

ЭЛЕКТРОННО - МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АСПЕРГИЛЛЕЗА ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА НА ПРИМЕРЕ АРХИВНОГО БИОПСИЙНОГО МАТЕРИАЛА

Степанова А.А. (зав. лаб.)*, Васильева Н.В. (директор НИИ, зав. кафедрой), Аравийский Р.А. (в.н.с.), Борзова Ю.В. (зав. микологической клиникой, ассистент кафедры), Чернопятова Р.М. (зав. отделением), Десятник Е.А. (аспирант), Клишко Н.Н. (зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина; кафедра медицинской микробиологии; кафедра клинической микологии, иммунологии и аллергологии

© Коллектив авторов, 2014

Показано, что использование парафиновых блоков архивного материала приемлемо для последующего электронно-микроскопического исследования ультраструктурных особенностей аспергиллеза легких человека и диагностических целей. По данным световой микроскопии полутонких эпоксидных срезов, грибные элементы были выявлены в просвете некоторых бронхов; в паренхиме легких пациента они формировали четыре четко выраженные морфологические зоны, при электронно-микроскопическом исследовании обнаружены в легких пациента два типа гиф, различающихся по морфологии (возникло подозрение на наличие в них двух видов грибов – *A. fumigatus* и *A. flavus*), высева которых были получены ранее из мокроты при обследовании пациента. Показано присутствие в паренхиме легкого довольно большого числа конидиогенных структур, контактирующих с широкими (4-6 мкм) гифами, окруженными хорошо развитым темным внеклеточным матриксом и снабженными септами, по форме и размерам типичными для *A. fumigatus*. Одновременно в бронхах и паренхиме легких были выявлены гифы, которые по диаметру (2-3 мкм), форме, строению и размерам септ, а также отсутствию внеклеточного матрикса соответствовали *A. flavus*. Обсуждается функциональная роль выявленного «симбиоза».

Ключевые слова: аспергиллез, легкие человека, световая и электронная микроскопия, ультраструктура

ELECTRON-MICROSCOPIC INVESTIGATION OF HUMAN LUNG ASPERGILLOSIS BY THE EXAMPLE OF ARCHIVES BIOPSY MATERIAL

Stepanova A.A. (head of the laboratory), Vasilyeva N.V. (director of institute, head of the chair), Aravijkiy R.A. (leading scientific collaborator), Borzova Y.V. (head of mycological clinic, assistant of the chair), Chernopiyatova R.M. (head of the department), Desiyatik E.A. (postgraduate student), Klimko N.N. (head of the chair)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia: Kashkin Research Institute of Medical Mycology; Chair of Medical Mycology; Chair of Clinical Mycology, Immunology and Allergology

© Collective of authors, 2014

*It was shown that the use of paraffin blocks of archival material is acceptable for the subsequent electron-microscopic research of ultrastructural features of human lung aspergillosis and the diagnostic purposes. According to light microscopy of semi-thin epoxy sections the fungal elements were revealed in a gleam of several bronchial tubes; in patient lungs parenchyma they formed four distinct morphological zones during electron-microscopic investigations of patient lungs we revealed existence of two types of the fungal hyphae differing on its morphology (that was suspicion of existence of two fungal species - *A. fumigatus* and *A. flavus*), sowing of which was obtained earlier from sputum during examination of the patient. It was shown the existence in lung parenchyma of numerous conidiogenous structure, connected the wide (4-6 μm) hyphae surrounded with well developed dark extracellular matrix and supplied with septes with form (on longitudinal hyphal section), structure and sizes typical for *A. fumigatus*. Simultaneously in bronchial tubes and lungs parenchyma were revealed the hyphae which corresponded of diameter (2-3 μm), shape, ultrastructure and the sept's sizes and also the absence of extracellular matrix correspond to *A. flavus*. Functional role of revealed "symbiosis" is discussed.*

Key words: aspergillosis, human lung, light and electron microscopy, ultrastructure

* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна,
Тел.: (812) 303-51-40

ВВЕДЕНИЕ

Ряд авторов [Лысенко А.И. //Архив патол., 1973. – №5; Гайдамакин Н.А. и др. //Архив патол., 1974. – №10; Клочков Н.Д. //Архив патол., 1979. – № 3; Fanning J.C., et al //J. Microsc., 1991. – Vol.162, Pt.3; Bonsib S.M., et al //Ultrastruct. Pathol., 1993. – Vol.17, №5 и др.] ранее предпринимали попытки использовать парафиновые блоки архивного материала, зафиксированного 10% формалином, для последующего электронно-микроскопического изучения разных видов патологий после соответствующей обработки, однако в изучении микотических инфекций этот метод не применяли. При анализе данных в имеющихся работах показано, что, несмотря на возможность изучения формы и размеров клеток, а также ряда клеточных компонентов и специфических включений, качество приведенных в них снимков обычно низкое. Тем не менее, идея сочетанного использования методов световой и электронной микроскопии для ускоренного и целенаправленного исследования микозов человека представляется в настоящее время весьма актуальной. При апробации имеющихся методов мы не получили желаемого результата в изучении тканевых форм грибов.

В связи с этим задачами настоящего исследования были: 1) на модельном объекте отработать метод повторного использования парафиновых блоков биопсийного материала для последующего электронно-микроскопического исследования; 2) изучить цитологические особенности аспергилла в легких человека с помощью современных методов световой и трансмиссионной электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Больной Д. (1981 г.р.) впервые поступил в клинику НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина 12.01.2005 г. В апреле 2003 г. пациент заболел инфильтративным туберкулезом в фазе распада и обсеменения, ВК+. В течение года получал специфическую терапию, состояние стабилизировалось, прекращение бацилловыделения отмечали с января 2004 г. Летом 2005 г. работал помощником озеленителя, был контакт с землей и растениями. В сентябре 2005 г. у пациента появился кашель с умеренным количеством мокроты с прожилками крови. С ноября 2005 г. в ПТД получал противотуберкулезную и гемостатическую терапию без эффекта. Сохранялся кашель с эпизодами кровохарканья, в связи с чем в декабре 2005 г. на отделении торакальной хирургии ЛОКБ была проведена верхняя левосторонняя лобэктомия. При гистологическом исследовании послеоперационного материала обнаружили гифы мицелия гриба, а при посеве мокроты выделили культуру *Aspergillus fumigatus*.

При изучении гистологических препаратов в легких были обнаружены обширные зоны некроза. В некробиотических массах выявили густые сплетения септированных и ветвящихся гиф мицелия диа-

метром 3–4 мкм, а также конгломераты из раздутых клеток гриба диаметром до 10–20 мкм. При изучении сыворотки крови получен положительный результат теста на галактоманнан (*Platelia*) *Aspergillus*, а также специфический Ig G с *A. fumigatus* 3(+). На КТ органов грудной клетки: в зоне оперативного вмешательства отмечали инфильтрат с нечеткими неровными контурами, в нижних отделах левого легкого на фоне изменений лёгочной ткани по типу матового стекла наблюдали участки уплотнения лёгочной ткани размером до 14 мм. По результатам обследования был поставлен диагноз «хронический некротизирующий аспергиллёз лёгких».

Кусочки ампутированной части легкого пациента изначально зафиксировали для световой микроскопии в течение 24 часов 10% раствором формалина и далее обрабатывали по стандартной методике. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином-эозином, а затем исследовали в световом микроскопе Leica DMR.

В настоящей работе мы приводим лишь один из большого числа апробированных нами методов возможного использования парафиновых блоков для последующего электронно-микроскопического исследования, поскольку он обеспечил наилучшую сохранность как тканей легких пациента, так и грибных элементов.

Для трансмиссионной электронной микроскопии из парафинового блока вырезали кусочки (2x5 мм) с наибольшей концентрацией грибных элементов и обрабатывали по следующей схеме:

- 1) депарафинизация в ксилоле (3 часа при комнатной температуре);
- 2) проводка через серию этанолов (96° – 60 минут, 70° – 30 мин, 50° – 30 мин, 30° – 30 мин);
- 3) промывка дважды по 15 минут раствором какодилатного буфера (рН 7,2);
- 4) фиксация 3 часа при комнатной температуре в смеси 3% раствора глутаральдегида и параформальдегида, приготовленной на какодилатном буфере;
- 5) промывка в какодилатном буфере;
- 6) постфиксация в течение 9 часов на холоде в 1% осмиевой кислоте;
- 7) проводка через серию этанолов (30° – 60 мин, 50° – 30 мин, 70° – 30 мин, 96° – 30 мин), а также абсолютном ацетоне и смесях абсолютного этанола и ацетона (2:1 – 2 часа; 1:1 – 2 часа; 1:2 – на ночь);
- 8) проводка в смесях ацетона и эпоксидной смолы эпон-аралдит (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5);
- 9) раскладка образцов в пластиковые формы и заливка в эпоксидную смолу эпон-аралдит;
- 10) блоки с образцами для лучшей пропитки смолой выдерживали трое суток в эксикаторе с осушителем при комнатной температуре;
- 11) полимеризация блоков в термостате при 60° в течение 3 суток.

