределение больных было следующим: наиболее часто встречалась бляшечная ОС, которая диагностирована у 71 (53,9 %) пациентки. У 29 (22%) больных ОС сочеталась со склероатрофическим лишаем кожи. Генерализованная (многоочаговая) склеродермия выявлена у 17 (12,9%) пациентов, линейная склеродермия – у 10 (7,5%), буллезная форма – у 1 (0,7%), глубокая форма склеродермии – у 4 (3%).

По результатам обследования, у 67 (50,7%) больных ОС диагностирован АИТ, из которых у 55,2% обнаружен гипотиреоз, у 44,8% – эутиреоз. У 16 (12,1%) пациенток был узловой зоб, у 10 (7,6%) – диффузно-узловой зоб, у одной (0,8%) – диффузный токсический зоб. В анамнезе у 2 (1,5%) пациенток – рак щитовидной железы. У 36 (27,3%) больных патологии щитовидной железы не наблюдали.

В нашем исследовании уровень ТТГ выше нормы > 4,2 мМЕ/л был отмечен у 22 (16,7%) человек с ОС. Снижение данного показателя выявлено у одной пациентки.

У 41,7% больных ОС отмечена избыточная масса тела (30>ИМТ≥25). Пациенты с ожирением

(ИМТ≥30) составили 25%, в то время как пациенток с ИМТ<25 было 33,3%.

Для анализа клинико-лабораторных характеристик в зависимости от функционального состояния щитовидной железы больных ОС разделили на две группы. В I группу вошли пациенты (n=96), имеющие патологию щитовидной железы, во II группу (n=36) – без соответствующей патологии (табл. 2).

Таблица 2

Возраст, индекс массы тела и уровень тиреотропного гормона у больных очаговой склеродермией в зависимости от наличия или отсутствия патологии щитовидной железы

Показатель	I группа (n=96)		II группа (n=36)		p
	Абс.	%	Абс.	%	
Возраст (лет) M+/-m	55,1±13,3		50,1±16,2		>0,05
Ме (Q1,Q3)	59 (49; 63)		56 (36; 63)		
Пол (женщины)	92	95,8	33	91,7	>0,05
ТТГ (мМЕ/л) M+/-m	3,8±2,3		1,9±0,5		<0,05
ИМТ(кг/м²) M+/-m	27,3±5,05		25,8 ±5,8		>0,05
Ме (Q1,Q3)	28 (24; 31)		24 (22; 29)		
ИМТ<25	22	22,9	23	63,9	<0,05
30>ИМТ≥25	45	46,9	9	25	<0,05
ИМТ ≥30	29	30,2	4	11,1	<0,05

При сравнении результатов обследования между группами больных не обнаружено статистически значимых различий по полу и возрасту. Средний уровень ТТГ в I группе пациентов с ОС, имеющих патологию щитовидной железы, составил 3,8±2,3мМЕ/л, во II группе лиц без патологии щитовидной железы этот показатель был значимо ниже (1,9±0,5мМЕ/л, p<0,05). Индекс массы тела I группы составил 27,3±5,05, что незначительно выше этого показателя у больных II группы (25,8±0,5, p>0,05).

У преобладающего большинства пациентов I группы (46,9%) отмечена избыточная масса тела (30>ИМТ≥25). Пациентки с ожирением (ИМТ≥30) составили 30%, что значимо выше показателей, полученных в группе без патологии щитовидной железы (p<0,05).

Анализируя уровень ТТГ у больных ОС с патологией щитовидной железы и без нее, получены статистически значимые различия. У преобладающего большинства пациентов II группы (83,3%) уровень ТТГ находился в интервале 0,5-2,4 мМЕ/л, в то время как у 45,8% лиц I группы – в интервале 2,5-3,9 мМЕ/л, у 22,9% обследованных уровень ТТГ был >4,2 мМЕ/л (p<0,05) (табл. 3).

Таблица 3

Уровень тиреотропного гормона в сыворотке крови у больных очаговой склеродермией с патологией и без патологии щитовидной железы

Больные	Уровень ТТГ в сыворотке крови							
	<0,5 мМЕ/л		0,5-2,4 мМЕ/л		2,5-4,2 мМЕ/л		>4,2 мМЕ/л	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
I группа (n=96)	6	6,3	24	25	44	45,8	22	22,9
II группа (n=36)	0	0	30	83,3	6	16,7	0	0
p	<0,05		<0,05		<0,05		<0,05	

Таким образом, большинство больных имели нормальный уровень ТТГ (2,6 мМЕ/л). Повышенный уровень ТТГ выявлен у 22,9% пациентов I группы, что соответствовало гипотиреозу. Пограничные значения (2,5-4,0 мМЕ/л) ТТГ обнаружены у 50 больных (37,9%). Полученные данные отличаются от результатов общепопуляционного скрининга, при котором процент лиц, имеющих пограничное значение, не превышает 5%. У 22,9% пациентов, включенных в I группу, выявлен гипотиреоз.

Проведено сопоставление ИМТ у обследованных лиц с ОС в зависимости от уровня ТТГ в сыворотке крови. Для больных I группы, имеющих патологию щитовидной железы, ИМТ составил $27,3 \pm 5,05$, которому соответствовал пограничный уровень ТТГ ($3,8 \pm 2,3$ мМЕ/л). У пациентов II группы без патологии щитовидной железы эти показатели были ниже (ИМТ – $25,8 \pm 5,8$, ТТГ – $1,9 \pm 0,5$ мМЕ/л). Между ТТГ сыворотки крови и показателями ИМТ обнаружена слабая взаимосвязь ($r = 0,3$). Таким образом, при снижении функции щитовидной железы имеется тенденция к замедлению обменных процессов, что в дальнейшем приводит к нарастанию массы тела.

При оценке степени тяжести ОС в зависимости от показателя ИМТ установлено, что с увеличением ИМТ статистически значимо нарастала степень тяжести кожного процесса ($p < 0,05$, Рис.1). При ИМТ < 25 у 72,7% больных выявлена I степень тяжести кожного процесса, у 27,7% – II-III степени. У 49,1% пациентов с избыточной массой тела ($30 > \text{ИМТ} \geq 25$) диагностирована I степень тяжести кожного процесса, у 50,9% – II-IV степени. У 69,7% обследованных, имевших ожирение ($\text{ИМТ} \geq 30$), отмечены II-IV степени тяжести ($p < 0,05$, Рис.1). Таким образом, распространенность и степень тяжести дерматоза нарастали с увеличением массы тела ($p < 0,05$).

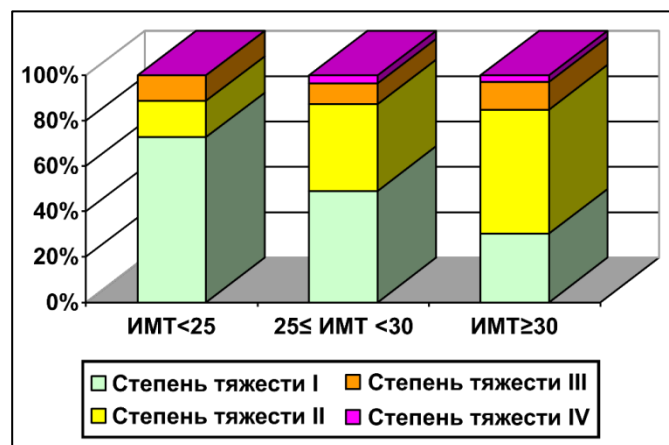


Рис. 1. Степень тяжести кожного процесса у больных очаговой склеродермией в зависимости от индекса массы тела.

Распределение клинических форм очаговой склеродермии в зависимости от индекса массы тела пациентов приведено на рисунке 2. Наиболее частой формой ОС была пятнисто-бляшечная, для которой характерно наличие розовых или гиперпигментированных пятен, локализирующихся у 38% больных на передней брюшной стенке, у 34,5% – на конечностях, у 44,5% – под молочными железами, у 18% – на спине.

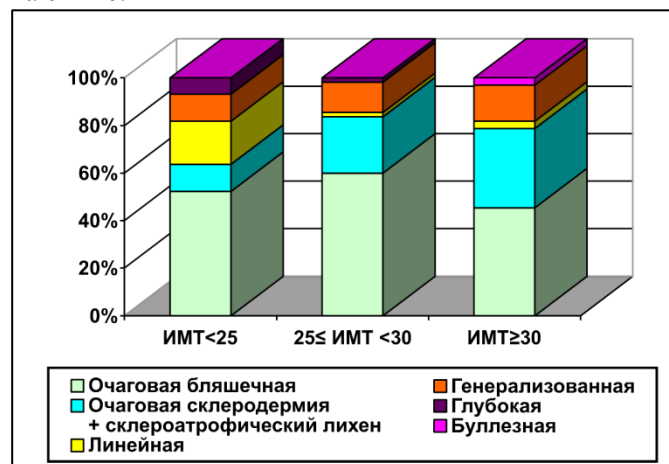


Рис. 2. Распределение клинических форм очаговой склеродермии в зависимости от индекса массы тела.

При анализе клинических форм ОС в зависимости от ИМТ получены статистически значимые различия. Избыточная масса тела отмечена у 44,8% больных с бляшечной склеродермией и склероатрофическим лихеном кожи, ожирение – у 37,9%. Нормальную массу тела ($\text{ИМТ} < 25$) имели только 17,3% пациенток этой группы ($p < 0,05$). Для бляшечной склеродермии в сочетании со склероатрофическим лихеном было характерно наличие розовых или гиперпигментированных пятен с атрофией, которые чередовались с перламутрово-белыми пятнами, папулами или бляшками с блестящей поверхностью, сливающимися в очаги фестончатых очертаний с

эритематозным венчиком. Преимущественная локализация сочетанных высыпаний была в области крупных складок и на передней брюшной стенке. Поражение аногенитальной области представлено очагами истонченного эпидермиса и атрофии с белесоватым, перламутровым или ливидным оттенком. У части пациенток имелись изменения структуры вульвы и из-за выраженного склероза – сужение входа во влагалище.

В группе лиц с генерализованной формой склеродермии преобладали больные с избыточной массой тела (41,2%, $p < 0,05$, Рис. 2). У этих пациентов наблюдали множественные симметричные очаги эритемы с умеренной индурацией, размером от 3 до 15 см в диаметре, располагающиеся на туловище, конечностях и в крупных складках.

У 80% больных с линейной формой склеродермии была нормальная масса тела.

Различия ИМТ при различных формах ОС можно объяснить разницей возраста пациентов. Возраст больных, страдающих линейной формой дерматоза, варьировал от 18 до 48 лет ($28,1 \pm 9,3$ лет). У пациентов с бляшечной склеродермией в сочетании со склероатрофическим лишеном кожи средний возраст составил $62 \pm 7,9$ лет, с бляшечной формой – $53,2 \pm 13,7$ лет, с генерализованной формой – $59,7 \pm 11,7$ лет.

Таким образом, при ОС значимо чаще ($p < 0,05$) избыточная масса тела и ожирение встречались у женщин с патологией щитовидной железы. Из 74 (77%) больных этой группы у 22 (30%) обследованных выявлено повышение ТТГ. Полученные данные согласуются с результатами исследования Hassan I. и соавторов, которые наблюдали повышенный уровень тиреотропного гормона у 41,2% пациентов, страдающих очаговой склеродермией [19].

При обследовании лиц I группы, имевших патологию щитовидной железы, АИТ обнаружен более, чем у половины больных ($p < 0,05$). У 55,2% пациентов АИТ сопровождался гипофункцией щитовидной железы, при этом у 11 (29,8%) гипотиреоз отмечен впервые. У 26 (70,2%) больных ранее был установлен диагноз гипотиреоза, который предшествовал появлению первых высыпаний локализованной склеродермии. Избыточную массу тела и ожирение имели 82% пациентов с ОС и АИТ. Эти данные согласуются с исследованием Popławska-Kita A. и соавторов, которые отметили, что у 72% больных АИТ был избыточный вес или ожирение по сравнению с 38% лиц контрольной группы. Авторы выявили, что у пациентов с АИТ, сопровождающимся эутиреозом, масса тела, ИМТ, окружность талии и бедер, жировая масса значительно выше, чем у здоровых лиц. При этом было отмечено, что ИМТ и жировая масса были выше у пациентов, получавших L-тироксин

менее двух лет, по сравнению с теми, кого лечили в течение более длительного периода [20]. Согласно современным исследованиям, лица с ожирением могут быть более склонны к развитию АИТ [21]. В свою очередь ожирение в значительной степени связано с АИТ и высоким уровнем анти-ТПО (антитела к тиреопероксидазе) [21]. Аутоиммунный тиреоидит утяжеляет течение очаговой склеродермии, способствует более выраженной активности кожного процесса и распространенности дерматоза [22]. У женщин в пременопаузе с АИТ, гипотиреозом и эутиреозом содержание общего холестерина, триглицеридов, липопротеидов низкой плотности, ИМТ и окружность талии были значительно выше по сравнению со здоровыми [23]. Метаболические нарушения в виде избыточной массы тела и ожирения связаны с повышением уровня аутоантител к щитовидной железе [24].

