

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЙ И МИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КРИПТОКОККОЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ И НА АУТОПСИЙНОМ МАТЕРИАЛЕ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Константинова А.М.* (аспирант)

Кафедра патологии медицинского факультета СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

© Константинова А.М., 2010

Криптококкоз на сегодняшний день – важная маркерная инфекция, обуславливающая летальность у ВИЧ-инфицированных пациентов. На аутопсийном материале 23 умерших лиц (в период с 1990 по январь 2010 г.) мы изучали морфологию криптококковых поражений различных органов при ВИЧ-инфекции в стадии СПИДа. В легочной ткани в одном очаге обнаружили сочетание криптококков и микобактерий туберкулеза. Выявили фенотипические различия криптококков на тканевых срезах при различных видах проводимой терапии.

Ключевые слова: ВИЧ, криптококкоз, морфология криптококкоза

PATHOMORPHOLOGICAL AND MYCOLOGICAL ANALYSIS OF CRYPTOCOCCOSIS IN THE EXPERIMENT AND IN MATERIAL AFTER AUTOPSY OF DEAD PATIENTS WITH AIDS

Konstantinova A.M. (postgraduate student)

Chair of pathology of Medical Department, Saint Petersburg State University, Russia

© Konstantinova A.M., 2010

Nowadays cryptococcosis is an important marker infection which causes mortality in HIV-infected patients. On the autopsy material of 23 dead patients (in the period from 1990 to January 2010) we studied the morphology of cryptococcal lesions of various organs in HIV-infection at the stage of AIDS. In the lung tissue in a single focus we have found the combination of cryptococcus and Mycobacterium tuberculosis. Phenotypic differences of cryptococcus in tissue sections at different types of therapy have been revealed.

Key words: cryptococcus, HIV, morphology of cryptococcosis

* Контактное лицо: Константинова Анастасия Михайловна
Тел.: (812) 778-10-83

По данным Центра по контролю за заболеваниями (CDC, США), в мире ежегодно регистрируют 1 млн. случаев криптококкоза у ВИЧ-инфицированных больных, из них 680 000 погибают [1]. Сведения о частоте криптококкоза в Российской Федерации отсутствуют. В последние годы отмечают рост числа зарегистрированных случаев криптококкоза в Санкт-Петербурге. Криптококкоз – это известный уже более столетия глубокий жизнеугрожающий микоз [2, 3, 4], приводящий к тяжелому менингоэнцефалиту и диссеминированным поражениям [5, 6]. Возбудителями являются базидиомицетовые капсулированные дрожжи рода *Cryptococcus* двух видов: *neoformans* и *gattii* [7]. *C. neoformans* включает три серотипа: *C. neoformans* var. *grubii* (серотип А), *C. neoformans* var. *neoformans* (серотип D) и гибрид (серотип AD), которые обнаруживают повсеместно. *C. gattii* включает серотипы В, В/С и гибриды (BD, АВ) и вызывает заболевание преимущественно в регионах с тропическим и субтропическим климатом [3, 8]. До сих пор не вполне ясным остается источник инфекции в регионах с умеренным климатом. Так, при исследовании природных субстратов на наличие криптококка в Санкт-Петербурге, частота его выявляемости составила лишь 3,2%, причем возбудитель был обнаружен исключительно в помете голубей [9]. Заражение происходит преимущественно аэрогенным путем, из легких *C. neoformans* попадает в кровеносное русло, откуда происходит его гематогенная диссеминация. Наиболее часто выявляют поражение центральной нервной системы, однако механизмы преодоления гематоэнцефалического барьера до конца неизвестны [10, 11]. Несмотря на проводимую антифунгальную терапию и доступность высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ), 3-месячная летальность от ВИЧ-ассоциированного криптококкового менингита достигает 20% [12].

Цель настоящего исследования – изучение морфологических особенностей криптококков и вызываемой ими инфекции на аутопсийном материале у ВИЧ-инфицированных пациентов при различных видах проводимой терапии в Санкт-Петербурге.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было выполнено экспериментальное заражение самцов белых беспородных мышей массой 15–20 г путем внутривенного введения 0,5 мл взвеси *C. neoformans* штаммов Российской коллекции патогенных грибов (РКПГ) №№1175 (LD 50 - $8 \cdot 10^2$ КОЕ/мл), №1178 (LD 50 - $1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл), 1262 (LD 50 - $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл) [13]. Культуры криптококков выращивали на агаре Сабуро при 37 °С в течение 48 часов, затем готовили взвеси $1 \cdot 10^5$ клеток в мл 0,9% стерильного раствора NaCl. В качестве контрольной группы использовали мышей, которым внутривенно вводили физиологический раствор в количестве 0,5 мл.