На пирамитоме LKB 11800 из эпоксидных блоков готовили полутонкие срезы (2–4 мкм), которые окрашивали раствором фуксина основного, а затем

исследовали в световом микроскопе для выявления грибных элементов и последующей прицельной за- точкой блоков. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB V, затем окрашивали 5 минут цитратом свинца и 10 минут – 2% раствором уранилацетата по стандартной методике и изучали в трансмиссионном электронном микроскопе Jem–100 SX II.

Пациент получал амфотерицин В 50 мг в сутки (19 дней), затем – итраконазол 500 мг в сут. На фоне лечения отмечали положительную динамику: улучшилось самочувствие, уменьшились инфильтративные изменения в лёгких на КТ органов грудной клетки, купировано кровохарканье. Пациент принимал итраконазол до августа 2006 г., после чего самостоятельно отменил препарат. Общая продолжительность антимикотической терапии составила 8 месяцев.

При контрольном обследовании в декабре 2006 г. на КТ органов грудной клетки наблюдали свежие очаговые изменения в нижней доле левого лёгкого, при 3-х кратном посеве мокроты был получен рост *A. flavus*, выявлен IgG с *A. fumigatus* 3(+). Произошло обострение хронического некротизирующего аспергиллёза лёгких, в связи с чем пациенту назначили итраконазол 500 мг в сутки в течение 4 месяцев.

По данным обследования, в апреле 2007 г. была достигнута клиничко-лабораторная ремиссия хронического некротизирующего аспергиллёза легких.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При светооптических исследованиях полутонких эпоксидных срезов биоптатов, окрашенных фуксином основным, обнаружили наличие скоплений грибных гиф в просвете некоторых бронхов мелких и средних калибров, а также в паренхиме легких, где они формировали четыре четко различимые морфологические зоны в виде:

1) небольших (16–60 мкм) округлой формы (Рис. 1 а, стрелка) хаотично и плотно расположенных скоплений гиф;

2) обширных скоплений хаотично и рыхло расположенных извилистых гиф (Рис. 1 б, стрелки);

3) обширных скоплений плотно и, в основном, параллельно расположенных относительно друг друга гиф, формирующих подобие ложной ткани (Рис. 1 в, стрелки);

4) обширных скоплений хаотично и рыхло локализующихся гиф мицелия (Рис. 1 д, стрелки), подстилающих многочисленные конидиогенные аппараты, ориентированные головками в направлении, противоположном скоплению грибных гиф, и локализующихся на разных уровнях относительно друг друга.

Электронно-микроскопическими исследованиями показано, что стенка бронхов изученных биоптатов легких пациента состояла из эпителиальных клеток, расположенных наподобие палисады, свободная (обращенная в просвет) поверхность которых имела многочисленные микроворсинки (Рис. 1 е). В содер-