Таким образом, в нашем исследовании преобладающее большинство женщин (77%) с ОС и патологией щитовидной железы имели избыточную массу тела и ожирение, что коррелировало со степенью тяжести кожного процесса. Проведенное обследование показало, что среди больных ОС пограничные значения ТТГ встречались в четыре раза чаще, чем это регистрируется в популяции в целом (по данным литературы – 5%) [23]. Полученные данные свидетельствуют о взаимосвязи между субклиническими нарушениями функционирования щитовидной железы (развитие субклинического гипотиреоза) и очаговой склеродермией. Уровень ТТГ был выше и у лиц старшего возраста, что подтверждает данные об уменьшении функциональной активности щитовидной железы с увеличением возраста. Даже незначительное повышение ТТГ у предрасположенных лиц способствует прибавке веса. Полученные результаты подтверждают важную роль функционального состояния щитовидной железы в патогенезе ОС и её влияния на тяжесть течения заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Преобладающее большинство женщин (77%), страдающих очаговой склеродермией и патологией щитовидной железы, имели избыточную массу тела и ожирение.
2. Ожирение и избыток массы тела ассоциированы с более тяжелым течением очаговой склеродермии. С увеличением индекса массы тела нарастала степень тяжести кожного процесса ($p < 0,05$).
3. Клинически у пациенток ОС с избыточной массой тела преобладали генерализованная форма (41,2%) и бляшечная склеродермия в сочетании со склероатрофическим лишеном (44,8%, $p < 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bray G.A., Kim K.K., Wilding J.P.H.* World Obesity Federation Obesity: A Chronic Relapsing Progressive Disease Process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obes. Rev.* 2017; 18: 715-723. doi.org/10.1111/obr.12551
2. *World Health Organization.* Obesity and Overweight. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed on 26 January 2022).
3. *Siemińska L., Wojciechowska C., Walczak K., et al.* Associations between metabolic syndrome, serum thyrotropin, and thyroid antibodies status in postmenopausal women, and the role of interleukin-6. *Endokrynol. Pol.* 2015; 66 (5): 394-403. doi: 10.5603/EP.2015.0049
4. *Santaguida M., Gatto I., Mangino G., et al.* BREG cells in Hashimoto's thyroiditis isolated or associated to further organ-specific autoimmune diseases. *Clin. Immunol.* 2017; 184: 42-47. doi.org/10.1016/j.clim.2017.04.012
5. *Ajjan R.A., Weetman A.P.* The Pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis: further developments in our understanding. *Horm. Metab. Res.* 2015; 47: 702-710. doi.org/10.1055/s-0035-1548832
6. *Ragusa F., Fallahi P., Elia G., et al.* Hashimoto's thyroiditis: epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019; 33: 101367. doi.org/10.1016/j.beem.2019.101367
7. *Sur M.L., Gaga R., Lazăr C., Lazea C.* Genetic and environmental factors in the pathophysiology of Hashimoto's thyroiditis. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 2020; 17 (4): 343-348. doi:10.17458/per.vol17.2020.gsl.geneticenvironmentalhashimoto
8. *Caturegli P., Remigis A., Rose N.R.* Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun. Rev.* 2014; 13: 391-397. doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.007
9. *Wiersinga W.M.* Clinical relevance of environmental factors in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease. *Endocrinol. Metab.* 2016; 31: 213-222. doi.org/10.3803/EnM.2016.31.2.213
10. *Weetman A.P.* An Update on the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J. Endocrinol. Invest.* 2021; 44: 883-890. doi.org/10.1007/s40618-020-01477-1
11. *Caturegli P., De Remigis A., Rose N.R.* Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun. Rev.* 2014; 13: 391-397. doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.007
12. *Ferrelli C., Gasparini G., Parodi A., et al.* Cutaneous manifestations of scleroderma and scleroderma-like disorders: a comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2017; 53 (3): 306-336. doi.org/10.1007/s12016-017-8625-4
13. *Careta M., Romiti R.* Localized scleroderma: clinical spectrum and therapeutic update. *An. Bras. Dermatol.* 2015; 90 (1): 62-73. doi: 10.1590/abd1806-4841.20152890
14. *Volkman E.R., Varga J.* Emerging targets of disease-modifying therapy for systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2019; 15 (4): 208-224. doi.org/10.1038/s41584-019-0184-z
15. *Гринева Е.М., Корнишева В.Г., Гулордава М.Д.* Коморбидные заболевания у больных с локализованной склеродермией. *Проблемы медицинской микологии.* 2022; 24 (2): 64. [Grineva E.M., Kornisheva V.G., Gulordava M.D. Comorbid diseases in patients with morphea. *Problems in Medical Mycology.* 2022; 24 (2): 64. (In Russ)].
16. *Abbas L., Joseph A., Kunzler E., Jacobe H.T.* Morphea: progress to date and the road ahead. *Ann. Transl. Med.* 2021; 9 (5): 437. doi: 10.21037/atm-20-6222
17. *Снарская Е.С., Семечак Ю.А.* Склероатрофический лишай аногенитальной локализации: клинико-морфологические, дифференциально-диагностические особенности и комплексный метод лечения. *РМЖ. Медицинское обозрение.* 2019; 3 (12): 9-13. [Snarskaya E.S., Semenchak Yu.A. Anogenital lichen sclerosus: clinicopathologic, differential diagnostic features and complex treatment method. *RMJ. Medical Review.* 2019; 12: 9-13. (In Russ)].
18. *Weir C. and Jan A.* BMI classification percentile and cut off points. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. 27. PMID: 31082114
19. *Hassan I., Arif T., Anwar P.* Thyroid dysfunctions in morphea: A preliminary report. *Indian J. Dermatol. Venereol.* 2014; 80 (6): 579. doi.org/10.4103/0378-6323.144230
20. *Popławska-Kita A., Siewko K., Telejko B., et al.* Body mass analysis in patients with Hashimoto thyroiditis. *Prog. Health Sci.* 2014; 4: 18-23. doi.org/10.1530/endoabs.35.P978
21. *Song R., Wang B., Yao Q., et al.* The impact of obesity on thyroid autoimmunity and dysfunction: a systematic review and meta-analysis. *Front. Immunol.* 2019; 10: 2349. doi.org/10.3389/fimmu.2019.02349

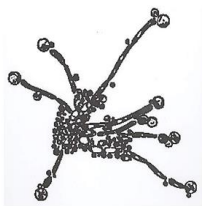
22. *Гринева Е.М., Корнишева В.Г., Разнатовский К.И.* Патология щитовидной железы у пациентов, страдающих очаговой склеродермией. Проблемы медицинской микологии. 2022; 24 (4): 66-71. [Grineva E.M., Kornisheva V.G., Raznatovsky K.I. Thyroid pathology in patients with localized scleroderma. Problems in Medical Mycology. 2022; 24 (4): 66-71. (In Russ)]. doi: 10.24412/1999-6780-2022-4-66-71

23. *Bolal M., Ates I., Demir B.F., et al.* The Relationship between homocysteine and autoimmune subclinical hypothyroidism. Int. J. Med. Biochem. 2020; 3 (1): 1-7. doi: 10.14744/ijmb.2019.13008

24. *Wu Y., Shi X., Tang X., et al.* The Correlation between metabolic disorders and Troab/Tgab: a cross-sectional population-based study. Endocr. Pract. 2020; 26: 869-882. doi.org/10.4158/EP-2020-0008

Поступила в редакцию журнала 16.01.2023

Принята к печати 24.01.2023



Для цитирования: Грицкова И.А., Пономаренко И.Г. Применение Карипаин Scar-ультрафонофореза у пациентов с рубцовыми изменениями кожи. Проблемы медицинской микологии. 2023; 25 (1): 38-42. DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-38-42

For citation: Gritskova I.A., Ponomarenko I.G. Application of the Karipain Scar-ultraphonophoresis technique in patients with scarring of the skin. Problems in Medical Mycology. 2023; 25 (1): 38-42. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-38-42

ПРИМЕНЕНИЕ КАРИПАИН SCAR-УЛЬТРАФОНОФОРЕЗА У ПАЦИЕНТОВ С РУБЦОВЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ КОЖИ

**¹Грицкова И.А. (врач-дерматовенеролог)*,
^{1,2}Пonomаренко И.Г. (доцент)**

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова;
²Северо-Западный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

В статье рассмотрена клиническая эффективность коррекции рубцовых изменений кожи с помощью комбинации ультрафонофореза с ферментным гелем с высокой транскутанной и протеолитической активностью. Приведены клинические результаты применения данной лечебной программы. Пациентка В., 38 лет, поступила на лечение с ампутацией правой голени в нижней трети. На момент осмотра предъявляла жалобы на формирующиеся рубцы сроком существования 3 месяца. У пациента И., 31 год, после электротравмы – множественные рубцовые изменения нижних конечностей сроком существования 4 года. Пациентка М., 30 лет, с гипертрофическими рубцами груди сроком существования 4 месяца, после повторной маммопластики, в результате которой было проведено вынужденное рассечение формирующихся рубцов. После проведения курса Карипаин Scar - ультрафонофореза наблюдали улучшение клинического статуса, по данным шкалы POSAS, рубцовых деформаций кожи, определена положительная динамика показателей качества жизни по шкале ДИКЖ.

Ключевые слова: рубцы кожи, ультрафонофорез, ферментный гель с высокой транскутанной и протеолитической активностью, клинический случай

APPLICATION OF THE KARIPAIN SCAR-ULTRAPHONOPHORESIS TECHNIQUE IN PATIENTS WITH SCARRING OF THE SKIN

**¹Gritskova I.A. (dermatovenereologist),
^{1,2}Ponomarenko I.G. (associate professor)**

¹S.M. Kirov Military Medical Academy; ²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

The article discusses the clinical efficacy and safety of the use of physiotherapy techniques by means of ultraphonophoresis in combination with the enzyme gel Karipain Scar. The clinical results of the application of this treatment program are presented. Patient V., 38 years old, was admitted for treatment with amputation of the right lower leg in the lower third. At the time of examination, there were single atrophic scars, with a duration of 3 months. Patient I., 31 years old, after an electric trauma, multiple atrophic scarring of the lower extremities was formed, with a life span of 4 years. Patient M., 30 years old, with hypertrophic breast scars with a lifespan of 4 months, after repeated mammoplasty, where a forced dissection of the emerging scars was performed. After the course of Karipain Scar - ultraphonophoresis, an improvement in the clinical status was observed according to the POSAS scale of scar deformities of the skin, an increase in quality of life indicators was determined according to the DLQI scale.

Key words: skin scars, ultraphonophoresis, enzyme gel with high transcutaneous and proteolytic activity, case report

ВВЕДЕНИЕ

Пациенты с послеожоговыми, послеоперационными, постампутационными рубцами и контрактурами кожи неизбежно сталкиваются с проблемой выраженных эстетических несовершенств и зачастую персистирующих субъективных ощущений в области сформировавшихся дефектов, оказывающих негативное влияние на качество жизни [1]. С учетом недостаточной эффективности существующих консервативных малоинвазивных методов коррекции рубцовых изменений кожи актуальной задачей является совершенствование существующих и разработка новых лечебных технологий, обладающих выра-

* Контактное лицо: Грицкова Инна Александровна,
e-mail: inusik2002klan@mail.ru

женной клинической эффективностью, благоприятным профилем безопасности, оптимальными и доступными для пациентов методиками применения [2-5].

На протяжении нескольких десятилетий электро- и ультрафонофорез коллагенолитических лекарственных средств применяют в целях превентивной послеоперационной терапевтической поддержки процессов регенерации кожи и для коррекции уже сформировавшихся фиброзных изменений на различных стадиях [6-8]. Наряду с физическими методами лечения, широко используют различные фибромодулирующие препараты в качестве топической терапии [9, 10]. Однако предписанное инструкцией по применению «втирание» таких препаратов в область рубца зачастую сопровождается раздражающим действием и, как следствие, может вызывать аллергические реакции, интенсивное индуцированное разрастание фиброзных тканей. Кроме того, зачастую использование наружных средств терапии ограничивает отсутствие показаний для коррекции только формирующихся или длительно существующих рубцовых деформаций, невозможность трансдермальной доставки активных компонентов препарата в глубокие слои кожи. Низкая эффективность коррекции вышеупомянутыми методами в качестве монодействия актуализирует вопрос поиска и разработки комбинированных технологий, новых комплексных программ лечения. Нами проведено исследование клинической эффективности ультрафонофореза ферментного геля с высокой транскутанной и протеолитической активностью «Карипаин Scar» у пациентов с послеоперационными, постожоговыми и посттравматическими рубцовыми изменениями кожи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В июне 2022 г. в реабилитационное отделение клиники ФГБУ «Федеральный научный центр реабилитации инвалидов им. Г.А. Альбрехта» (ФГБУ ФНЦРИ им. Г.А. Альбрехта) обратилась пациентка В., 38 лет, с жалобами на имеющиеся рубцовые изменения кожи правой голени, сформированные 3 месяца назад после ятрогенного воздействия, которое повлекло за собой ампутацию правой нижней конечности на уровне нижней трети. Поводом для обращения были выраженные субъективные ощущения в области рубцовых дисплазий: болезненность, зуд, чувство дискомфорта. Пациент И., 31 год, обратился в реабилитационное отделение клиники ФГБУ ФНЦРИ имени Г.А. Альбрехта в июле 2022 г. с жалобами на множественные обширные рубцовые деформации кожи нижних конечностей. Из анамнеза известно, что данные изменения были получены в результате электротравмы 4 года назад, по поводу

чего проведена ампутация правой голени в верхней трети, осложненная остеомиелитом и парезом малоберцового нерва на этапе кожной пластики. Мужчина отмечал значительное снижение качества жизни, вызванное натяжением кожи и, соответственно, ограничением двигательной функции в суставах, присутствием выраженного чувства дискомфорта в виде ощущения стянутости, периодически возникающего умеренного зуда и болезненности. Пациентка М., 30 лет, поступила на лечение в клинику ФГБУ ФНЦРИ имени Г.А. Альбрехта в мае 2022 г. с жалобами на гипертрофические рубцы на коже груди после неудачной маммопластики. Хирургическое вмешательство проводили дважды, последнее из них – повторная пластика груди с вынужденным рассечением формирующихся рубцов 4 месяца назад. У пациентки наблюдали выраженное негативное влияние имеющихся рубцовых деформаций на ее психоэмоциональный статус.

При осмотре: у пациентки В – на коже нижней трети правой голени атрофический рубец линейной формы, длиной 18 см, шириной 2,5 см, розового цвета (Рис. 1 а,б). У пациента И. – множественные обширные атрофические рубцы, белого цвета (Рис. 2). У пациентки М. – множественные гипертрофические рубцы линейной формы, розового цвета, длиной до 15 см, шириной до 1 см (Рис. 3).



а



б

Рис. 1 (а, б). Пациентка В. Состояние рубцовых изменений кожи до начала лечения.



Рис. 2. Пациент И. Состояние рубцовых изменений кожи до начала лечения.



Рис. 3. Пациентка М. Состояние рубцовых дисплазий до лечения.

Пациентам выполнен курс физиотерапевтического лечения: ультрафонофорез по ферментному гелю Карипаин Scar по лабильной методике, в течение 10 минут, мощностью до 0,8 Вт/см². Курс состоял из 10 процедур, проводимых через день.

Критерии оценки эффективности лечения: регресс клинических проявлений на 50-75%, уменьшение интенсивности окраски и пигментации, изменение конфигурации рубца, нормализация макрорельефа кожи, увеличение подвижности тканей, разрешение субъективных ощущений и устранение чувства скованности при выполнении функции анатомической области кожи.

Рубцовые деформации кожи анализировали с помощью сертифицированных и адаптированных для данного исследования инструментальных методов поперечной динамометрии, продольной тензометрии и дистанционной термографии непосредственно перед началом курса терапии, после, а также спустя 3 месяца после лечения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После окончания курса ультрафонофореза ферментного геля с высокой транскутанной и протеолитической активностью отмечено улучшение клинических показателей по оценке пациента и врача: показатели общего внешнего вида, цвета, рельефа поверхности (Рис. 4 а,б; 5, 6), положительная динамика показателей качества жизни.