Ежедневно регистрировали число погибших и вы-

живших животных. Вскрытие (по 3 мыши из каждой группы зараженных животных и 1 – из контрольной группы) с последующим забором внутренних органов производили на 3, 6 и 7 сутки после заражения. В случае летального исхода, материал у мышей был взят в день смерти.

Органы для гистологического исследования фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин. В лаборатории патоморфологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования (ГОУ ДПО СПб МАПО) гистологические срезы тканей окрашивали гематоксилином и эозином, а также методом PAS-реакции. Оценивали отношение площади литических полостей к площади среза, форму криптококков.

Также был проведен анализ 23 аутопсийных наблюдений от пациентов, умерших в городской инфекционной больнице (ГИБ) №30 имени С.П. Боткина в Санкт-Петербурге и Усть-Ижорской Республиканской клинической инфекционной больнице в период с 1990 по январь 2010 гг. Основным заболеванием во всех случаях была ВИЧ-инфекция в стадии СПИДа, а криптококкоз имел ведущее значение в наступлении летального исхода. Так, у 18 умерших лиц (78,3%) криптококкоз сыграл ведущую роль в татогенезе; у двух (8,7%) – в сочетании с лимфомой головного мозга, у двух других (8,7%) – в сочетании с тотальной двусторонней пневмонией (в одном случае – цитомегаловирусной и пневмоцистной; в другом – пневмоцистной); еще в одном случае (4,3%) – с туберкулезом.

Среди умерших пациентов было 15 мужчин (65,2%) и 8 женщин (34,8%), средний возраст составил 36,4 года (от 20 до 51).

Первичное патоморфологическое исследование аутопсий было выполнено прозекторами ГИБ №30 им. С.П. Боткина (зав. отделением Д.В. Комарова). Было проведено дополнительное (помимо гематоксилина и эозина) окрашивание пораженных органов альциановым синим (по методу Моури), методом PAS-реакции и по методу Романовского. Были тщательно проанализированы истории болезни каждого умершего больного, а также аутопсийные и гистологические данные.

Наряду с этим, оценивали наличие, количество и локализацию криптококков, их морфологические особенности, характер и выраженность воспалительной инфильтрации.

Для более углубленного изучения влияния на морфологию клеток криптококков проводимого лечения, мы провели морфометрический анализ толщины капсулы и диаметра клеток возбудителей у четырех групп умерших пациентов: 12 лиц, не получавших ни противогрибковой, ни противовирусной терапии; 7 человек, получавших только антимикотики (дифлюкан, амфотерицин В, фунгистаб – в 1 случае); трое, получавших как высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ), так и противо-

грибковые препараты, и одна пациентка, у которой, по общепринятым критериям [14, 15], мы предполагали развитие воспалительного синдрома иммунной реконституции (ВСИР, IRIS – immune reconstitution inflammatory syndrome). При сравнении результатов 30-50 измерений толщины капсулы и диаметра клеток криптококков статистически значимых отличий в данных показателях (во всех исследованных органах) среди умерших больных внутри каждой группы не выявили. Это помогло выбрать для дальнейшего морфометрического исследования по 1-2 умерших пациентов из каждой группы, количество возбудителей в органах которых было максимальным.

В I группу включили два наблюдения, в которых умершие больные при проведении лечения не получали ни антимикотических, ни противовирусных препаратов. Ко II группе были отнесены два случая умерших пациентов, получавших противогрибковое лечение. Так, Р. получала флуконазол (450 мг), затем амфотерицин В (50 мг), затем кетоконазол (400 мг). Н. получал дифлюкан (200 мг, затем 800 мг). К III группе отнесли одно наблюдение: Б. получал как противогрибковые препараты (дифлюкан – 200 мг, затем амфотерицин В – 50 мг, затем флуконазол – 700 мг), так и ВААРТ (зерит, эпивир, калетра, медовир). В IV группу вошла умершая женщина, у которой мы предполагали развитие ВСИР на фоне проведения ВААРТ; пациентка получала противогрибковую терапию: флуконазол (400–450 мг), затем амфотерицин В (50 мг).

В каждой из групп было выполнено морфометрическое исследование клеток криптококка (диаметр клеток, толщину капсулы) с помощью светового микроскопа ЛОМО Биолам Р 11 с использованием программного обеспечения ВидеоТест Мастер Морфология VT4. Число измерений указано в таблице 1.

Таблица 1.