жимом большей части клеток эпителия отмечали продольно ориентированные сильно хроматизированные ядра (6–7 x 3–4 мкм), характеризующиеся наличием плотной нуклеоплазмы, слабо извилистого контура (Рис. 1 е); мелких вакуолей, митохондрий; редких, коротких, сильно искривленных агранулярных цистерн эндоплазматического ретикулума и многочисленных мелких светлых пузырьков. Иногда встречались клетки эпителия без цитозоля, содержащие разрушающиеся ядра и другие органеллы. В просвете некоторых бронхов наблюдали обширные скопления грибных гиф, локализующихся плотно и, в основном, параллельно относительно друг друга (Рис. 1 ж). Выявили гифы двух типов: широкие (4–6 мкм) и узкие (2–3 мкм, Рис. 1 ж, и), причем первые доминировали. Клетки широких гиф, несмотря на отсутствие живого содержимого, сохраняли форму таковых, некогда интактных. В их светлом просвете преобладали равномерно расположенные скопления фибриллярного вещества разной конфигурации (Рис. 1 ж). Они имели тонкие (0,1–0,2 мкм) светлые первичные клеточные стенки (Рис. 1 з), а также вторичные клеточные утолщения. Последние встречались не регулярно и внутрь от первичных (Рис. 1 з, к). Вторичные утолщения могли формироваться по всему периметру гифы либо локально в отдельных довольно протяженных или коротких ее участках. Часто их можно было наблюдать в зонах контакта двух-трех гиф. Вторичные утолщения были в 3–4 раза толще (0,3–0,8 мкм) первичных клеточных стенок, характеризовались умеренной электронной плотностью и наличием наружного тонкого темного, неравномерного редко прерывистого наружного слоя, обращенного в полость гифы. Они могли быть равномерными по толщине на всем своем протяжении и повторять форму несущих их гиф (Рис. 1 з) либо иметь извилистые очертания (Рис. 1 к). Широкие и узкие гифы, локализующиеся в просвете бронхов, как правило, были полностью погружены в темный плотный так называемый «внеклеточный матрикс» [1, 2] (Рис. 1 ж). Судя по ультраструктуре (наличие ядер, цитозоля, митохондрий, вакуолей, многочисленных мелких светлых пузырьков и плазмалеммы), узкие гифы были интактными.