а



б

Рис. 4 (а, б). Пациентка В. Состояние после курса Карипаин Scar - ультрафонофореза.



Рис. 5. Пациент И. Состояние после курса Карипаин Scar - ультрафонофореза.



Рис. 6. Пациентка М. Состояние после завершения курса физиотерапевтического лечения посредством ультрафонофореза по ферментному гелю Карипаин Scar.

При оценке инструментальных показателей выявили значимую динамику температурного поля и показателей упруго-эластических свойств тканей вне зависимости от сроков и причин рубцевания, что свидетельствует о выраженном ремоделировании кожи в области рубцовых деформаций.

Учитывая то, что основой рубца является коллаген – грубый фибриллярный белок, методы лечения основаны на применении препаратов, которые разрушают его избыточное количество. С помощью ультрафонофореза, метода физического воздействия, обладающего фибромодулирующим и фибромодеструктивным лечебными эффектами и потенцирующего действие противорубцовых препаратов, возможно добиться не только мгновенной трансдермальной доставки ферментных препаратов в ткани рубца, но и улучшить проницаемость эпидермиса для их молекул.

Сегодня в связи с относительно недавним появлением нового противорубцового препарата с уникальным составом на российском фармацевтическом рынке – Карипаина Scar актуальным является формирование его научно обоснованного применения в сочетании с наиболее эффективными методами физического воздействия. В состав препарата включены ферменты прямого действия: коллагеназа с увеличенной концентрацией, которая оказывает избирательное ферментативное действие на рубцовую ткань, гидролизируя пептидные связи коллагена; папаин – фермент класса эндопротеаз, способный катализировать гидролиз пептидных связей в молекуле белка, пептидов, амидов, эфиров и значительно уменьшать плотность рубцовой ткани; растительный экстракт нейрофенсин – нейроседативный концентрат натурального происхождения, способствующий уменьшению выраженности субъективных ощущений, нацеленный на гиперреактивность нейронов, подавление субклинического воспаления и усиление

барьерной функции кожи. Также благодаря входящему в состав транскутанному высокоактивному проводнику – металлокомплексному соединению «Тизоль» препарат обладает противовоспалительным и антисептическим действием, нормализует тем самым сроки репаративных процессов, уменьшает воспалительные явления (эритему, отечность, инфльтрацию), за счет чего может применяться на самых ранних этапах формирования рубцов и в качестве их профилактики.

Во время прохождения курса терапии негативных последствий в виде побочных явлений не наблюдали.

ВЫВОДЫ

Улучшение клинической картины, функциональных свойств рубцовых деформаций кожи (показателей внешнего вида, васкуляризации (цвета) и растяжимости), показателей качества жизни, а также благоприятный профиль безопасности позволяют обосновать дальнейшую перспективность применения лечебного комплекса Карипаин Scar-ультрафонофореза при любых сроках существования рубцовых деформаций кожи: для реабилитации пациентов после операций в процессе формирования фиброзных дисплазий, для оптимальной коррекции эстетически неприемлемых зрелых рубцовых деформаций.

Полученные результаты позволяют рекомендовать применение лекарственной композиции, обладающей протеолитической и транскутанной активностью, в сочетании с ультрафонофорезом для лечения рубцовых изменений кожи в ходе коррекции посттравматических, постожоговых и постампутационных рубцов кожи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shen W., Chen L., Tian F. Research progress of scar repair and its influence on physical and mental health. *Int. J. Burns. Trauma.* 2021; 11 (6): 442-446. PMID: PMC8784744
2. Khetarpal S., Kaw U., Dover J.S., Arndt K.A. Laser advances in the treatment of burn and traumatic scars. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 2017; 36 (4):185-191. doi: 10.12788/j.sder.2017.030
3. Стенько А.Г., Шматова А.А., Щукина Е.В. и др. Клинический опыт применения электродного фармафореза в лечении и профилактике рубцовых поражений кожи. *Клиническая дерматология и венерология.* 2014; 12 (1): 63-67. [Sten'ko A.G., Shmatova A.A., Shchukina E.V., et al. Clinical experience of employing electrode pharmacophoresis to treat and prevent cicatricial skin lesions. *Clinical Dermatology and Venereology.* 2014; 12 (1): 63-67. (In Russ.)].
4. Круглова Л.С., Течиева С.Г., Стенько А.Г., Шматова А.А. Современный взгляд на инновационные методы терапии патологических рубцовых деформаций. *Клиническая дерматология и венерология.* 2014; 12 (5): 105-116. Kruglova L.S., Techieva S.G., Sten'ko A.G., Shmatova A.A. Modern view on the innovative therapies of pathological cicatricial deformities. *Clinical Dermatology and Venereology.* 2014; 12 (5): 105-116. (In Russ.)].
5. Oosterhoff T.C.H., Beekman V.K., Van der List J.P., Niessen F.B. Laser treatment of specific scar characteristics in hypertrophic scars and keloid: A systematic review. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2021; 74 (1): 48-64. doi:

10.1016/j.bjps.2020.08.108

6. *Соболева М.Ю.* Морфофункциональные особенности восстановления целостности кожи при термической травме. Клиническая и экспериментальная морфология. 2019; 8 (1): 71-77. [Soboleva M.Yu. Morphofunctional features of the restoration of the integrity of the skin after thermal injury. Clinical and Experimental Morphology. 2019; 8 (1): 71-77 (In Russ)]. doi: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-71-77

7. *Патрушев А.В., Хайрутдинов В.Р., Белоусова И.Э., Самцов А.В.* Клинико-морфологические особенности эластолитических гранулем. Вестник дерматологии и венерологии. 2014; 90 (4): 58-67. [Patrushev A.V., Khairutdinov V.R., Belousova I.E., Samtsov A.V. Clinical and morphological features of elastolytic granulomas. Bulletin of Dermatology and Venereology. 2014; 90 (4): 58-67. (In Russ)].

8. *Пономаренко Г.Н., Карпова Т.Н.* Физические методы лечения рубцов. СПб., 2009. 112 с. [Ponomarenko G.N., Karpova T.N. Physical methods of treatment of scars. St. Petersburg, 2009. 112 p. (In Russ)].

9. *Xie Y., Qi C., Dong Y., et al.* Poly (γ -glutamic acid)/chitoooligo-saccharide/papain hydrogel prevents hypertrophic scar during skin wound healing. J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater. 2021; 109 (11): 1724-1734. doi: 10.1002/jbm.b.34830

10. *Часнойть А.Ч., Жилинский Е.В., Серебряков А.Е., Тимошок Н.Ю.* Оценка противорубцовой эффективности препарата Ферменкол. Медицинские новости. 2015; 11: 36-40. [Chasnoits A.Ch., Zhilinski E.V., Serebryakou A.E., Tsimashok N.Yu. Antiscar evaluation of Fermentkol. Medical news. 2015; 11: 36-40 (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 12.12.22

Принята к печати 22.12.2022



Для цитирования: Кукушкина К.С., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Корнишева В.Г., Разнатовский К.И. Показатели иммунитета у больных гнездовой алопецией в зависимости от содержания витамина Д в сыворотке крови. 2023; 25 (1): 43-50. DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-43-50

For citation: Kukushkina K.S., Frolova E.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Kornisheva V.G., Raznatovsky K.I. Immunity parameters in patients with alopecia areata depending on the content of vitamin D in blood serum. Problems in Medical Mycology. 2023; 25 (1): 43-50. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-43-50

ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ГНЕЗДНОЙ АЛОПЕЦИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА D В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Кукушкина К.С. (аспирант)*, Фролова Е.В. (зав. лаб.), Учеваткина А.Е. (с.н.с.), Филиппова Л.В. (с.н.с., доцент), Корнишева В.Г. (профессор кафедры), Разнатовский К.И. (зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Гнездная алопеция (ГА) – распространенное аутоиммунное воспалительное заболевание, поражающее волосяные фолликулы и приводящее к выпадению волос без рубцов. Патогенез ГА не до конца ясен, несмотря на накопленные доказательства иммуноопосредованной природы этого заболевания. Целью работы было изучение взаимосвязи между показателями иммунитета и уровнем витамина D у больных гнездовой алопецией. В исследование включили 45 пациентов с ГА прогрессирующей стадии (Me – 42 года). Группу сравнения составили 25 здоровых лиц (Me – 43 года), уровень витамина D – $35 \pm 1,5$ нг/мл. Больных ГА разделили на 3 группы: 1 группа (n=18) – с дефицитом витамина D (25 (ОН) D <20 нг/мл); 2 группа (n=17) – с недостаточностью витамина D (25 (ОН) D от 20 до 29 нг/мл); 3 группа (n=10) – с нормальным уровнем витамина D (25 (ОН) D ≥ 30 нг/мл).

Провели иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови, определили уровни иммуноглобулинов (Ig) A, M, G, оценили метаболическую активность нейтрофилов в НСТ-тесте.

Выявлено повышение абсолютного числа CD4⁺T-хелперов и НКТ-клеток у всех пациентов с ГА по сравнению с контрольными значениями. При тяжелом течении ГА установлено увеличение абсолютного числа активированных CD3⁺CD25⁺T-лимфоцитов, относительного количества НКТ-клеток и усиление метаболической активности нейтрофилов. У больных ГА с дефицитом и недо-

статком витамина D отмечено повышение абсолютного числа CD4⁺T-хелперов и уровня IgA по отношению к показателям здоровых лиц. Особенностью иммунного профиля пациентов с дефицитом витамина D явилось повышение абсолютного числа активированных CD3⁺CD25⁺T-клеток и В-лимфоцитов. Клиническая значимость показателей спонтанного и активированного НСТ-теста у больных ГА подтверждается положительной корреляционной связью с тяжестью течения заболевания. Полученные данные удостоверяют участие иммунных механизмов в патогенезе ГА и влияние на них недостатка и дефицита витамина D.

Ключевые слова: гнездовая алопеция, витамин D, НКТ-клетки, Т-лимфоциты, В-лимфоциты НСТ-тест

IMMUNITY PARAMETERS IN PATIENTS WITH ALOPECIA AREATA DEPENDING ON THE CONTENT OF VITAMIN D IN BLOOD SERUM

Kukushkina K.S. (postgraduate student), Frolova E.V. (head of the laboratory), Uchevatkina A.E. (senior scientific researcher), Filippova L.V. (senior scientific researcher, associate professor), Kornisheva V.G. (professor of the department), Raznatovsky K.I. (head of the department)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

Alopecia areata (AA) is a common inflammatory disease that affects the hair follicles and leads to hair loss without scarring. The pathogenesis of AA is not completely clear, despite the accumulated evidence of the immune-mediated nature of this disease. The aim of the work was to study the relationship between immunity parameters and vitamin D levels in patients with alopecia areata. The study included 45 patients with advanced stage AA (Me – 42 years). The comparison group consisted of 25 healthy people (Me – 43 years), vitamin D level – $35 \pm 1,5$ ng/ml.

Patients with AA were divided into 3 groups: group 1 (n=18) – with vitamin D deficiency (25 (OH) D <20

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

ng/ml); group 2 (n=17) – with vitamin D insufficiency (25 (OH) D from 20 to 29 ng/ml); group 3 (n=10) – normal D level (25 (OH) D \geq 30 ng/ml). Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes was performed, the levels of immunoglobulins A, M, G were determined, and the metabolic activity of neutrophils was assessed in the NBT-test.

An increase in the absolute number of CD4+T-helpers and NKT cells was found in all patients with AA compared with control values. In severe AA, an increase in the absolute number of activated CD3+CD25+T-lymphocytes, a relative number of NKT cells, and an increase in the metabolic activity of neutrophils were found. In patients with AA with vitamin D deficiency and insufficiency, an increase in the absolute number of CD4+ T-helpers and IgA levels was found in relation to healthy individuals. A feature of the immune profile of patients with vitamin D deficiency was an increase in the absolute number of activated CD3+CD25+ T cells and B lymphocytes. The clinical significance of the indicators of spontaneous and activated NBT-test in patients with AA is confirmed by a positive correlation with the severity of the course of the disease. The data obtained confirm the participation of immune mechanisms in the pathogenesis of AA and the influence of vitamin D deficiency and insufficiency on them.

Key words: alopecia areata, vitamin D, NKT cells, T-lymphocytes, B-lymphocytes NBT-test

ВВЕДЕНИЕ

Гнездная алопеция (ГА) является широко распространенным аутоиммунным воспалительным заболеванием, которое поражает волосяные фолликулы в фазе анагена [1]. Для него характерно нерубцовое выпадение волос, поражающее около 2% населения обоих полов и всех возрастных групп [2, 3]. Клинически у пациентов может наблюдаться очаговая, диффузная или полная потеря волос на теле [2, 3]. Заболевание имеет многофакторный характер, что предполагает комплексное взаимодействие генетических особенностей организма и экзогенных триггеров, провоцирующих развитие ГА [4]. У пациентов, страдающих ГА, отмечена повышенная частота выявления других аутоиммунных заболеваний, в частности, щитовидной железы, витилиго, сахарного диабета 1-го типа, красной волчанки и пр. [5, 6]. В качестве возможного пускового механизма ГА рассматривают целый ряд факторов окружающей среды, стресс, генерализованные вирусные и бактериальные инфекционные процессы, которые у ряда лиц могут способствовать неадекватному иммунному ответу, направленному против волосяных фолликулов.

Считается, что в нормальных физиологических условиях в волосяном фолликуле и вокруг него создается локальная иммуноингибирующая среда, которая защищает его от патологических иммунных реакций. Формирование иммуносупрессивной среды

обусловлено отсутствием антигенов главного комплекса гистосовместимости (МНС, от англ. major histocompatibility complex) I класса на клетках во внешней оболочке корневого влагалища и в клетках матрикса волосяного фолликула. Полагают, что нарушение иммунной привилегии волосяного фолликула способствует развитию ГА, при которой воспалительные клетки атакуют пигмент-продуцирующие луковицы анагеновых волос. В ряде публикаций показано, что ассоциированные с меланогенезом аутоантигены, которые в норме исключены из иммунной привилегии функционального волосяного фолликула, могут быть ключевой мишенью аутоагрессивного воспаления при ГА [7]. При иммуногистологическом исследовании очагов поражения у больных ГА установлено нарушение количества и функции пери- и интрафолликулярных воспалительных клеток, причем эти изменения более выражены в активной стадии заболевания [8]. Цитотоксические CD8⁺T-клетки атакуют внутрифолликулярные области, в то время как CD4⁺T-хелперы и NK-клетки накапливаются вокруг внешней корневой оболочки волосяных фолликулов [9]. Этот дисбаланс в воспалительных клетках приводит к нарушению иммунной привилегии волосяного фолликула [7, 8]. Отметим, что изменения в числе и активности воспалительных клеток ограничиваются не только очагом поражения, но также наблюдаются в селезенке, лимфатических узлах и периферической крови пациентов с аутоиммунным процессом. Поэтому необходимо изучить особенности циркулирующих иммунных клеток и их функциональную активность у больных ГА [10].