Количество проведенных измерений
в различных группах

Орган/Номер группы	I	II	III	IV	Итого
Мозговые оболочки	601	557	323	375	1856
Легкие	400	333	0	366	1099

Статистический анализ, с учетом особенностей полученных данных, проводили с помощью непараметрических методов исследования, используя программу Statistica for Windows (версия 5.5). Рассчитывали частотные характеристики, а также комплекс описательных статистик (среднее, ошибка среднего, медиана, квартили, среднееквадратическое отклонение). Применяли критерии: Манна-Уитни, медианный Хи-квадрат, Крус-Калуолис, модуль ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На 3 сутки эксперимента у мышей, зараженных наиболее вирулентным штаммом (РКПГ№1175), выявили поражение всех исследуемых органов (головной мозг, легкие, селезенка, печень и почки), а у мышей, зараженных менее вирулентными штаммами

(РКПГ №№1178 и 1262), отмечали только поражение головного мозга. Отношение зоны литических полостей к площади среза, выраженное в процентах, было несколько больше у мышей, зараженных штаммом РКПГ № 1175.

Все мыши, зараженные штаммом РКПГ №1175, погибли на 6 сутки после заражения; криптококки были обнаружены во всех исследуемых органах. У всех мышей, зараженных штаммами РКПГ №№1178 и 1262, на 7 сутки эксперимента наблюдали поражение головного мозга и легких. У двух мышей, зараженный штаммом РКПГ №1178, отмечали поражение почек. У двух мышей, зараженных штаммом РКПГ №1262, была поражена печень и только у одной – почки. Литические полости во всех случаях занимали большую площадь, чем при исследовании на 3 сутки после заражения ($p < 0,05$), и были максимальными у мышей, зараженных штаммом РКПГ №1175; несколько меньше в случае заражения штаммом РКПГ №1262 и минимальные у мышей, зараженных штаммом РКПГ №1178 ($p < 0,05$). В зоне наибольших литических полостей, примерно в равном соотношении, криптококки были округлые, капсулированные и деформированные, лишённые капсул (лимонообразные, сплюснутые и др.). В зоне наименьших литических полостей почти все микромицеты были деформированы.

Анализом аутопсийных наблюдений показано, что среди путей заражения ВИЧ-инфекцией с одинаковой частотой были указания на внутривенное введение наркотиков и гетеросексуальные контакты (по 6 умерших лиц – по 26,1%), несколько реже – гомосексуальные контакты – 4 умерших пациента (17,4%), в одном случае – при гемотрансфузии (4,35%), в 26,1% случаев (6 умерших больных) данных об источнике инфицирования не было.

При жизни криптококкоз был диагностирован у 10 умерших лиц, в 13 случаях заболевание не было выявлено (56,5%). В последние годы значительно повысился уровень прижизненного обнаружения данной инфекции. Так, если в период с 1990 по 2003 гг. криптококкоз прижизненно был диагностирован лишь в 3 из 12 случаев (25%), то в период с 2004 по январь 2010 гг. – в 7 из 11 (63,6%).

Из 10 диагностированных случаев у 3 умерших пациентов криптококкоз был установлен более чем за 40 дней до наступления летального исхода (в среднем, 63 дня – от 41 до 86 дней), у одного – за день, у остальных 6 человек, в среднем, чуть раньше, чем за неделю – 8,3 дня (4-15 дней). Во всех случаях основанием для диагностики послужили микроскопические исследования ликвора с применением рутинных окрасок, проведенные в патологоанатомическом отделении больницы им. С.П. Боткина. В половине случаев (у 5 умерших лиц) было проведено дополнительное исследование тушевых препаратов ликвора и в 6 случаях – культуральное исследование в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ГОУ ДПО СПб МАПО. При посеве во всех случаях

был выявлен *C. neoformans*. В одном случае в ликворе был обнаружен антиген криптококка.

С момента выявления ВИЧ-инфекции до смерти пациентов в 10 случаях (43,5%) проходило несколько лет (в среднем, 7,2 года – от 5 до 11 лет); у 4 умерших лиц (17,4%) ВИЧ-инфекция была выявлена только при последней госпитализации; у 9 (39,1%) – в течение 1-2 лет до смерти. У тех больных, которые указывали на возможные сроки инфицирования, от этого момента до смерти прошло от 5 до 12 лет.

12 умерших человек не получали ни противогрибковой, ни противовирусной терапии; 7 – получали антимикотики (дифлюкан, амфотерицин В, фунгистаб в 1 случае); трое – ВААРТ и противогрибковые препараты; один – ВААРТ без назначения антимикотиков.

Среди оппортунистических инфекций наиболее часто диагностировали кандидоз – 20 случаев (86,9%), несколько реже – цитомегаловирусную инфекцию – 13 случаев (56,5%) и поражения, вызванные вирусом простого герпеса, – 11 случаев (47,8%); туберкулез наблюдали в 4 случаях (17,4%). Также с равной частотой (13% – 3 умерших пациента) были выявлены пневмоцистоз, поражения, вызванные вирусом Эпштейна-Барр, и лимфома головного мозга, реже обнаруживали токсоплазмоз. Помимо этого, 9 умерших больных переносили хронический вирусный гепатит С; 7 – хронический вирусный гепатит В; у троих вирусный гепатит не был верифицирован.