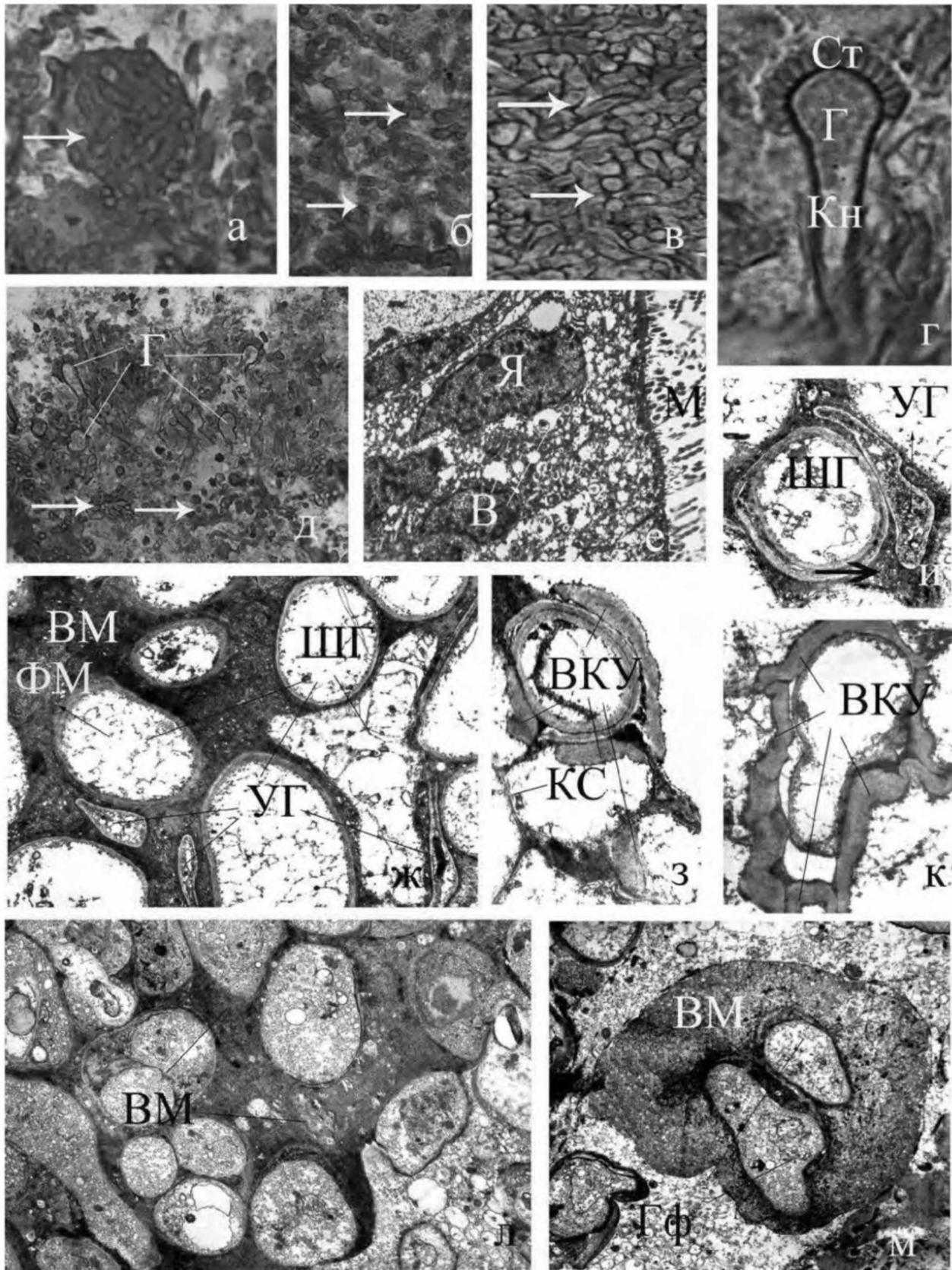


Рис. 1. Световая микроскопия эпоксидных (а-д) и ультратонких (е-к) срезов легких пациента: а-д – окраска фуксином основным. Ув.: а, в, г – x1000; б, д – x800; е, и, ж, з, к – x6000; л, м – x5000. а, б, в, д – ↑ показаны гифы. Условные обозначения здесь и на рисунках 2, 3, 4: В – вакуоль(и), ВКУ – вторичные клеточные утолщения, ВМ – внеклеточный матрикс, Г – головка, Гф – гифа(ы), КВ – кристаллические включения, Кн – конидиеносец, КС – клеточная стенка, М – микроворсинки, Мф – макрофаг, ПКС – первичная(ые) клеточная(ые) стенка(и), С – септа(ы), Ст – стеригмы, ФМ – фибриллярный материал, ШГ – широкая(ие) гифа(ы), УГ – узкая(ие) гифа(ы), Ц – цитозоль, Я – ядро(а)

Первая зона локализации грибных элементов в паренхиме легких пациента состояла из небольших по площади, плотных скоплений хаотично ориентированных широких гиф варьирующего диаметра, находящихся на разных стадиях развития и в тесном контакте друг с другом (Рис. 1 а, л). Они содержали одиночные ядра (0,9-1,2 мкм), мелкие вакуоли, плотный цитозоль, многочисленные свободные рибосомы, редкие короткие цистерны агранулярного эндоплазматического ретикулама и многочисленные пузырьки. Запасные вещества отмечали не во всех клетках в виде небольших, редких, умеренной электронной плотности липидных включений и мелких, темных, белковых включений в вакуолях. Клетки гиф имели тонкие (0,1-0,2 мкм), однослойные, гомогенные, умеренной электронной плотности клеточные стенки, лишённые вторичных утолщений. Снаружи они несли темный, варьирующей (0,1-0,4 мкм) толщины внеклеточный матрикс (Рис. 1 л). Клетки гиф на разных стадиях старения и полностью отмершие наблюдали как исключение.

Вторая зона состояла из значительных по площади, неправильной формы скоплений хаотично ориентированных широких гиф, локализующихся рыхло относительно друг друга (Рис. 1 б). Они могли быть в группах по две-четыре (Рис. 1 м) либо одиночными (Рис. 2 в). По ультраструктуре клетки гиф были сходны с аналогичными первой зоны. Отличительной особенностью их тонкого строения был тот факт, что снаружи клеточной стенки они несли намного более развитый, темный внеклеточный матрикс (Рис. 1 м) варьирующей толщины (0,2-4,0 мкм). Стареющие и полностью отмершие клетки гиф встречались как исключение.

Третья зона была представлена обширными скоплениями из плотно (Рис. 1 в) и параллельно расположенных относительно друг друга широких и узких гиф (Рис. 2 г, д). По частоте встречаемости широких и узких гиф и строению содержимого клетки гиф описываемой зоны были сходны с аналогичными, выявленными в просвете бронхов. Отличие состояло в том, что в широких гифах вторичные утолщения отсутствовали. Гифы также были погружены в довольно плотный, темный внеклеточный матрикс варьирующей ширины. На рисунке 2 а показан фрагмент узкой гифы со слабо хроматизированным интерфазным ядром, цитозолем, а также многочисленными мелкими вакуолями и пузырьками. Редко встречающиеся одиночные профили узких гиф были лишены внеклеточного матрикса (Рис. 2 б).