В последнее время появляется все больше данных об участии витамина D и его рецепторов и в гомеостазе кожи [11, 12], и в регуляции врожденного и адаптивного иммунитета [13]. Показано, что витамин D стимулирует дифференцировку моноцитов в классические макрофаги и усиливает хемотаксис и фагоцитарную активность макрофагов [21]. Wang T.T. и соавторы (2004) продемонстрировали, что 1,25-дигидроксивитамин D (1,25(OH)₂D) активирует транскрипцию антимикробных пептидов кателицидина и β -дефензина-2 в кератиноцитах и повышает метаболическую активность нейтрофилов. Однако 1,25(OH)₂D ингибирует дифференцировку и созревание дендритных клеток, уменьшает экспрессию молекул МНС II класса, тем самым подавляя презентацию антигена [13]. Кроме того, витамин D модулирует функцию T-хелперов (Th) 1-го типа за счет подавления синтеза провоспалительных цитокинов: интерлейкина-1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-12, интерферона (IFN)- γ , фактора некроза опухоли α (TNF- α) и усиления продукции цитокинов Th2 (IL-4, IL-13) [15]. Установлено, что 1,25(OH)₂D подавляет экспрессию цитокинов, связанных с Th17 [16]. По-

мимо Т-лимфоцитов, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ также индуцирует апоптоз активированных В-клеток, подавляет пролиферацию В-клеток и снижает образование плазматических клеток и В-клеток памяти [16]. Ученые сформулировали гипотезу, что снижение активности Th1 и Th17 может являться одним из механизмов, при котором витамин D подавляет аутоиммунные заболевания, опосредуемые нарушением иммунного гомеостаза [7, 10, 16, 17]. Многие исследователи предполагают, что ГА связана с дисбалансом циркулирующих Т-лимфоцитов и клеток врожденного иммунитета [1], однако знания о состоянии системного иммунитета и влиянии на иммунные клетки витамина D при данном заболевании недостаточны.

Цель нашего исследования: изучить взаимосвязь между показателями иммунитета и уровнем витамина D у больных гнездной алопецией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проспективное исследование включили 45 пациентов в возрасте от 19 до 66 лет (медиана – 42 года) с ГА прогрессирующей стадии. Группу сравнения составили 25 здоровых людей в возрасте от 21 до 68 лет (медиана – 43 года) с нормальным уровнем витамина D (средний уровень концентрации кальцидола – $35 \pm 1,5$ нг/мл). Для оценки степени тяжести ГА учитывали состояние волосяного покрова на волосистой части головы, других участках кожного покрова и поражение ногтевых пластинок. Использовали международную стандартизованную инструкцию SBN, которая позволяет относительно объективно оценить площадь потери волос на скальпе – S (Scalp), теле – B (Body), поражение ногтевых пластинок – N (Nail) [Olsen E., et al., 2004]. Легкая степень тяжести – поражение до 25% скальпа (n=26) без поражения тела и ногтевых пластин, тяжелая степень – поражение волосистой части головы свыше 25%, отсутствие волос на туловище, поражение ногтевых пластин (n=19).

Исследование проводили на базе НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. Пациенты с гнездной алопецией были разделены на 3 группы в зависимости от уровня концентрации $25(\text{OH})\text{-D-}25$ -гидроксихолекальциферола: 1 группа (n=18) – с дефицитом $25(\text{OH})\text{-D-}25$ -гидроксихолекальциферола ($25(\text{OH})\text{-D} < 20$ нг/мл); 2 группа (n=17) – с недостаточностью $25(\text{OH})\text{-D-}25$ -гидроксихолекальциферола ($25(\text{OH})\text{-D}$ от 20 до 29 нг/мл); 3 группа (n=10) – с нормальным уровнем $25(\text{OH})\text{-D-}25$ -гидроксихолекальциферола ($25(\text{OH})\text{-D} \geq 30$ нг/мл).

Критерии включения в исследование: больные ГА старше 18 лет, наличие заболевания в прогрессирующей стадии. Критерии исключения: возраст до 18 лет; алкогольная и наркотическая зависимости; беременность, лактация; пациенты, находящиеся на иммуносупрессивной терапии; заболевания почек.

Имунофенотипирование лимфоцитов периферической крови было выполнено методом 6-цветного цитофлуориметрического анализа с использованием проточного цитометра Navios™ (Beckman Coulter, США). Подготовку образцов периферической крови и настройку цитофлуориметра осуществляли в соответствии с национальными рекомендациями. Лимфоциты окрашивали меченными флуорохромами моноклональными антителами (Beckman Coulter, США) в соответствии с рекомендациями производителя: CD45-PC5/5, CD4-FITC, CD8-ECD, CD3-APC, CD19-FITC, CD56-PC7 и CD25-PE (Beckman Coulter, США). После внесения антител образцы тщательно перемешивали, затем инкубировали при комнатной температуре 15 минут в защищенном от света месте. По завершении инкубации при постоянном перемешивании добавляли 500 мкл лизирующего раствора Versa Lyse Lysing Solution (Beckman Coulter, США), инкубировали еще 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. При цитометрическом анализе для каждого из образцов набирали не менее 5000 лимфоцитов. Полученные результаты были проанализированы при помощи программного обеспечения Navios™ Software v1.2 (Beckman Coulter, США). Для дополнительной характеристики Т-клеточного звена иммунной системы вычисляли иммунорегуляторный индекс (ИРИ) – соотношение $\text{CD}3^+\text{CD}4^+ / \text{CD}3^+\text{CD}8^+$.

Уровень общих иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке крови исследовали иммунотурбодиметрическим методом с использованием коммерческих наборов (Vital, Россия).

Уровень концентрации активной формы витамина D (25-гидроксикальциферол) определяли хемилюминесцентным иммунным анализом на микрочастицах (ECLIA, США).

Метаболическую активность (кислородозависимую бактерицидность) нейтрофилов оценивали в НСТ-тесте. Для этой цели применяли спонтанную и индуцированную зимозаном А («Sigma», США) реакцию восстановления нитросинего тетразолия (НСТ), позволяющую определить образование супероксидного анион-радикала. Использовали лейковзвесь гепаринизированной крови, полученную путем отстаивания при 37 °С. На предметных стеклах 30 мкл лейковзвеси смешивали с 30 мкл 0,02% раствора НСТ для оценки спонтанной реакции, с 60 мкл НСТ и 30 мкл 0,1% раствора зимозана – для активированной. Инкубацию клеток проводили в течение 30 минут во влажной камере при 37°. Стекла промывали фосфатно-солевым буфером, сушили, фиксировали в смеси Никифорова и окрашивали 1% раствором нейтрального красного. Оценку результатов осуществляли методом иммерсионной микроскопии, вычисляя % нейтрофилов, содержащих синие гранулы восстановленного диформаза.

Полученные в процессе исследования данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA 10 (StatSoft, США). Нормальность распределения количественных данных проверяли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Изучаемые характеристики представляли медианами, нижним и верхним квартилями (Me ($Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$)). Анализ сравнения 3-х и более групп выполняли с применением непараметрического (рангового) дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллису. Для оценки значимости различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Выявление корреляционных взаимосвязей между двумя количественными параметрами проводили непараметрическим методом ранговой корреляции по Спирмену с вычислением коэффициента ранговой корреляции (r). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первоначально больные ГА были разделены на 2 группы в зависимости от тяжести течения процесса: у 26 пациентов с очаговой и многоочаговыми формами ГА установлена легкая степень, у 19 человек с субтотальной, тотальной и универсальной формами ГА – тяжелая. Средняя длительность течения ГА составила $5,0 \pm 1,2$ года. Наиболее частыми сопутствующими заболеваниями были аутоиммунный тиреоидит (30%) и атопический дерматит (22%). Очаги хронической инфекции выявлены у 46% больных ГА, у 15% – диагностировано наличие вирусной инфекции (герпес вирус 1,2 типа, вирус Эпштейна-Барра).

Провели сравнительную характеристику иммунологических показателей пациентов с ГА в зависимости от тяжести течения заболевания (табл. 1).

Таблица 1

Субпопуляционный состав лимфоцитов крови у больных ГА с разной степенью тяжести и у здоровых лиц

Показатель		Больные ГА		Контрольная группа – здоровые (n=25) (3)	p^{Λ}	p^* при сравнении групп:		
		легкая степень (n=26) (1)	тяжелая степень (n=19) (2)			1, 2	1, 3	2, 3
Лейкоциты	$\times 10^9/\text{л}$	6,0 [5,1; 6,5]	6,0 [5,3; 6,8]	5,7 [5,3; 6,3]	0,87	0,84	0,84	0,57
Лимфоциты	%	44 [37; 49]	41 [33; 46]	36 [34; 37]	<0,001	0,21	0,0002	0,017
	$\times 10^9/\text{л}$	2,572 [1,856; 3,102]	2,464 [2,162; 2,640]	1,976 [1,890; 2,280]	0,0018	0,54	0,0054	0,0008
CD3+ CD19-	%	74 [69; 80]	76 [68; 79]	76 [70; 77]	0,79	0,63	0,57	0,72
	$\times 10^9/\text{л}$	1,925 [1,363; 2,384]	1,743 [1,634; 2,094]	1,478 [1,319; 1,652]	0,0054	0,74	0,013	0,0019
CD3+ CD4+	%	48 [41; 51]	44 [43; 54]	45 [42; 49]	0,81	0,77	0,54	0,75
	$\times 10^9/\text{л}$	1,163 [0,935; 1,485]	1,147 [0,933; 1,317]	0,880 [0,834; 1,006]	0,0018	0,88	0,0018	0,003
CD3+CD8+	%	25 [20; 28]	25 [21; 27]	26 [24; 29]	0,27	0,88	0,14	0,21
	$\times 10^9/\text{л}$	0,525 [0,458; 0,764]	0,574 [0,472; 0,726]	0,543 [0,454; 0,633]	0,54	0,86	0,55	0,21
CD3-CD19+	%	11 [9; 15]	11 [8; 15]	11 [10; 13]	0,90	0,70	0,92	0,70
	$\times 10^9/\text{л}$	0,281 [0,241; 0,359]	0,253 [0,211; 0,384]	0,235 [0,191; 0,295]	0,11	0,44	0,034	0,30
CD3+ CD4+CD25+	%	3,7 [3,2; 4,2]	3,7 [2,9; 5,4]	3,0 [2,4; 5,0]	0,51	0,59	0,56	0,24
	$\times 10^9/\text{л}$	0,099 [0,066; 0,110]	0,104 [0,067; 0,127]	0,066 [0,055; 0,097]	0,063	0,43	0,06	0,045
CD3-CD56+	%	10 [7; 15]	11 [7; 18]	12 [10; 14]	0,31	0,61	0,12	0,43
	$\times 10^9/\text{л}$	0,217 [0,140; 0,425]	0,298 [0,165; 0,401]	0,249 [0,196; 0,295]	0,67	0,51	0,46	0,61
CD3+ CD56+	%	3,0 [1,8; 4,8]	4,4 [2,8; 5,6]	2,3 [1,3; 3,0]	0,0036	0,046	0,15	0,0008
	$\times 10^9/\text{л}$	0,078 [0,043; 0,119]	0,098 [0,067; 0,156]	0,050 [0,032; 0,063]	<0,001	0,10	0,015	0,0001
ИРИ		2,1 [1,4; 2,7]	2,0 [1,4; 2,6]	1,7 [1,6; 1,9]	0,25	0,81	0,12	0,24

Примечание. p^{Λ} – значимость рангового дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллису; p^* – значимость критерия Манна-Уитни

У пациентов обеих групп установлено значимо более высокое абсолютное число лимфоцитов по сравнению с показателями контрольной группы ($p < 0,001$ – в 1 и 2 группах). Т-лимфоциты являются важными клетками приобретенного иммунного ответа и делятся на два основных типа: Т-хелперы и цитотоксические Т-клетки. Установлено, что вне зависимости от степени тяжести процесса для больных ГА было характерно повышение абсолютного числа $CD3^+T$ -лимфоцитов за счет $CD4^+T$ -хелперов ($p = 0,0018$; $p = 0,003$ соответственно). Такая же закономерность прослеживается для НКТ-клеток. Обнаружено увеличение абсолютного числа НКТ-клеток в обеих группах пациентов с ГА по сравнению с

контрольными показателями ($p = 0,0015$; $p = 0,0001$ соответственно). Отметим, что среди $CD3^+T$ -лимфоцитов у больных с тяжелым течением ГА преобладали клетки с активированным фенотипом $CD3^+CD25^+T$ -клетки, экспрессирующие рецептор к интерлейкину-2. Также для данной группы пациентов было характерно повышение относительного числа НКТ-клеток, которое достоверно отличалось как от показателей лиц с легким течением болезни ($p = 0,046$), так и контрольной группы ($p = 0,0008$). Не выявлено различий в числе В-лимфоцитов и НК-клеток между больными ГА и контрольной группой. Оценка метаболической активности нейтрофилов выполнялась в НСТ-тесте. У пациентов с тяжелым

течением заболевания установлено значимое повышение показателей спонтанного НСТ-теста (30,0% (20,0-48,0) vs 18,0% (14,0-19,0), $p=0,003$) и активированного НСТ-теста (62,0% (53,0-68,0) vs 57,0% (51,0-59,0), $p=0,024$) по отношению к контрольными показателями (Рис. 1).

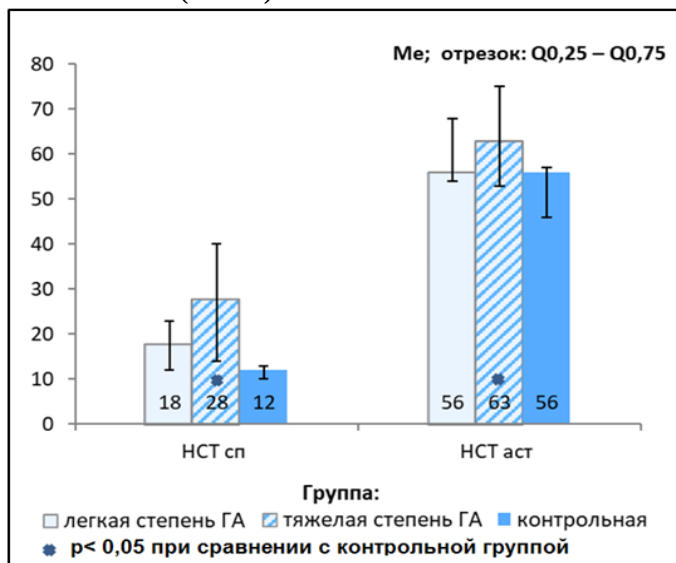


Рис. 1. НСТ сп. и НСТ акт. у больных ГА в зависимости от степени тяжести.