На момент диагностики криптококкоза средний уровень CD4+ лимфоцитов составил 48,43 клетки в мкл (от 4 до 138), причем у 62,5% умерших человек их уровень был меньше 50, у 12,5% – 50, а у 25% – от 100 до 150.

У 19 умерших пациентов (82,6%) криптококковая инфекция имела генерализованный характер; среднее число пораженных органов – 4,6. Этот показатель несколько ниже, чем в США [16], где среднее число пораженных органов 4,9 и выше, чем в Европе (Италия) – 3,8 [2]. Наиболее часто в процесс вовлекалась центральная нервная система – у 20 человек (86,9%), несколько реже – лимфатические узлы – у 16 (69,6%), легкие – у 13, селезенка и печень – у 12. Частота поражения различных органов показана на рисунке 1.

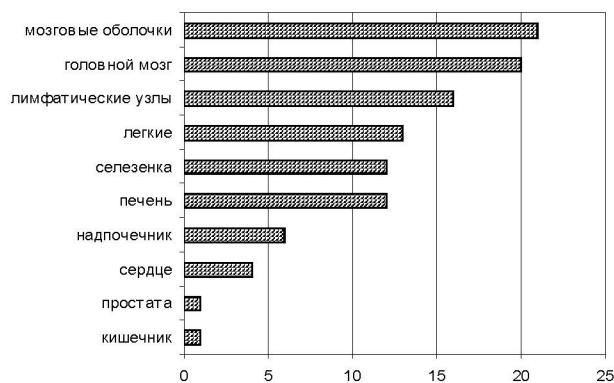


Рис. 1. Частота органных поражений при криптококкозе

Среди больных, получавших ВААРТ, лишь у пациентки с ВСИР отмечали генерализацию криптококкоза; у других умерших лиц процесс ограничивался лишь поражением центральной нервной системы.

Макроскопическая картина при криптококковой инфекции чаще всего малоспецифична, иногда схожа с поражениями, вызванными микобактериями туберкулеза [5]; редко в литературе описывали «желатинозные узелки» [17]. Вовлеченные в процесс мягкие мозговые оболочки отечные, утолщенные, тусклые, мутные. Очаговые изменения в головном мозге, которые мы могли связать с криптококкозом, отмечали в единичных случаях; они выглядели как очаги кашицеобразной консистенции желтоватого оттенка с утратой структуры ткани, размеры их достигали 1,5 см. Лимфатические узлы были на разрезе неоднородны, в единичных случаях – с фокусом бледно-желтого цвета, которые иногда было трудно отличать от таковых при туберкулезе. В легких, селезенке, печени и почках изредка обнаруживали фокальные изменения, которые были охарактеризованы как стекловидные, водянистые, «пустулезные». Никаких характерных макроскопических изменений в надпочечниках, миокарде и других органах не наблюдали.

Проведенный при гистологическом исследовании полуколичественный анализ количества криптококков в мозговых оболочках выявил обильные скопления возбудителей более чем в половине случаев; значительно реже они были в умеренном или минимальном количестве. Массивные скопления возбудителей несколько чаще обнаруживали у умерших пациентов, не получавших при жизни ни противогрибковой, ни антивирусной терапии, они сопровождалась минимальной воспалительной реакцией, представленной преимущественно лимфоцитами, реже – плазмócитами, гистиоцитами, часто с примесью нейтрофильных лейкоцитов. Со значительно меньшей частотой отмечали гранулематозный тип воспаления (Рис. 2а); возбудители были в умеренном или небольшом количестве.

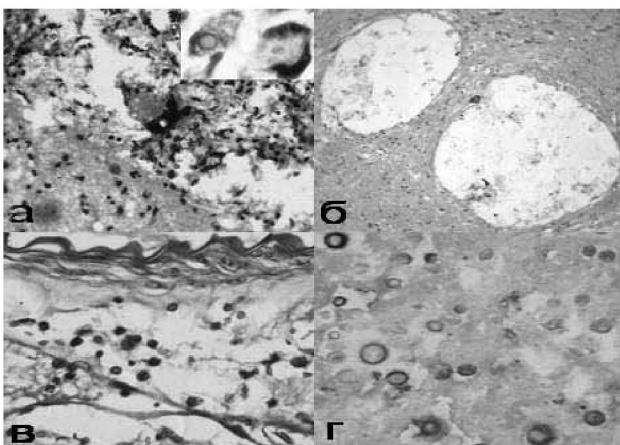


Рис 2. а – гранулема в мозговой оболочке с гигантскими клетками типа Ланганса (вверху справа то же, показаны фагоцитированные возбудители x1000). Окраска альциановым синим, x400; б – «микрокисты» в веществе головного