Отличительной чертой строения **четвертой зоны** было наличие многочисленных конидиогенных аппаратов (Рис. 1 д), в составе которых были различимы гладкостенный конидиеносец высотой 250-450 мкм (Рис. 1 г), колонковидная головка диаметром 20-25 мкм и один ряд стеригм (5-7x2-3 мкм). Конидии на стеригмах конидиогенных аппаратов, а также свободно лежащие в тканях легких, мы не наблюдали. В основном, конидиогенные структуры

были полностью отмершими (Рис. 2 ж), но, несмотря на это, сохраняли присущую им в интактном состоянии форму. Редко они содержали цитозоль с разрушающимися органеллами, обрывками мембран и многочисленными крупными пузырьками варьирующего диаметра. В основании конидиогенных аппаратов отмечали умеренные скопления хаотично и довольно рыхло ориентированных широких гиф (Рис. 1, стрелки), в основном, находящихся на разных стадиях старения. Они одиночные либо в небольших группах. В просвете интактных гиф выявили ядра (Рис. 2 з) с низким содержанием конденсированного хроматина и крупными ядрышками, редкими мелкими митохондриями и вакуолями, многочисленными мелкими пузырьками, плотным цитозолем и свободными рибосомами. Запасные вещества отсутствовали. Отметим, что низкое содержание запасных веществ было характерно и для клеток гиф *A. fumigatus*, инфицирующих паренхиму легких мышей [3]. Плотный темный внеклеточный матрикс клеток широких гиф имел варьирующую толщину (0,3-4,3 мкм, Рис. 2 з).

Клетки широких и узких гиф, локализующихся в бронхах и паренхиме легких (третья зона) пациента, были отделены друг от друга клиновидными, однослойными, светлыми септами. В стареющих клетках гиф септы приобретали полусферическую (Рис. 2 д) или неправильную форму. В широких гифах диаметр септальной поры составлял 0,14 мкм; толщина септы вблизи клеточной стенки была равна 0,2 мкм, а септальной поры – 0,12 мкм. По строению и размерам септы широких гиф совпадали с аналогичными ранее изученного штамма *A. fumigatus*, выделенного от пациента и выращенного *in vitro* [4]. В септах узких гифах септальная пора имела диаметр 0,07 мкм; толщина септы около клеточных стенок была равна 0,1 мкм, а вблизи септальной поры – 0,06 мкм.

Отметим, что в ходе исследований мы не выявили гифы в просвете сосудов ткани легкого.

В паренхиме легких среди разрушающихся клеток зон некроза отмечали свободно лежащие скопления палочковидных (от 0,42x0,05 до 2,1x0,15 мкм) кристаллических включений умеренной или повышенной электронной плотности (Рис. 2 е).