Таким образом, для всех больных ГА было характерно увеличение абсолютного числа $CD4^+$ Т-хелперов и НКТ-клеток по сравнению с контрольными значениями. Особенностью иммунного профиля пациентов с тяжелым течением ГА явилось увеличение абсолютного числа активированных $CD3^+CD25^+$ Т-лимфоцитов, относительного числа НКТ-клеток и усиление метаболической активности нейтрофилов.

На следующем этапе исследования больные ГА были разделены на группы в зависимости от уровня концентрации витамина D - 25 (ОН) D. Данные иммунофенотипирования лимфоцитов представлены в таблице 2.

Для больных 1 и 2 групп было характерно повышение абсолютного числа лимфоцитов за счет общей популяции $CD3^+$ Т-лимфоцитов, $CD4^+$ Т-хелперов ($p=0,001$; $p=0,0028$ соответственно) и усиление синтеза IgA ($p=0,001$; $p=0,018$ соответственно) по отношению к показателям здоровых лиц (табл. 3).

Таблица 2

Субпопуляционный состав лимфоцитов крови у больных ГА с разным уровнем витамина D и у здоровых лиц

Показатель	Больные ГА с разным уровнем витамина D3			Контрольная группа – здоровые (n=25) (4)	p^A	p^* при сравнении групп:			
	Дефицит витамина D (n=18)	Недостаток витамина D (n=17)	Нормальный уровень витамина D (n=10)			1, 4	2, 4	3, 4	
Лимфоциты	%	42 [35; 48]	44 [38; 48]	42 [36; 44]	36 [34; 37]	0,0028	0,012	0,0016	0,011
	$\times 10^9/\text{л}$	2,608 [2,294; 2,989]	2,464 [2,090; 2,832]	2,421 [1,764; 2,904]	1,976 [1,890; 2,280]	0,0027	< 0,001	0,016	0,083
Т-лимфоциты CD3+ CD19-	%	75 [68; 79]	79 [73; 82]	71 [67; 74]	76 [70; 77]	0,071	0,90	0,044	0,17
	$\times 10^9/\text{л}$	1,988 [1,695; 2,246]	1,859 [1,630; 2,094]	1,671 [1,363; 2,004]	1,478 [1,319; 1,652]	0,0061	0,0012	0,014	0,21
Т-хелперы CD3+ CD4+	%	46 [43; 50]	49 [43; 57]	41 [37; 49]	45 [42; 49]	0,14	0,68	0,11	0,23
	$\times 10^9/\text{л}$	1,169 [1,126; 1,548]	1,176 [0,998; 1,317]	1,000 [0,880; 1,248]	0,880 [0,834; 1,006]	0,0014	< 0,001	0,0028	0,19
Т-лимфоциты цитотоксические CD3+ CD8+	%	24 [20; 27]	21 [21; 27]	26 [25; 28]	26 [24; 29]	0,23	0,06	0,15	0,97
	$\times 10^9/\text{л}$	0,572 [0,499; 0,744]	0,524 [0,439; 0,764]	0,597 [0,458; 0,759]	0,543 [0,454; 0,633]	0,60	0,16	0,94	0,37
В-лимфоциты CD3-CD19+	%	12 [9; 15]	11 [7; 14]	11 [8; 15]	11 [10; 13]	0,87	0,66	0,63	0,74
	$\times 10^9/\text{л}$	0,285 [0,253; 0,384]	0,246 [0,186; 0,336]	0,253 [0,232; 0,312]	0,235 [0,191; 0,295]	0,099	0,016	0,57	0,19
Т-лимфоциты с рецепторами к ИЛ-2 CD3+ CD4+CD25+	%	4,1 [3,2; 4,9]	3,6 [2,1; 4,9]	3,5 [3,3; 3,8]	3,0 [2,4; 5,0]	0,34	0,10	0,97	0,55
	$\times 10^9/\text{л}$	0,105 [0,080; 0,124]	0,094 [0,065; 0,116]	0,097 [0,066; 0,109]	0,066 [0,055; 0,097]	0,092	0,015	0,24	0,15
НК-клетки CD3-CD56+	%	11 [8; 13]	8 [5; 15]	15 [9; 20]	12 [10; 14]	0,050	0,22	0,023	0,41
	$\times 10^9/\text{л}$	0,269 [0,183; 0,346]	0,168 [0,126; 0,334]	0,342 [0,194; 0,610]	0,249 [0,196; 0,295]	0,13	0,74	0,10	0,22
НКТ-клетки CD3+CD56+	%	3,0 [1,6; 5,2]	3,4 [2,1; 4,8]	4,5 [2,8; 6,3]	2,3 [1,3; 3,0]	0,024	0,08	0,086	0,0039
	$\times 10^9/\text{л}$	0,082 [0,046; 0,139]	0,083 [0,058; 0,102]	0,104 [0,067; 0,127]	0,050 [0,032; 0,063]	0,0030	0,012	0,0061	0,0015
ИРИ		2,0 [1,7; 2,6]	2,3 [1,6; 2,7]	1,6 [1,3; 2,6]	1,7 [1,6; 1,9]	0,14	0,074	0,048	0,53

Примечание: p^A – значимость рангового дисперсионного анализа по Краскелу–Уоллису; p^* – значимость критерия Манна–Уитни

Таблица 3

Уровни иммуноглобулинов в сыворотке крови у больных ГА с разным уровнем витамина D3 и здоровых лиц (Ме [Q1; Q3])

Показатель	Больные ГА с разным уровнем витамина D3			Контрольная группа – здоровые (n=25) (4)	p ^Λ	p* при сравнении групп:		
	Дефицит витамина D (n=18) (1)	Недостаток витамина D (n=17) (2)	Нормальный уровень витамина D (n=10) (3)			1, 4	2, 4	3, 4
IgA 0,7-4,0	2,35 [1,77; 2,99]	2,43 [1,88; 2,73]	2,80 [1,79; 4,07]	1,72 [1,49; 2,31]	0,027	0,011	0,018	0,074
IgM 0,4-2,6	1,67 [0,86; 1,90]	1,57 [1,29; 1,86]	1,98 [1,44; 2,25]	1,40 [1,10; 1,74]	0,34	0,45	0,40	0,055
IgG 7,0-15,0	10,68 [8,51; 12,67]	11,08 [9,11; 12,23]	10,84 [9,39; 11,97]	11,00 [10,32; 11,55]	0,82	0,30	1,00	0,60

Примечание: p^Λ – значимость рангового дисперсионного анализа по Краскелу–Уоллису; p* – значимость критерия Манна–Уитни

Установлено повышение абсолютного числа НКТ-клеток (табл. 2) и усиление спонтанной и активированной метаболической активности нейтрофилов у всех больных ГА (Рис. 2).

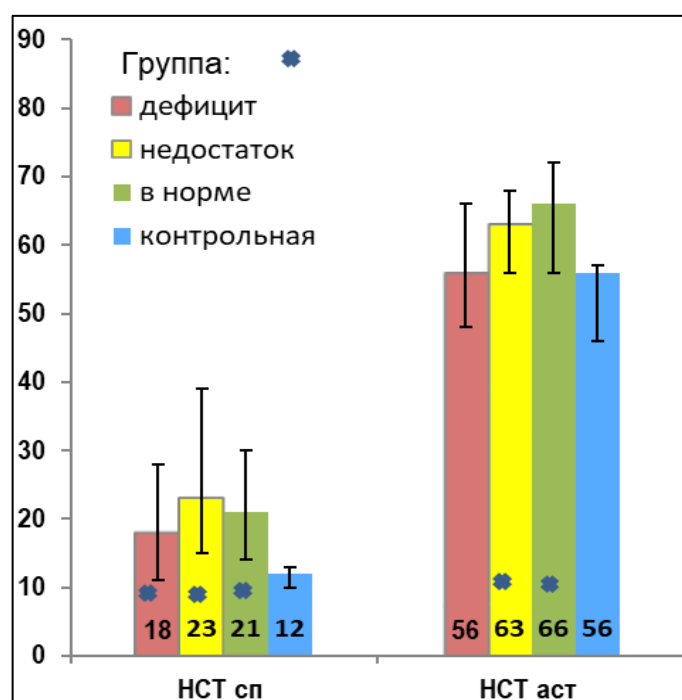


Рис. 2. НКТ сп. и НКТ. аст. в зависимости от уровня витамина D.

Характерной особенностью больных с дефицитом витамина D было повышение абсолютного числа активированных CD3⁺CD25⁺Т-клеток и В-лимфоцитов (табл. 2). Установлена положительная корреляционная связь между показателями спонтанного и активированного НКТ-теста и тяжестью течения заболевания по индексу SBN (r=0,41; p=0,002; r=0,31; p=0,001).

ОБСУЖДЕНИЕ

Гнездная алопеция – это локализованное аутоиммунное заболевание волосяных фолликулов, которое характеризуется очаговым, диффузным или полным выпадением волос на теле. Несмотря на растущие знания о ГА, ее патогенез до сих пор остается

неясным. Известно, что иммунная система состоит из врожденного и адаптивного иммунитета и поддерживает сложный баланс между защитой от вторжения патогенов и толерантностью к безопасным антигенам и аутоантигенам. Нарушения в регуляции иммунного ответа могут привести к возникновению гипервоспалительных реакций и инициировать аутоиммунный процесс. Влияние витамина D на показатели иммунной системы у больных ГА изучено недостаточно.

В нашем исследовании повышение абсолютного числа CD4⁺Т-хелперов выявлено у 89% пациентов с тяжелым течением ГА и у 78% – с легким. Также увеличение абсолютного числа CD4⁺Т-лимфоцитов установлено в группах лиц с дефицитом и недостатком витамина D. Причем для больных с тяжелым течением ГА и дефицитом витамина D было характерно значимо высокое содержание активированных CD3⁺CD25⁺Т-клеток. Данный фенотип Т-лимфоцитов отличается повышенной экспрессией рецепторов к интерлейкину-2, что свидетельствует об их активационном статусе и отражает развитие иммуновоспалительного состояния у пациентов с ГА. Не установлено изменений в числе цитотоксических CD8⁺Т-лимфоцитов у больных ГА по отношению к показателям контрольной группы. Полученные данные не совпадают с результатами Younes A.K. и соавторов, которые выявили снижение числа CD4⁺Т-лимфоцитов и цитотоксических CD8⁺ Т-клеток в периферической крови пациентов с ГА по сравнению со здоровыми людьми [18]. Однако отметим, что в данном исследовании, также как и в нашей работе, установлено повышение абсолютного числа лимфоцитов у больных ГА по отношению к показателям контроля, а количество CD4⁺Т-хелперов и цитотоксических CD8⁺ Т-клеток представлено в относительных значениях, а не в абсолютных. В последнее время появляется все больше доказательств того, что баланс Th1, Th17 и регуляторных Т-клеток (Treg) играет важную роль в патогенезе аутоиммунного заболевания [19]. Необходимо подчеркнуть, что среди различных субпопуляций Т-лимфоцитов основной мишенью для 1,25(OH)2D являются Th. 1,25(OH)2D не только подавляет их

пролиферацию, но и регулирует продукцию ими цитокинов [15]. Это согласуется с полученными нами данными, так как наибольшее число CD4⁺Т-лимфоцитов, экспрессирующих активационные маркеры, выявлены у больных с дефицитом витамина D.

В проведенном исследовании не обнаружено изменений в числе НК-клеток у пациентов с ГА по отношению к контрольным значениям и не отмечено зависимости их числа от уровня витамина D. Однако у всех больных установлено повышение числа НКТ-клеток по сравнению с контрольными показателями (табл. 1 и 2). Повышение числа НКТ-клеток при дефиците витамина D не противоречит данным Jang Y.H. и соавторов, которые подчеркивают важность НКТ клеток в патогенезе ГА [20]. Наши данные согласуются с работами Гаджигороевой А.Г. и Балтабаева А.А. [21, 22]. Несмотря на то, что данные авторы не проводили параллель с концентрацией витамина D, известно, что повышение концентрации кальцидола ингибирует пролиферацию НКТ-клеток. Можно высказать предположение, что увеличение числа НКТ-клеток связано не только с аутоиммунным воспалением, но и с персистенцией бактериальной, вирусной или паразитарной инфекции. Нами у 46% больных ГА выявлены очаги хронической инфекции.

У пациентов с дефицитом витамина D установлено увеличение как относительного и абсолютного числа В-лимфоцитов, так и уровня IgA (табл. 3). Полученные результаты согласуются с данными Ренна G. и соавторов (2000) об ингибирующем влиянии витамина D на дифференцировку и пролиферацию В-клеток в плазматические клетки и В-клетки памяти.

Спонтанный и активированный НСТ-тест позволяет оценить состояние кислородозависимого механизма микробицидности нейтрофилов крови *in*

vitro. Он характеризует состояние и степень активации внутриклеточной НАДФ-Н-оксидазной антибактериальной системы. Повышение показателей НСТ-теста отмечают при антигенном раздражении вследствие микробного вторжения и аутоиммунных процессах. Повышение способности нейтрофилов восстанавливать НСТ является свидетельством напряженности метаболических процессов у всех пациентов с ГА, включенных в исследование. Клиническая значимость показателей спонтанного и активированного НСТ-теста у больных ГА подтверждается положительной корреляционной связью с тяжестью течения заболевания.

В ходе работы установлено, что у всех пациентов с ГА имели место признаки иммуновоспалительного процесса. Наиболее выраженные изменения выявлены у больных с недостатком и дефицитом витамина D, что заключалось в повышении числа Т-лимфоцитов с активационными маркерами, В-лимфоцитов и уровня IgA. Эти изменения могут свидетельствовать о наличии у пациентов с ГА признаков аутоиммунного воспаления, которое усугубляется на фоне недостатка и дефицита витамина D.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенной работы мы впервые изучили особенности клеточного и гуморального иммунитета у пациентов с ГА на фоне дефицита и недостаточности витамина D.

Полученные нами данные подчеркивают возможную роль витамина D в патогенезе ГА. Поскольку патогенез ГА многогранен, следует учитывать сопутствующую патологию у больных.