мозга (указаны стрелками). Окраска гематоксилином и эозином, x200; в – скопления криптококков в периваскулярном пространстве вещества головного мозга. Окраска методом PAS-реакции, x1000; г – криптококки в зоне казеозного некроза в ткани легкого. Окраска альциановым синим, x1000

Многоядерные гигантские клетки типа Ланганса или «инородных тел» с фагоцитированными возбудителями наблюдали в 5 случаях (23,8%): у 4 умерших больных, не получавших этиотропной терапии, и у одного, получавшего только антимикотики. В нашем исследовании у пациентов, получавших ВААРТ, отмечали умеренное количество возбудителей при умеренной клеточной реакции. У умершей женщины с ВСИР в мозговых оболочках обнаружили большое количество возбудителей со слабой воспалительной инфильтрацией, представленной преимущественно лимфоцитами, гистиоцитами, с примесью нейтрофильных лейкоцитов. Наблюдали наличие криптококков в зоне мелкоглыбчатого клеточного распада, вызванного вирусом герпеса I типа (подтверждено иммунофлуоресцентным методом).

В веществе головного мозга обращали на себя внимание очаговый энцефалит с микроглиальными узелками, демиелинизация белого вещества; эти изменения мы связываем с ВИЧ-инфекцией. Помимо этого, в зоне поражения мозговых оболочек часто отмечали контактный некротический криптококковый энцефалит. В более глубоких отделах вещества головного мозга, почти во всех случаях, криптококки располагались преимущественно периваскулярно с образованием своеобразных «криптококковых муфт» (Рис. 2в), микромицеты в этих зонах в большинстве случаев были деформированы, принимали различную форму: лимонообразную, сплюснутую, угловатую и др., реже – округлую. В четырех случаях (20%) выявили небольшие «микрокисты» – литические полости в веществе головного мозга; в них деформированные и округлые формы криптококков встречались с одинаковой частотой. У 3 умерших пациентов (15% случаев) наблюдали выраженный лизис вещества головного мозга (Рис. 2б), при котором у 2 человек в «микрокистах» большинство криптококков были капсулированные, округлой формы, а в одном случае в равном соотношении отмечали капсулированные и бескапсульные деформированные микромицеты. Воспалительный инфильтрат был выражен слабо и представлен лимфоцитами, гистиоцитами, в единичных наблюдениях отмечали гигантские клетки.

В лимфатических узлах обнаружили различной степени выраженности лимфоидное опустошение, размытость контуров лимфатических фолликулов, расширение синусов с накоплением в них крупных одноядерных клеток; эти изменения, наиболее вероятно, связаны с основным заболеванием – СПИДом. При сочетанном поражении лимфатических узлов ВИЧ и криптококками, помимо описанных изменений, выявили ареактивные или с минимально выраженной воспалительной реакцией участки

просветления различного размера со скоплениями в них различного количества грибов (Рис. 3а, б). Сходные изменения мы наблюдали и в ткани селезенки и печени.

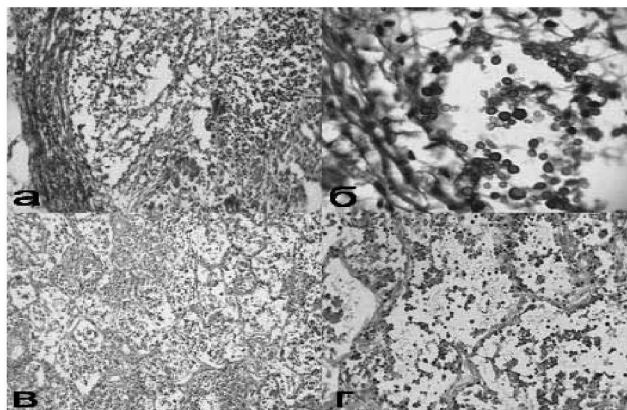


Рис 3. а – массивное ареактивное скопление криптококков в лимфатическом узле. Окраска реактивом Шиффа, $\times 100$; б – то же, $\times 1000$; в – большое количество возбудителей в просветах альвеол и отсутствие воспалительной реакции. Окраска альциановым синим, $\times 100$; г – то же, $\times 400$

В легких поражения носили чаще очаговый характер, и лишь в единичных случаях у умерших пациентов, не получавших антимикотиков, отмечали распространенное поражение (Рис. 3в, г). Криптококки локализовались в просветах альвеол, а также в сосудах и вне их – в межальвеолярных перегородках. Наиболее часто изменения сопровождались минимальной клеточной реакцией, в единичных случаях – с образованием гранул. Иногда также обнаруживали примесь сегментоядерных нейтрофилов и гигантские многоядерные клетки типа инородных тел и Ланганса. У умершей больной с ВСИР криптококки выявили в зоне казеозного некроза (Рис. 2г).