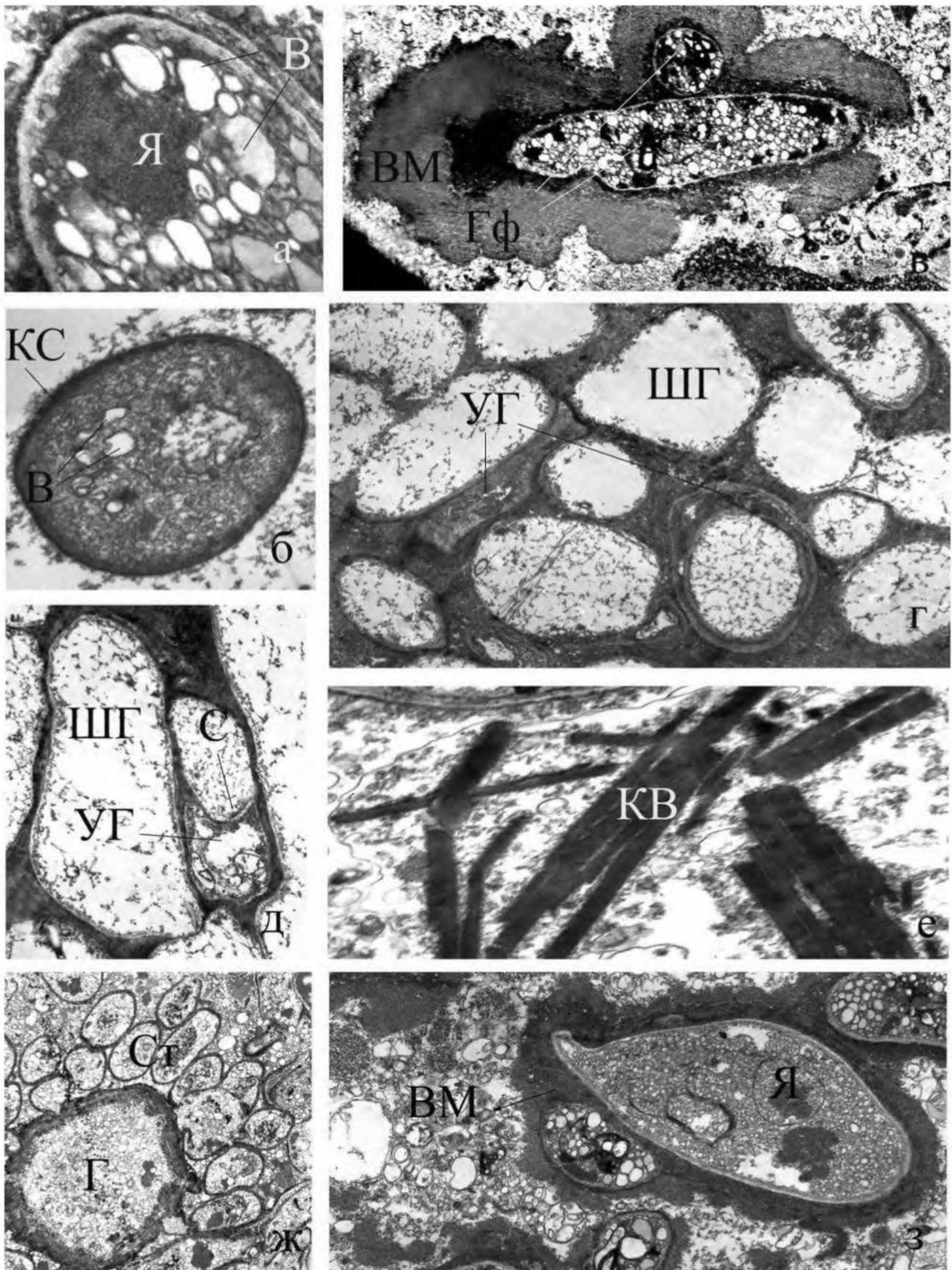


Рис. 2. Особенности ультраструктурной организации гиф грибов в ткани легкого.
 Ув.: а, б, е – 8000, в, г, д – х5000, ж – 4500; з – х6000

Описанные включения одиночные либо в группах от 2 до 40. Ранее сходные образования были описаны Feldmesser M. с соавторами (Infect. Immun., 2001. – Vol.69, №4) в тканях легких мышей, инфицированных *Cryptococcus neoformans*, с наличием ярко выраженных признаков эозинофильной пневмонии. Согласно наблюдениям данных авторов, на начальных стадиях инфекционного процесса названные включения встречались в содержимом макрофагов и клеток паренхимы легких, а через 28 дней они были отмечены исключительно за их пределами, как и в нашем случае. Как полагают авторы, располагаясь внутри интактных клеток легких, такие включения способствуют разрушению их плазматической мембраны, что является причиной гибели последних. Авторы предполагают, что описанные включения:

1) состоят из основного эозинофильного белка, и их формирование обуславливает цитотоксичный эффект;

2) формирование большого их числа в макрофагах связано с их последующим разрушением и отмиранием;

3) формирование кристаллов можно рассматривать в качестве механизма противодействия клеток хозяина в ответ на грибной агент и стимулирования устойчивости к микотической инфекции.

Отдельно остановимся на тонком строении клеток иммунной системы анализируемого случая. В просветах бронхов вблизи скоплений гиф редко встречались разрушенные (Рис. 3 а) макрофаги, содержащие профили отмерших гиф в числе от одной до трех. В паренхиме легких разрушенные и разрушающиеся макрофаги с отмершими гифами в содержимом также имели место (Рис. 3 б). Помимо них, встречались одиночные (Рис. 3 в) либо попарно сближенные макрофаги (Рис. 3 г), содержащие обычный для этого типа клеток иммунной системы набор органелл. Показателен снимок Рис. 3 г, демонстрирующий «безразличие» макрофага к отмершим и интактным грибным гифам. Из других клеток моноцитарно-макрофагального звена мы наблюдали моноциты (Рис. 3 д).

Для демонстрации качества фиксации приводим

электроннограмму плазматической клетки (Рис. 3 е) легкого с ядром и многочисленными извилистыми цистернами гранулярного эндоплазматического ретикулаума.