Необходимо продолжить исследование в данном направлении с более расширенной выборкой пациентов.

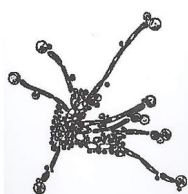
ЛИТЕРАТУРА

1. Hosking A.M., Juhasz M., Atanaskova Mesinkovska N. Complementary and alternative treatments for alopecia: a comprehensive review. *Skin Appendage Disord.* 2019; 5 (2): 72-89. doi.org/10.1159/000492035
2. Pratt C.H., et al. Alopecia areata. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2017; 3 (1): 1-17. doi.org/10.1038/nrdp.2017.11
3. Fricke A.C.V., Miteva M. Epidemiology and burden of alopecia areata: a systematic review. *Clin. Cosmet Investig. Dermatol.* 2015; 8: 397. doi.org/10.2147/CCID.S53985
4. Goh C., Finkel M., Christos P.J., Sinha A.A. Profile of 513 patients with alopecia areata: associations of disease subtypes with atopy, autoimmune disease and positive family history. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2006; 20 (9): 1055-1060. doi.org/10.1111/j.1468-3083.2006.01676.x
5. Mostafa W.Z., et al. Vitamin D and the skin: focus on a complex relationship: a review. *J. Adv. Res.* 2015; 6 (6): 793-804. doi.org/10.1016/j.jare.2014.01.011
6. Кукушкина К.С., Корнишева В.Г., Разнатовский К.И. Дефицит витамина D у больных гнездовой алопеции и atopическим дерматитом. *Проблемы медицинской микологии.* 2022; 24 (4): 77-80. [Kukushkina K.S., Kornisheva V.G., Raznatovsky K.I. Vitamin D deficiency in patients with alopecia areata and atopic dermatitis. *Problems in Medical Mycology.* 2022; 24 (4): 77-81. (In Russ)]. doi: 10.24412/1999-6780-2022-4-77-81

7. Paus R., Bulfone-Paus S., Bertolini M. Hair follicle immune privilege revisited: the key to alopecia areata management. In: Journal of Investigative Dermatology symposium proceedings. Elsevier. 2018
8. Bertolini M., et al. Hair follicle immune privilege and its collapse in alopecia areata. *Exp. Dermatol.* 2020; 29 (8): 703-25. doi.org/10.1111/exd.14155
9. Guo H., et al. The role of lymphocytes in the development and treatment of alopecia areata. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 2015; 11 (12): 1335-51. doi.org/10.1586/1744666X.2015.1085306
10. Islam N., et al. The autoimmune basis of alopecia areata: a comprehensive review. *Autoimmun Rev.* 2015; 14 (2): 81-9. doi.org/10.1016/j.autrev.2014.10.014
11. Mostafa W.Z., Hegazy R.A. Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. *J. Adv. Res.* 2015, 6, 793-804. doi.org/10.1016/j.jare.2014.01.011
12. Lin X., Meng X., Song Z. Vitamin D and alopecia areata: possible roles in pathogenesis and potential implications for therapy. *Am. J. Transl. Res.* 2019; 11 (9): 5285-5300. PMID: PMC6789271
13. Корнишева В.Г., Кукушкина К.С. Значение витамина D в иммунной системе и патогенезе аутоиммунных процессов кожи (обзор). *Проблемы медицинской микологии.* 2018; 20 (3): 15-20. [Kornisheva V.G., Kukushkina K.S. The value of vitamin D in the immune system and the pathogenesis of autoimmune processes of the skin (review). *Problems in Medical Mycology.* 2018; 20 (3): 15-20. (In Russ)].
14. Rosen Y., Daich J., Soliman I., et al. Vitamin D and autoimmunity. *Scand. J. Rheumatol.* 2016; 45: 439-447. doi.org/10.3109/03009742.2016.1151072
15. Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin. Endocrinol.* 2012; 76: 315-325. doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04261.x
16. Chang S.H., Chung Y., Dong, C.J. Vitamin D suppresses Th17 cytokine production by inducing C/EBP homologous protein (CHOP) expression. *Biol. Chem.* 2010; 285: 38751-38755. doi.org/10.1074/jbc.C110.185777
17. Котрехова Л.П., Васильева Н.В., Разнатовский К.И. и др. Клинико-лабораторные предикторы и терапия микозов кожи, обусловленных *Malassezia* spp. *Клиническая дерматология и венерология.* 2011; 9 (4): 79-83. [Kotrehkova L.P., Vasil'eva N.V., Raznatovskii K.I., et al. Clinical and laboratory predictors and therapy of skin mycoses caused by *Malassezia* spp.. *Klinicheskaya Dermatologiya i Venerologiya.* 2011; 9(4): 79-83. (In Russ)].
18. Younes A.K., Hammad R., Othman M. and Sobhy A. CD4, CD8 and natural killer cells are depressed in patients with alopecia areata: their association with disease activity. *BMC Immunology.* 2022; 23:13. doi.org/10.1186/s12865-022-00486-4
19. Han Y.M., Sheng Y.Y., Xu F., et al. Imbalance of T-helper 17 and regulatory T cells in patients with alopecia areata. *J. Dermatol.* 2015; 42 (10): 981-8. doi: 10.1111/1346-8138.12978
20. Jang Y.H., Choi J.K., Jang Y.H., et al. Increased blood levels of NKG2D1CD4 T cells in patients with alopecia areata. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2017; 76 (1): 151-153. doi: 10.1016/j.jaad.2016.07.056
21. Гаджигороева А.Г., Коган Е.А., Потехаев Н.Н. и др. Соотношение процессов апоптоза, пролиферации, неоангиогенеза и клеточной дифференцировки при иммунном воспалении в очагах гнездовой алопеции. *Клиническая дерматология и венерология.* 2010; 8 (2): 25-34. [Gadzhigoroeva A.G., Kogan E.A., Potekaev N.N., et al. Relative significance of apoptotic and proliferative processes, neoangiogenesis, and cellular differentiation for immune inflammation at sites affected by circumscribed alopecia. *Klinicheskaya Dermatologiya i Venerologiya.* 2010; 8 (2): 25-34. (In Russ)].
22. Балтабаев А.М., Ниязов Б.С., Балтабаев М.К., Токталиев Дж.Дж. Современные клинические аспекты течения гнездовой алопеции. *Consilium Medicum. Дерматология (Прил.).* 2016; 4: 10-14. [Baltabaev A.M., Niyazov B.S., Baltabaev M.K., Toktaliev Dj.Dj. Modern aspects of clinical course of alopecia areata. *Consilium Medicum. Dermatology (Suppl.).* 2016; 4: 10-14. (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 08.02.2023

Принята к печати 16.02.2023



Для цитирования: Платонова А.В., Эсавулова Л.Т., Пономаренко И.Г., Теличко И.Н. Первичный сифилис половых органов с индуративным отеком и ложноотрицательными серологическими реакциями. 2023; 25 (1): 51-54. DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-51-54

For citation: Platonova A.V., Esavulova L.T., Ponomarenko I.G., Telichko I.N. Primary genital syphilis with indurative edema and false negative serological reactions. Problems in Medical Mycology. 2023; 25 (1): 51-54. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-51-54

ПЕРВИЧНЫЙ СИФИЛИС ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ С ИНДУРАТИВНЫМ ОТЕКОМ И ЛОЖНООТРИЦАТЕЛЬНЫМИ СЕРОЛОГИЧЕСКИМИ РЕАКЦИЯМИ

¹Платонова А.В. (врач-дерматовенеролог)*,
¹Эсавулова Л.Т. (врач-дерматовенеролог),
^{2,3}Пономаренко И.Г. (доцент), ³Теличко И.Н.
(профессор, главный врач)

¹Кожно-венерологический диспансер №7; ²Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (кафедра физической и реабилитационной медицины); ³Кожно-венерологический диспансер №4, Санкт-Петербург, Россия

Выявление пациентов с сифилисом на наиболее ранних стадиях является первостепенной задачей врача-дерматовенеролога. Существуют риски упущения случаев развития этого заболевания из-за получения ложноотрицательных лабораторных результатов обследования и неклассической клинической картины заболевания. В статье описан случай первичного сифилиса половых органов у молодого мужчины. Первичный аффект был представлен двумя болезненными эрозиями в области венечной борозды и внутреннего листка крайней плоти без признаков уплотнения в основании и без регионарного лимфаденита. Отрицательные результаты микроскопического и серологического исследования при первичном обследовании на сифилис привели к отсрочке в постановке диагноза, его прогрессированию с формированием индуративного отека крайней плоти. После назначения специфической антибактериальной терапии все клинические проявления разрешились в течение 10 дней.

Ключевые слова: сифилис, первичный аффект, серологическая диагностика, клинический случай

PRIMARY GENITAL SYPHILIS WITH INDURATIVE EDEMA AND FALSE NEGATIVE SEROLOGICAL REACTIONS

¹Platonova A.V. (dermatovenerologist),
¹Esavulova L.T. (dermatovenerologist),
^{2,3}Ponomarenko I.G. (associate professor),
³Telichko I.N. (professor, head physician)

¹Dermatovenerologic Dispensary №7; ²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov;
³Dermatovenerologic Dispensary №4, St. Petersburg, Russia

Identification of patients with syphilis at the earliest stages is the primary task of a dermatovenerologist. There are risks of missing cases of the development of this disease due to the receipt of false negative laboratory examination results and a non-classical clinical picture of the disease. This article describes a case of primary genital syphilis in a young man. The primary affect was represented by two painful erosions in the area of the coronal furrow and the inner leaf of the foreskin without signs of compaction at the base and without regional lymphadenitis. Negative results of microscopic and serological investigation during the initial examination for syphilis led to a delay in the diagnosis, its progression with the formation of indurative edema of the foreskin. After the appointment of specific antibacterial therapy, all clinical manifestations resolved within 10 days.

Key words: syphilis, primary affect, serological diagnosis, case report

ВВЕДЕНИЕ

Вопросы ранней диагностики сифилиса как социально-значимого заболевания актуальны и в наши дни. Случаи неправильной постановки диагноза ведут к распространению инфекции, ее прогрессированию с развитием тяжелых поражений внутренних органов, нервной системы, возможности заражения от матери плода. Встречаемость диагностических ошибок, по данным отечественных авторов, составляет порядка 30% от числа всех заболевших, на первичный сифилис приходится больше 84% из них [1,

* Контактное лицо: Платонова Анна Вячеславовна,
e-mail: platonova1105@gmail.com

2]. Трудности в постановке диагноза связаны с abortивными формами и неклассическим течением сифилиса, сочетанием сифилиса с другими инфекциями, передающимися половым путем, маскирующими клиническую картину, получением ложноотрицательных результатов лабораторных исследований [3].

Клиническая картина сифилиса может меняться из-за самостоятельного применения пациентами наружных и системных антибиотиков, недостаточных для адекватного лечения заболевания, но влияющих на активность бледной трепонемы [4], а также из-за индивидуальных особенностей иммунитета больных и, прежде всего, сочетания с другими тяжелыми заболеваниями, такими как ВИЧ-инфекция [5].

Выявление бледной трепонемы при темнопольной микроскопии отделяемого эрозий не всегда возможно из-за высокой восприимчивости бактерии к любым внешним воздействиям, приводящим к ее инаktivации и последующей гибели [6].

Родионов А.Н. в книге «Сифилис» (2007) отмечает, что ложноотрицательные серологические реакции чаще всего имеют место из-за возникновения «серологического окна», когда клинические проявления первичного сифилиса уже есть, однако вследствие низкого уровня специфических антител на момент тестирования или в результате развития «эффекта прозоны», когда уровень антител настолько высок, что правильного связывания с антигеном не происходит, формируется парадоксальная отрицательная серологическая реакция.

В данной статье описан случай первичного сифилиса без формирования классического первичного аффекта с ложноотрицательной серологической реакцией в начале заболевания и развитием индуративного отека при его прогрессировании.

Клиническое наблюдение

Пациент М., 33 лет, житель г. Санкт-Петербурга, обратился в СПб ГБУЗ КВД №7 28.09.2022 г. с жалобами на язвочки в области полового члена, болезненные при пальпации, существующие в течение 15 дней. Самостоятельно обрабатывал раствором хлоргексидина без эффекта.

Анамнез жизни: соматически здоров, вредные привычки отрицает, аллергологический и эпидемиологический анамнез без особенностей.

Половой анамнез: холост, имеет постоянную половую связь с женщиной в течение 10 лет и периодически – случайные половые контакты с мужчинами. Последний такой половой контакт был около 1,5 месяцев назад, без использования барьерной контрацепции. Половая партнерша обследована от 30.09.22 г.: здорова, данных для розыска и обследования половых партнеров нет.

Результаты физикального, лабораторного и инструментального исследований.

Дерматологический статус: специфические высыпания не обнаружены. Зев не гиперемирован. Наружные половые органы развиты правильно. Головка полового члена умеренно гиперемирована, губки уретры не склеены друг с другом, выделений нет. На внутреннем листке крайней плоти определяются две эрозии диаметром 1 см, покрытые беловато-желтым налетом в центре, при пальпации умеренно болезненные, не уплотнены. Органы мошонки безболезненны при пальпации. Область ануса без особенностей. Паховые лимфатические узлы не увеличены, пальпируются в количестве 1-2, диаметром до 0,5 см, безболезненны, не спаяны с окружающими тканями (Рис.1).



Рис. 1. Пациент М., 33 года. Эрозии венечной борозды и внутреннего листка крайней плоти.

Результаты лабораторного обследования:

При темнопольной микроскопии отделяемого эрозий от 28.09.22 г. бледная трепонема не обнаружена.

Серологическая диагностика от 29.09.22 г.: реакция микропреципитации (РМП) – отрицательная, иммуноферментный анализ (ИФА) – отрицательный.

Микроскопическое исследование отделяемого уретры от 28.09.22 г.: *Neisseria gonorrhoeae* и *Trichomonas vaginalis* не обнаружены.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) отделяемого уретры от 29.09.22 г.: *Chlamydia trachomatis* не обнаружена.

На основании данных анамнеза, клинической картины, результатов анализов выставлен предварительный диагноз «баланопостит».

Назначено лечение: спиртовой раствор фукоцина на эрозии 3-4 раза в день, половой покой.

Назначен контрольный осмотр через 5 дней.

На повторный прием пациент явился только 16.10.22 г. в связи с резким ухудшением клиниче-

ской картины. На телефонные звонки не отвечал, ссылаясь на занятость.