Поражение почек можно охарактеризовать как очаговый криптококковый гломерулонефрит с минимальной воспалительной реакцией. Также в некоторых случаях криптококки локализовались в просвете канальцев.

Результаты проведенного морфометрического исследования отражены в таблице 2.

Таблица 2.

Диаметр клеток гриба и толщина капсулы в различных группах и органах

Группа	Диаметр клетки в мозговых оболочках (мкм)	Диаметр клетки в ткани легкого (мкм)	Толщина капсулы в мозговых оболочках (мкм)	Толщина капсулы в ткани легкого (мкм)
I	$3,55 \pm 0,04$	$4,56 \pm 0,06$	$0,88 \pm 0,02$	$0,097 \pm 0,01$
II	$5,05 \pm 0,05$	$3,41 \pm 0,04$	$1,01 \pm 0,02$	$0,062 \pm 0,01$
III	$4,69 \pm 0,11$	-	$1,72 \pm 0,04$	-
IV	$3,76 \pm 0,05$	$3,93 \pm 0,06$	$1,11 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,04$

В I группе диаметр клетки гриба в мозговых оболочках оказался меньше, чем в легких ($p < 0,001$). Однако, на фоне проводимой антимикотической терапии, во II группе умерших пациентов диаметр клетки криптококка возрос в мозговых оболочках ($p < 0,001$) и уменьшился в ткани легкого ($p < 0,001$). В III группе диаметр клетки гриба в мозговых оболоч-

ках был несколько меньше, чем во II группе ($p < 0,01$), однако значительно превышал таковой в I ($p < 0,001$) (Рис. 4); поражения легочной ткани в данной группе не было.

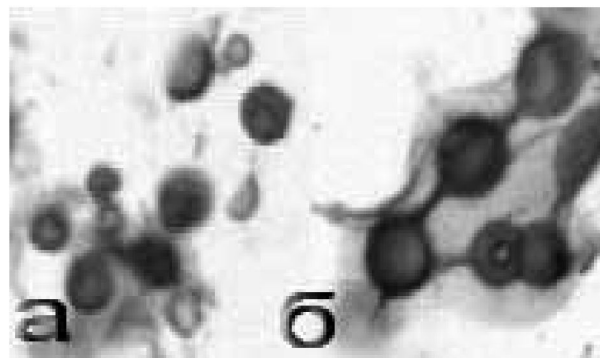


Рис 4. а – криптококки в мозговой оболочке пациента из I группы. Окраска альциановым синим, $\times 1000$; б – криптококки больших размеров и выраженной капсулой в мозговых оболочках пациента из III группы. Окраска альциановым синим, $\times 1000$

При ВСИР, в IV группе, диаметр клетки криптококка в мозговых оболочках был несколько выше, чем в I группе ($p < 0,05$), и значительно ниже, чем во II и III группах ($p < 0,001$); в ткани легкого диаметр клетки микроциста занимал промежуточное положение между I и II группами ($p < 0,001$).

Толщина капсулы криптококков у умерших больных I группы в мозговых оболочках была меньше, чем в легких ($p < 0,001$). Во II группе капсулы криптококков в ткани легких были тоньше, чем в I ($p < 0,001$), а в мозговых оболочках толщина капсулы возросла ($p < 0,001$). В III группе толщина капсулы микроцист в мозговых оболочках была самой значительной ($p < 0,001$). Толщина капсулы криптококков в IV группе была несколько меньше, чем в III, оставаясь больше, чем в I и II ($p < 0,001$) (Рис. 4). В легких же толщина капсулы в IV группе значимо не отличалась от таковой в I группе.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при экспериментальном заражении мышей синовирulentным штаммом криптококков, уже на 3 сутки после заражения криптококкоз носил генерализованный характер, а на 6 сутки все мыши погибли; отмечали наибольшую зону лизиса с наименьшим числом деформированных микроцист. Как это было показано в работе Васильевой Н.В. [13], в случаях заражения менее вирулентными штаммами криптококков, на 3 сутки эксперимента криптококки обнаруживали лишь в центральной нервной системе; в течение инфекции увеличивалось число пораженных органов. Наибольшее число деформированных форм грибов и наименьшую зону лизиса выявили в головном мозге мышей, инфицированных наименее вирулентным штаммом. Результаты эксперимента аналогичны данным, полученным при ранее проводимых исследованиях [13].