Контрольный осмотр 16.10.22 г. Кожные покровы туловища и слизистая оболочка полости рта без высыпаний. Головка полового члена гиперемирована, губки уретры не склеены друг с другом, выделений нет. В области венечной борозды и на внутреннем листке крайней плоти сохраняются две эрозии диаметром до 1,2 см, покрытые беловато-желтым налетом в центре, при пальпации безболезненные, с незначительным уплотнением в основании. Осмотр затруднен в связи с появлением выраженного отека крайней плоти. Отек плотный, безболезненный. Органы мошонки безболезненны при пальпации. Область ануса без особенностей. Паховые лимфатические узлы не увеличены (Рис. 2).



Рис. 2. Пациент М., 33 года. Индуративный отек крайней плоти.

Пациент направлен на повторное серологическое обследование.

Серологическая диагностика от 18.10.22 г.: РМП – 4+1/2, ИФА – IgG (+), коэффициент позитивности (КП) – 2,6 1/320; IgM (+), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) – 4+.

На основании клинической картины (индуративный отек, шанкры полового члена), лабораторного обследования (положительные серологические реакции) выставлен диагноз: сифилис первичный половых органов (A51.0 согласно МКБ-10).

Назначено специфическое лечение: Бициллин 5 – 1,5 млн. ЕД внутримышечно №5.

На фоне терапии наблюдали полное исчезновение отека, эпителизацию эрозий.

Пациенту назначен клинико-серологический контроль через 3 месяца.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данный клинический случай интересен неклассическим течением первичного сифилиса: наличие болезненности и отсутствие уплотнения в области эрозий при первичном осмотре пациента, отсутствие регионарного лимфаденита на всем протяжении наблюдения. Отметим, что отсутствие заметной реакции со стороны лимфатических узлов может быть характерным проявлением патоморфоза сифилиса.

Причиной отрицательного анализа при темнопольной микроскопии может быть самостоятельное применение пациентом раствора хлоргексидина, который мог воздействовать на трепонему. В таких случаях целесообразно назначение примочек с физиологическим раствором на трое суток с последующим повторным обследованием на трепонему.

Вероятно, что отрицательные серологические реакции в данном случае были обусловлены отсутствием антител к инфекции в момент обследования. Нетрепонемные тесты становятся положительными в среднем через 2 недели от момента появления первичного аффекта, а трепонемные – часто положительны уже с третьей недели заболевания. Возможно, у данного пациента имелась индивидуальная тенденция к замедленной позитивизации серологических реакций. За наличие индивидуальных особенностей в течении заболевания также свидетельствует отсутствие пахового лимфаденита. Мы предположили возможность увеличения других групп лимфатических узлов (мезентериальных), осмотр которых невозможен без применения инструментальных методов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что несвоевременная диагностика сифилиса приводит к упущению наиболее благоприятных сроков для лечения заболевания, а также повышает риски более тяжелого его течения и вероятность распространения инфекции путем заражения бытовых и половых контактов.

Важно при обследовании пациентов с подозрением на сифилис наиболее полно собирать анамнез жизни, заболевания, проведенного предварительно лечения, а также использовать широкий спектр лабораторных обследований: темнопольную микроскопию и провокационную пробу к ней. Целесообразно назначение нескольких трепонемных тестов в диагностически неоднозначных случаях и повторное обследование пациентов с отрицательными серологическими анализами через 2-4 недели.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мавлютова Г.И., Юсупова Л.А., Минуллин И.К. Практические аспекты эволюции клинических маркеров сифилитической инфекции. Учебное пособие для врачей. Казань: Медок, 2013; с. 36. [Mavlyutova G.I., Yusupova L.A., Minullin I.K. Practical aspects of the evolution of clinical markers of syphilitic infection. A textbook for doctors. Kazan: Medok, 2013; p. 36. (In Russ)].
2. Дмитриев Г.А., Доля О.В., Васильева Т.И. Сифилис: феномен, эволюция, новация. М.: Бином, 2010; с. 367. [Dmitriev G.A., Dolya O.V., Vasilyeva T.I. Syphilis: phenomenon, evolution, innovation. М.: Binom, 2010; p. 367. (In Russ)].
3. Чеботарев В.В. Сифилис. Ставрополь: Седьмое небо, 2010; с. 445. [Chebotarev V.V. Syphilis. Stavropol: Seventh Heaven, 2010; p. 445. (In Russ)].
4. Мавлютова Г.И., Юсупова Л.А. Ошибки диагностики сифилиса в практике врачей различных специальностей. Лечащий врач. 2014; 11: 13-17. [Mavlyutova G.I., Yusupova L.A. Syphilis diagnosis errors in medical practice in different specialties. Lvrach.ru. 2014; 11: 13-17. (In Russ)].
5. Miller B.A., Hicks Ch. B. Syphilis and HIV: the intersection of two epidemics. Journal Watch. 2010.
6. Самцов А.В., Барбинов В.В. Дерматовенерология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016; 432 с. [Samtsov A.V., Barbinov V.V. Dermatovenereology. Moscow: GEOTAR-Media, 2016; 432 p. (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 09.02.2023

Принята к печати 18.02.2023



Для цитирования: Кондратенко О.В., Зубова К.В., Бочкарева П.В., Исмагуллин Д.Д. Распространенность представителей порядка *Flavobacteriales* у пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2023; 25 (1): 55-59. DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-55-59

For citation: Kondratenko O.V., Zubova K.V., Bochkareva P.V., Ismatullin D.D. Prevalence of representatives of the order *Flavobacteriales* in patients with cystic fibrosis in the Russian Federation. Problems in Medical Mycology. 2023; 25 (1): 55-59. (In Russ). DOI: 10.24412/1999-6780-2023-1-55-59

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОРЯДКА *FLAVOBACTERIALES* У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

¹Кондратенко О.В. (зав. лаб.), ²Зубова К.В. (аспирант), ¹Бочкарева П.В. (студент), ¹Исмагуллин Д.Д. (зав. лаб.)*

¹Самарский государственный медицинский университет, Самара; ²Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

Муковисцидоз (МВ) – наиболее частое моногенное заболевание. Как известно, многие бактерии, выделяемые из респираторных образцов пациентов с МВ, являются представителями почвенного биоценоза и ризосферы различных растений. В отношении ряда возбудителей, таких как *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, клиническое значение и патогенетическая роль при муковисцидозе доказана различными исследованиями. В то же время появляется все больше публикаций, свидетельствующих о повышении интереса ученых к группе бактерий с неустановленным к настоящему времени клиническим значением. К одной из таких групп бактерий относятся представители порядка *Flavobacteriales*. Доминирующими по частоте выделения из респираторных образцов среди членов указанной группы являются представители рода *Chryseobacterium*, реже – родов *Empedobacter* и *Elizabethkingia*. В статье представлены данные исследования, проведенного в период 2018-2022 гг. В рамках рутинного микробиологического обследования было выполнено 9735 исследований респираторных образцов от пациентов с МВ из более 60 регионов Российской Федерации. Таким образом, несмотря на то, что в подавляющем большинстве случаев при изучении микробиоты респираторных образцов больных муковисцидозом отмечаются однократные эпизоды выделения штаммов представителей порядка *Flavobacteriales*, у 28,2% обследованных лиц отмечены случаи повторных высевов. Эти данные необходимо учитывать при установке этиологической роли при различных инфекционных осложнениях у пациентов с муковисцидозом.

Ключевые слова: муковисцидоз, *Flavobacteriales*, *Chryseobacterium*, *Empedobacter*, этиологическая роль

PREVALENCE OF REPRESENTATIVES OF THE ORDER *FLAVOBACTERIALES* IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS IN THE RUSSIAN FEDERATION

¹Kondratenko O.V. (head of the laboratory), ²Zubova K.V. (postgraduate student), ¹Bochkareva P.V. (student), ¹Ismatullin D.D. (head of laboratory)

¹Samara State Medical University, Samara; ²Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevsky, Saratov, Russia

Cystic fibrosis (CF) is the most common monogenic disease. As is known, many bacteria isolated from the respiratory samples of patients with CF are representatives of the soil biocenosis and the rhizosphere of various plants. With regard to a number of pathogens, such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, the clinical significance and pathogenetic role in cystic fibrosis has been proven by various studies. At the same time, there are more publications indicating an increase in scientific interest in a group of bacteria with currently unidentified clinical significance. Representatives of the order *Flavobacteriales* belong to one of these groups of bacteria. Representatives of the genus *Chryseobacterium* dominate in the frequency of isolation from respiratory samples among the members of this group, less often representatives of the genera *Empedobacter* and *Elizabethkingia*. The article presents data from a study conducted in the period 2018-2022. As part of a routine microbiological examination, 9735 studies of respiratory samples from patients with CF from more than 60 regions of the Russian Federation were performed. Thus, despite the fact that in the overwhelming majority of cases, in the study of the microbiota of respiratory samples of patients with cystic fibrosis, single episodes of the isolation of strains of representatives of the order *Flavobacteriales* are noted, in 28,2% of the patients examined, cases of repeated inoculations were noted. These data should be taken into account when establishing the etiological role in various infectious complications in patients with cystic fibrosis.

Key words: cystic fibrosis, *Flavobacteriales*, *Chryseobacterium*, *Empedobacter*, etiological role

* Контактное лицо: Исмагуллин Данир Дамирович,
e-mail: danirhalitov@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Муковисцидоз (МВ) – самое частое моно-генное заболевание. Как известно, большинство бактерий, выделяемых из респираторных образцов от пациентов с данным заболеванием, являются представителями почвенного биоценоза и ризосферы различных растений. В отношении ряда возбудителей, таких как *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* и некоторых других видов, клиническое значение и патогенетическая роль при МВ доказаны многочисленными исследованиями [1-3]. В то же время все большее количество появляющихся публикаций свидетельствует о повышении интереса ученых к группе бактерий с неустановленным к настоящему времени клиническим значением при данном заболевании. К одной из таких групп микроорганизмов относятся представители порядка *Flavobacteriales*. Доминирующими по частоте выделения из респираторных образцов среди членов указанной группы являются представители рода *Chryseobacterium*, реже – представители родов *Empedobacter* и *Elizabethkingia* [4-6].

Следует отметить тенденцию к увеличению числа зарубежных публикаций, посвященных эпизодам выделения этих грамотрицательных бактерий из респираторных образцов от больных МВ. Группа испанских исследователей описывает случаи наблюдения за пациентами с МВ, легкие которых были колонизированы штаммами *Chryseobacterium* spp., при этом у больных фиксировались, в том числе, и случаи хронического инфицирования, сопровождающиеся снижением легочной функции. Кроме того, авторы также отмечают высокий профиль антибиотикорезистентности выделенных культур [7]. В исследовании, проведенном Lambiase A. и коллегами, приводится описание случаев выделения 35 штаммов *Chryseobacterium* spp. от 22 пациентов из 300, наблюдавшихся в итальянском центре МВ [8]. К сожалению, практически отсутствуют данные о распространенности этой группы бактерий у больных МВ в Российской Федерации, не описаны видовая структура и случаи хронической колонизации.

Цель работы: оценить видовое разнообразие и кратность выделения из респираторных образцов от пациентов с МВ в Российской Федерации штаммов бактерий – представителей порядка *Flavobacteriales* за период 2018-2022 гг.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на базе микробиологического отдела КДЛ Клиник ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (Самара). За период 2018-2022 гг. в рамках рутинного микробиологического обследования было выполнено 9735 исследований образцов

мокроты от 252 пациентов в возрасте от 6 до 25 лет, проживающих в различных регионах Российской Федерации, у которых отмечены эпизоды выделения представителей порядка *Flavobacteriales* с МВ.

За указанный период было выделено 27815 штаммов микроорганизмов, среди которых 6498 (23,4%) составили представители неферментирующих грамотрицательных бактерий (НФГОБ).

Идентификацию выделенных культур проводили с помощью программы MALDI Biotyper 3.0 Offline Classification на базе MALDI-ToF масс-спектрометра Microflex LT, library revision 11 (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования было выделено 434 штамма бактерий – представителей порядка *Flavobacteriales*, что составило 6,8% от числа всех НФГОБ и 1,6% от общего количества выявленных штаммов за описываемый период. Указанные штаммы были изолированы из 423 респираторных проб. Среди рассматриваемой группы микроорганизмов были представители трех родов бактерий: *Chryseobacterium*, *Empedobacter*, а также *Elizabethkingia*. Все штаммы идентифицированы до вида с показателем Score больше 2,000.

Лидирующее место в структуре выделенных штаммов занимали представители рода *Chryseobacterium* – 306 штаммов (70,5%), среди них наиболее распространенными видами оказались *C. gleum* – 103 (33,7%), *C. indologenes* – 88 (28,8%), а также *C. arthrosphaerae* – 32 (10,5%). *C. joostei* занял четвертое место по частоте обнаружения из респираторных образцов, на долю представителей этого вида пришлось 22 штамма (7,2%). В равной степени частоты, по 12 штаммов (3,9%) соответственно, выявляли виды *C. tractae*, *C. oraniemense*, *C. hamamense*. Распространенность штаммов *C. gambrini* и *C. scophtalmum* составила 6 (2,0%) и 5 (1,6%) соответственно. За исследуемый период отмечено 3 случая (0,9%) выделения штаммов *C. taihuense*. Более редкие представители рода, такие как *C. shandongense*, *C. pallidum* и *C. hominis*, встречались в 0,7% случаев. Штаммы *C. profundimaris*, *C. ureilyticum*, *C. bovis*, *C. piscicola* и *C. oncorhynchi* были обнаружены однократно, по 0,3% соответственно.

На втором месте по распространенности оказались представители рода *Empedobacter* в количестве 100 штаммов, среди которых было 90 (90,0%) штаммов *E. falsenii* и 10 (10,0%) – *E. brevis*.

Кроме того, выявлено 28 штаммов бактерий рода *Elizabethkingia*, среди которых было 16 штаммов (57,1%) *E. miricola*, 9 (32,1%) – *E. meningoseptica* и 3 (10,8%) – *E. anopheles*.

За рассматриваемый пятилетний период в разные годы в видовой структуре штаммов доминировали различные представители *Chryseobacterium* spp. Так, в частности *C. gleum*, в 2018 г. был самым распространенным в общевидовой структуре *Chryseobacterium* spp., на его долю приходилось 63,8% от всех изолятов, в то время как в последующие годы прослеживалась тенденция к снижению его роли, и к 2021 г. его выявляемость снизилась до 20,8%, а к концу 2022 г. составила 17,7%.