Анализом аутопсийных наблюдений показано, что гистологические изменения в различных орга-

нах носили преимущественно альтернативный характер с минимально или слабо выраженным экссудативным или пролиферативным компонентом и большим количеством возбудителей. В то же время у пациентов, не получавших антиретровирусной терапии, было обнаружено гранулематозное воспаление с образованием гигантских многоядерных клеток. По данным литературы, такая гистологическая картина криптококкоза не характерна для ВИЧ-инфицированных, и обычно ее появление связывают у таких пациентов с восстановлением клеточного иммунитета на фоне ВААРТ [3, 18, 19]. При попытке объяснить данный феномен, никаких отличий от других умерших пациентов по длительности заболевания, уровню CD4-клеток и другим параметрами не выявили. Вероятно, такая морфология инфекции связана с низкой вирулентностью штаммов, т.к. показано, что менее вирулентные штаммы индуцируют гранулематозную реакцию [13]. Это подтверждается наличием во всех случаях преимущественно продуктивного воспаления лишь небольших периваскулярных литических полостей, и только в двух случаях обнаружили небольшие «микрокисты» в веществе головного мозга; криптококки приблизительно в равном соотношении были деформированными и округлыми, капсулированными. В то же время в нашем исследовании у пациента, получавшего антиретровирусную терапию наряду с антимикотической, отмечали умеренное количество возбудителей при умеренной клеточной реакции. Минимальное количество деформированных микромицетов, наличие умеренного лизиса вещества головного мозга, а также крайне низкий уровень и незначительное нарастание количества CD4-лимфоцитов при проведении антиретровирусной терапии, могут свидетельствовать о высокой вирулентности штамма – источника инфекции и неэффективности противовирусного лечения, что приводило к летальному исходу. Второй летальный исход у пациентки на фоне ВААРТ мы связывали с развитием ВСИР.

Установили различия в диаметре клеток и толщине капсул криптококков на тканевых срезах при различной терапии.

Проводимым ранее морфометрическим анализом показано, что размеры *C. neoformans* не зависят

от локализации возбудителя в различных органах, а также от разновидности иммунодефицитного состояния [13,20].

Толщина капсулы криптококков в легких у умерших пациентов, не получавших при жизни никакого лечения, оказалась достоверно больше, чем в головном мозге, что совпадает с описанными в научной литературе данными о толщине капсулы *C. neoformans* в различных органах у мышей [21]. Механизм этого явления до конца не ясен, однако уже более 60 лет известно, что на толщину капсулы влияют условия среды. Так, различную толщину капсулы криптококка в ткани головного мозга и легких связывают с различными уровнями концентрации железа в этих органах [22]. Воспалительный ответ в легких более выражен, чем в мозге, что может замедлять рост дрожжей в легких и объяснить большую толщину капсулы криптококков в ткани легкого [23]. Некоторые авторы связывают этот феномен с возможностью так называемого «переключения фенотипа», при котором спонтанно, с частотой выше, чем происходят соматические мутации, появляются колонии другой морфологии, что значительно оказывает влияние как на размер клетки гриба, так и на толщину капсулы [24, 25].

В опытах на культуре клеток антимикотики (амфотерицин В и флуконазол) уменьшили размер клетки и капсулы *C. neoformans* [26]. В экспериментах на зараженных криптококком мышках при терапии амфотерицином В отмечали значительное снижение толщины капсулы и диаметра клетки криптококка в легких [27], что наблюдали и мы в своих исследованиях. Данные, полученные нами при проведении морфометрического анализа в мозговых оболочках, возможно, связаны с более низкой концентрацией антимикотиков в центральной нервной системе. Что касается противовирусной терапии, то в научной литературе есть сведения лишь о том, что индинавир (входит в состав ВААРТ) подавляет капсулообразование *in vitro* [28]. По нашим данным, значительный рост толщины капсулы в III группе может быть связан либо с неэффективностью проводимого лечения, либо с тем, что капсула является не только фактором вирулентности, но и выполняет защитную функцию [29].

ЛИТЕРАТУРА

1. Bicanic T, Boehhout T, Del Poeta M., et al. Special report on 7th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis // Mycology newsletter. – 2008. – P. 10-24.
2. Antinori S., Galimberti L., C. Magni C., et al. Cryptococcus neoformans infection in a cohort of italian AIDS patients: natural history, early prognostic parameters, and autopsy findings // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2001. – Vol.20. – P. 711-717.
3. Bicanic T., Harrison T. Cryptococcal meningitis // British Medical Bulletin. – 2005. – Vol.72, №1. – P. 99-118.
4. Chretien F, Lortholary O., Kansau I., et al. Pathogenesis of cerebral Cryptococcus neoformans infection after fungemia // J. Infect. Dis. – 2002. – Vol.186. – P. 522-530.
5. Пархоменко Ю.Г., Зюзя Ю.Р., Тишкевич О.А. Патология легких при ВИЧ-ассоциированных инфекциях // Архив патологии. – 2008. – Т.70, №6. – С. 44-48.
6. Покровская А.В., Ладная Н.Н., Соколова Е.В. Система регистрации и анализа данных о СПИДе в России // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2008. – №3. – С. 13-16.
7. Kwon-Chung K.J., Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? // FEMS Yrast. Res. – Vol.6. – 2006. – P. 574-587.