В то же время *C. indologenes*, на долю которого в 2018 г. приходилось 19,4% от всех выделенных штаммов – представителей *Chryseobacterium* spp., к 2021 г. занял лидирующее положение в общевидовой структуре с показателями 31,9%, к концу 2022 г. данный вид, по-прежнему, опережал *C. gleum*. Однако с 2021 г. в видовой структуре значительную роль начинают играть штаммы *C. arthrosperae*: в 2021 г. они составили 22,2%, в 2022 г. – 25,8%. Кроме того, отметим общее расширение видового разнообразия выделяемых штаммов *Chryseobacterium* spp. с пяти видов, выделенных в 2018 г., до двенадцати видов, полученных к концу 2022 г.

Доминирующее положение в видовой структуре штаммов – представителей рода *Empedobacter* на протяжении указанного пятилетнего периода занимал *E. falsenii*, доля которого в структуре рассматриваемых бактерий составляла в разные годы от 80% до 95,8%. Случаи обнаружения штаммов *E. brevis* из респираторных образцов от больных МВ имели единичный характер, и их вклад в структуру штаммов не превышал 20%.

Штаммы *Elizabethkingia* spp. – наиболее редкие представители порядка *Flavobacteriales*, выделяемые от пациентов с МВ. Случаи выявления указанных штаммов являются единичными, и при оценке их распространенности в рассматриваемый временной период не прослеживаются закономерностей и тенденций к росту или снижению числа тех или иных видов.

Таким образом, несмотря на то, что представители порядка *Flavobacteriales* – достаточно редко выделяемая группа микроорганизмов, следует отметить значительную широту их видового разнообразия в респираторных образцах от больных МВ.

Представители порядка *Flavobacteriales* к настоящему времени не имеют установленного клинического значения при МВ. Мы провели оценку распространенности этих бактерий в респираторных пробах за период 2018-2022 гг. в зависимости от наличия в них микроорганизмов с доказанным клиническим значением при данном заболевании. В число таких видов вошли *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans*, *B. ceracia complex*, а также *S. maltophilia*. В большинстве исследованных проб – 232 образцах (54,8%) были выделены, помимо представителей порядка

Flavobacteriales, бактерии с доказанным клиническим значением при МВ. Однако в оставшейся 191 пробе (45,2%) таких бактерий обнаружено не было, то есть не было других более значимых видов, кроме представителей порядка *Flavobacteriales*, чье клиническое значение при данном заболевании не установлено в рамках статистически значимых исследований, но, как мы отмечали ранее, отмечено публикациями отдельных авторов [9].

Среди образцов, содержащих ассоциации с клинически значимыми видами, выявлены как пробы, содержащие один вид бактерий с доказанной ролью в развитии бронхолегочных осложнений при МВ, так и ассоциации из двух видов.

Наиболее часто представители порядка *Flavobacteriales* выделялись из респираторных образцов в сочетании со штаммами *S. aureus* – в 78 пробах, *P. aeruginosa* – в 53 и *S. maltophilia* – в 47, а также в 13 случаях с комбинациями штаммов *S. maltophilia* и *S. aureus* в рамках одного образца.

Обратившись к оценке количества респираторных проб, содержащих представителей порядка *Flavobacteriales*, в зависимости от наличия в них микроорганизмов с доказанным клиническим значением при МВ отдельно в каждом году за исследуемый период, нами были получены следующие данные. Если в 2018 г. на долю респираторных образцов, содержащих штаммы представителей порядка *Flavobacteriales* и не содержащих других, более значимых клинически видов бактерий, приходилось 23,9% проб, то уже в 2019 г. и 2020 г. наблюдали рост этих показателей до 44,9% и 41,7% соответственно. К 2021 г. процентное соотношение проб, содержащих представителей порядка *Flavobacteriales*, и как содержащих, так и не содержащих в дополнение к ним штаммы клинически значимых бактерий, становится практически сопоставимым – 50,5% против 49,5% проб. А уже в 2022 г. отмечен превалирующий рост количества проб, содержащих представителей порядка *Flavobacteriales* как единственных потенциально значимых бактерий в пробах. Это обстоятельство может указывать на возрастающую роль бактерий данной группы в видовой структуре микроорганизмов, колонизирующих респираторных тракт пациентов с МВ, и, возможно, и в микробиологических взаимоотношениях в рамках указанного биотопа.

В то же время, несмотря на отмеченную выше динамику, количество образцов, содержащих клинически значимые при МВ микроорганизмы, остается высоким.

При этом, обратившись к видовой структуре указанных бактерий в разные годы наблюдений, можно обратить внимание на то, что в отдельные временные периоды в видовой структуре превалировали различные возбудители, но всегда отмечалось

наличие значительного количества проб, содержащих *S. aureus*. Так, в 2018 г. в пробах, содержащих представителей порядка *Flavobacteriales*, чаще изолировали штаммы *S. aureus* (в 13 случаях), реже – *P. aeruginosa* (в 9).

В 2019 г. самыми распространенными клинически значимыми видами в пробах, содержащих штаммы представителей порядка *Flavobacteriales*, были *P. aeruginosa*, в то время как в 2020 г. лидирующее место в структуре занимали штаммы *S. maltophilia*.

В 2021 г. общее количество проб, в которых наблюдали рост представителей порядка *Flavobacteriales* совместно со штаммами *S. maltophilia*, по-прежнему, оставалось высоким, но этот вид уже не являлся доминирующим, и в наибольшем количестве проб – 18 образцах – обнаружен рост *S. aureus*. В 2022 г. эта тенденция также сохранялась, при этом количество проб, в которых, кроме представителей порядка *Flavobacteriales*, были выделены клинически значимые грамотрицательные бактерии, в целом снизилось.

Установлено, что у 181 больного (71,8%) имели место однократные эпизоды выделения штаммов за период 2018-2022 гг. Однако у 71 пациента (28,2%) регистрировали повторные высевы представителей порядка *Flavobacteriales* из респираторных образцов. Большинство больных имели двукратные эпизоды выделения штаммов в течение года либо в разные годы. В отношении 13 пациентов, имевших по три и четыре посева в разные годы, следует говорить о наличии у них интермиттирующих высевок, что, безусловно, требует динамического микробиологического наблюдения. Отдельно хотелось бы отметить 10 больных, имевших регулярные повторные высевы рассматриваемой группы бактерий. Во всех этих случаях с кратностью выделения в посевах от 5 до 10 эпизодов за описываемый период наблюдения присутствовали штаммы *Chryseobacterium* spp. Как правило, штаммы выявлялись у пациента в каждом исследуемом посеве. Во всех указанных случаях в респираторных образцах присутствовали штаммы *C. gleum*, *C. indologenes*, *C. arthrosperae*.

У четырех больных отмечены случаи троекратного выделения штаммов *Elizabethkingia* spp. в течение одного года при отсутствии повторных высевок в последующие временные периоды наблюдения.

У пяти пациентов зафиксированы случаи повторного выделения штаммов *Empedobacter* spp. как в течение одного года, так и в разные годы наблюдений с краснотью от двух до четырех высевок за рассматриваемый период.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, невзирая на то, что в подавляющем большинстве случаев при исследовании микробиоты респираторных образцов пациентов с МВ имели место однократные эпизоды выделения штаммов представителей порядка *Flavobacteriales*, у 28,2% обследованных лиц отмечены случаи повторных высевок.

За период 2018-2022 гг. представители порядка *Flavobacteriales* выявлялись из респираторных образцов, полученных от больных МВ в Российской Федерации, с частотой 1,6% от всех выделенных штаммов и 6,8% от штаммов НФГОБ соответственно. Несмотря на умеренное распространение, видовой спектр выделенных бактерий характеризовался значительной широтой. Эти штаммы были выделены из респираторных образцов как в ассоциациях с бактериями, имеющими доказанное клиническое значение при МВ, так и в отсутствии других более значимых видов в пробе.

В отношении ряда пациентов отмечены не только эпизоды повторных высевок представителей порядка *Flavobacteriales*, но и установлена длительная колонизация респираторного тракта. Необходимо проведение микробиологического мониторинга указанных штаммов в динамике, изучение антибиотикорезистентности и иных биологических свойств для формирования более полного представления об их потенциальном патогенетическом потенциале в развитии респираторных осложнений у больных МВ в Российской Федерации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе не было никаких экспериментальных исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

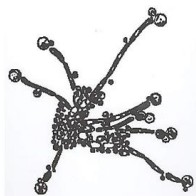
ЛИТЕРАТУРА

1. Kwayess R., Al Hariri H.E., Hindy J.R., et al. *Burkholderia cepacia* infections at sites other than the respiratory tract: a large case series from a tertiary referral hospital in Lebanon. J. Epidemiol. Glob. Health. 2022; 12 (3): 274-280. doi.org/10.1007/s44197-022-00048-2
2. Banjar H., Ghawi A., AlMogarri I., et al. First report on the prevalence of bacteria in cystic fibrosis patients (CF) in a tertiary care center in Saudi Arabia. Int. J. Pediatr. Adolesc. Med. 2022; 9 (2): 108-112. doi.org/10.1016/j.ijpam.2021.07.001

3. Jia Y., Liu Y., Liu Y., et al. Clinical characteristics, drug resistance and death risk factors of *Burkholderia cepacia* infection in hematopoietic stem cell transplant patients. BMC Infect Dis. 2022; 6 (22): 777. doi.org/10.1186/s12879-022-07754-z
4. Mwanza E.P., Hugo A., Charimba G., Hugo C.J. Pathogenic potential and control of *Chryseobacterium* species from clinical, fish, food and environmental sources. Microorganisms. 2022; 10 (5): 895. doi.org/10.3390/microorganisms10050895
5. Lin J.N., Lai C.H., Yang C.H., Huang Y.H. *Elizabethkingia* infections in humans: from genomics to clinics. Microorganisms. 2019; 28 (9): 295. doi.org/10.3390/microorganisms7090295
6. Mirza H.C., Tuncer Ö., Ölmez S., et. al. Clinical strains of *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia* spp. isolated from pediatric patients in a university hospital: performance of MALDI-TOF MS-based identification, antimicrobial susceptibilities, and baseline patient characteristics. Microb. Drug. Resist. 2018; 24 (6): 816-821. doi.org/10.1089/mdr.2017.0206
7. Lambiase A., Del Pezzo M., Raia V., et al. *Chryseobacterium* respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis. J. Infect. 2007; 55 (6): 518-523. doi.org/10.1016/j.jinf.2007.08.002
8. de Carvalho Filho É.B., Marson F.A.L., Levy C.E. Challenges in the identification of *Chryseobacterium indologenes* and *Elizabethkingia meningoseptica* in cases of nosocomial infections and patients with cystic fibrosis. New Microbes New Infect. 2017; 13 (20): 27-33. doi.org/10.1016/j.nmni.2017.09.002
9. Lo H.H., Chang S.M. Identification, characterization, and biofilm formation of clinical *Chryseobacterium gleum* isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014; 79 (3): 298-302. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.027

Поступила в редакцию журнала 20.03.2023

Принята к печати 31.03.2023





**Профессор
Климко Николай Николаевич
22 марта 1956 г. – 30 марта 2023 г.**

В наш дом пришла беда...

С глубочайшим прискорбием сообщаем, что 30.03.2023 года на 68 году жизни скоропостижно скончался доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии – высококлассный профессионал, прекрасный врач и педагог Николай Николаевич Климко.

Н.Н. Климко окончил Военно-медицинскую академию в Санкт-Петербурге и, оставшись верен своей alma mater, прошел в ней все ступени клинического становления от адъюнкта до заместителя начальника кафедры гематологии и клинической иммунологии. В 1997 г. он защитил докторскую диссертацию на тему «Роль цитокиновой и эндокринной систем в регуляции метаболических проявлений бактериальных осложнений острых лейкозов».

В 1998 г. Николай Николаевич стал частью коллектива нашего Университета (в то время – СПбМАПО), возглавив кафедру клинической микологии, аллергологии и иммунологии. В стенах Университета приоритетной сферой научно-практических интересов профессора Н.Н. Климко на многие годы стала клиническая микология.

Профессор Н.Н. Климко был членом Европейской конфедерации медицинских микологов (ЕСММ), «The International Society for Infectious

Diseases», «European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing» (EUCAST), «European Hematology Association» (ЕНА), «European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases» (ESCMID), Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ). Он активно сотрудничал с Международным фондом по борьбе с грибковыми инфекциями и был признанным экспертом в нашей стране и за рубежом.

Будучи широко образованным и эрудированным, профессор Н.Н. Климко являлся выдающимся клиницистом, чрезвычайно работоспособным и энергичным. Всегда корректный, элегантный, требовательный к сотрудникам и помощникам, он был внимателен к больным и коллегам по работе. Его отличали острый ум и принципиальность.

Благодаря своему профессионализму, энциклопедическим знаниям, целеустремленности и принципиальности Николай Николаевич пользовался у коллег заслуженным авторитетом и уважением.

Блестящий лектор, учёный, педагог – он стал наставником для целого поколения учеников, создав научную школу клинической микологии международного уровня. Как врача, консультирующего и спасающего пациентов с тяжелыми инвазивными микозами, его знали и с надеждой ждали во всех стационарах Санкт-Петербурга и России. Каждый клинический разбор под его руководством – это эксклюзивный мастер-класс.

Ежедневное общение с ним приносило не только позитив, радость и заряд энергии, но и помогало каждому обогатить себя его бесценным опытом клинического миколога, которым он щедро делился с коллегами.

Мы потеряли истинного друга, единомышленника и соратника. Нам трудно представить, как мы будем дальше работать и жить без него...

Редколлегия журнала «Проблемы медицинской микологии», коллектив НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, сотрудники кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии, кафедры медицинской микробиологии и кафедры дерматовенерологии скорбят об утрате выдающегося ученого, педагога и прекрасного человека и выражают искренние соболезнования родным и близким.

Светлая память о Николае Николаевиче навсегда останется в наших сердцах, а его имя в истории медицинской микологии!

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)

**Научно-исследовательский институт медицинской
микологии им. П.Н.Кашкина (НИИ ММ) СЗГМУ им. И.И. Мечникова**

Адрес редакции: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28. Тел.: (812) 303-51-45, факс (812) 510-62-77

E-mail: mycobiota@szgmu.ru, elena.gukova@szgmu.ru. Заведующая редакцией: Е.С.Гукова.

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov

Kashkin Research Institute of Medical Mycology

Address of Editorial Office: Santiago-de-Cuba str., 1/28, Saint Petersburg, 194291, RUSSIA.

Tel.: (812) 303-51-45, Fax (812) 510-62-77

E-mail: mycobiota@szgmu.ru, elena.gukova@szgmu.ru. Manager of Editorial Office: E.S.Gukova

«ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»

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

Журнал зарегистрирован ВАК,

с 2005 г. включен в Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), в реферативный журнал и базы ВИНТИ.

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

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

Подписано в печать 12.04.2023 г.