8. Bovers M., Hagen F., Kuramae E.E., et al. AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* x *C. gattii* hybrid // Emerg. Infect. Dis. – Vol.14, №7. – 2008. – P. 1105-1108.
9. Босак И.А. Выделение и характеристика изолятов *Cryptococcus neoformans* из окружающей среды г. Санкт-Петербурга // Пробл. мед. микол. – 2009. – Т.11, №3 – С. 43-46.
10. Drevets D.A., Leenen P.J.M. Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into central nervous system // Microbes and Infection. – 2000. – Vol.2. – P. 1609-1618.
11. Chang Y.C., Stins M.E., McCaffery M.J., et al. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier // Infect. Immun. – 2004. – Vol.72, №9. – P. 4985-4995.
12. Perfect J.R., Dismukes W.E., Dromer E., et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America // Clin. Infect. Dis. – 2010. – Vol.50. – P. 291-322.
13. Васильева Н.В. Факторы патогенности *Cryptococcus neoformans* и их роль в патогенезе криптококкоза: Автореф. дисс...докт. биол. наук. – СПб., 2005. – 42 с.
14. Breton G., Dupont B. Syndromes de reconstitution immunologique au cours des mycoses systemiques chez les patients infectes par le VIH // J. de Mycologie Medicale. – 2005. – Vol.15. – P. 77-92.
15. Shelburne S.A., Montes M. and Hamill R.J. Immune reconstitution inflammatory syndrome: more answers, more questions// J. Antimicrob. Chem. – 2006. – Vol.57. – P. 167-170.
16. Markowitz G. S., Concepcion L.E., Stephen M., et al. Autopsy patterns of disease among subgroups of an inner-city Bronx AIDS population // J. of AIDS and Human Retrovirology. – 1996. – Vol.13, №1. – P. 48-54.
17. Benesova P., Buchta V., Cerman J., et al. Cryptococcosis – a review of 13 autopsy cases from a 54-year period in a large hospital // APMIS. – 2007. – Vol.115. – P. 177-183.
18. Хмельницкий О.К., Насыров Р.А., Васильева Н.В. и др. Патоморфология криптококкоза головного мозга при иммунодефицитных состояниях различного генеза // Архив патологии. – 2005. – №2. – С. 10-13.
19. Shibuya K., Hirata A., Omuta J., et al. Granuloma and cryptococcosis // J. Infect. Chem. – 2005. – Vol.11. – P. 115-122.
20. Хмельницкий О.К., Хмельницкая Н.М. Патоморфология микозов человека. – СПб.: СПбМАПО, 2005. – 432 с.
21. Rivera J., Feldmesser M., Cammer M., et al. Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection // Infect. Immun. – 1998. – Vol.66, №10. – P. 5027-5030.
22. McFadden D., Zaragoza O., Casadevall A. The capsule dynamics of *Cryptococcus neoformans* // Trends in Microbiology. – 2006. – Vol.14, №11. – P. 497-505.
23. Zaragoza O., Casadevall A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans* // Biological Procedures Online. – 2004. – Vol.6, №1. – P. 10-15.
24. Fries B.C., Taborda C.P., Serfass E., et al. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* occurs in vivo and influences the outcome of infection // J. Clin. Invest. – 2001. – Vol.108, №11. – P. 1639-1648.
25. Jain N., Li Li, McFadden D.C., et al. Phenotypic switching in a *Cryptococcus neoformans* variety gattii strain is associated with changes in virulence and promotes dissemination to the central nervous system // Infect. Immun. – 2006. – Vol.74, №2. – P. 896-903.
26. Nosanchuk J.D., Cleare W., Franzot S.P., et al. Amphotericin B and Fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations// Antimicrob. Chem. – 1999. – Vol.43, №2. – P. 233-239.
27. Zaragoza O., Mihu C., Casadevall A., et al. Effect of Amphotericin B on capsule and cell size in *Cryptococcus neoformans* during murine infection // Antimicrob. Chem. 2005. – Vol.49, №10. – P. 4358-4361.
28. Monari C., Pericolini E., Bistoni G., et al. Influence of Indinavir on virulence and growth of *Cryptococcus neoformans* // J. Infect. Dis. – 2005. – Vol.191. – P. 307-311.
29. Елинов Н.П. Химия микробных полисахаридов. – М.: Высшая школа, 1984. – 237 с.

Поступила в редакцию журнала 30.11.2010

Рецензент: Р.А. Аравийский