В целом, низкая активность клеток иммунной системы подтверждает наш вывод о том, что в описываемом случае последняя находится в состоянии относительного «покоя», и в противоборстве с ними грибная инфекция «взяла верх».

У пациента Д. перед оперативным вмешательством (06.12.05 г.) при посеве мокроты была выделена культура *A. fumigatus*, тогда как электронно-микроскопическими исследованиями выявили в биопсиях легких наличие гиф двух типов различной морфологии. Факт наличия *A. fumigatus* подтверждает присутствие в паренхиме легких пациента конидиогенных аппаратов, характерных для этого вида гриба. В бронхах и паренхиме легких пациента доминировали широкие гифы мицелия, которые по диаметру и особенностям строения внеклеточного матрикса соответствовали гифам мицелия *A. fumigatus*. Отметим, что для гиф культуральных [4] и тканевых [1, 3, 5] форм этого вида гриба характерно наличие тонких клеточных стенок, окруженных хорошо развитым внеклеточным матриксом. Как показано данными настоящей работы, наиболее хорошо последний развит снаружи клеточных стенок одиночных или собранных в небольшие группы клеток широких гиф второй и четвертой зон. В условиях культуры клетки воздушного мицелия *A. fumigatus* (штамм РКПГ-1172, Российская коллекция патогенных грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина), в отличие от субстратного, были лишены внеклеточного матрикса [4]. У последних внеклеточный матрикс имел варьирующую (0,2-0,5 мкм) толщину, в 3,5 раза превышал толщину клеточной стенки, был довольно рыхлым и состоял из тонкофибриллярного материала в сочетании с темными крупными гомогенными сгустками разной конфигурации, иными словами, был развит намного слабее, чем у тканевых форм гриба. При переходе клеток этого штамма *A. fumigatus* в тканевую форму (легкие мышей) толщина внеклеточного матрикса доходила

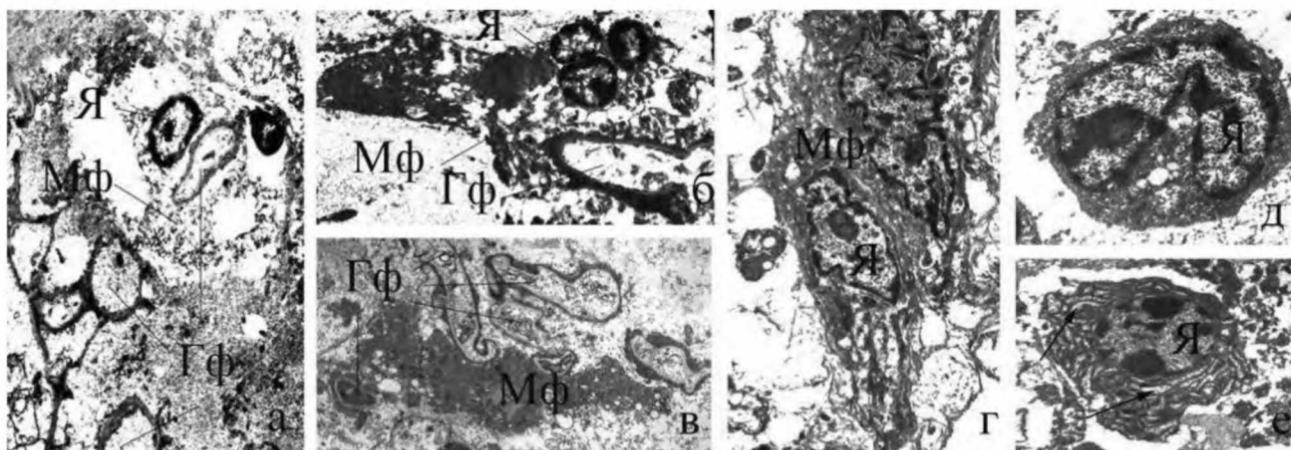


Рис. 3. Электронная микроскопия клеток просвета бронха (а) и тканей легких (б-е). Ув.: а, в – х4500, б – х6000, г, д, е – х5000, е - ↑ показаны цистерны эндоплазматического ретикулума

до 1,0-2,0 мкм, что превышало толщину клеточной стенки в 8 раз, и было в 4 раза больше по сравнению с клетками мицелия культуральных форм гриба. Отмечены изменения и в тонком строении внеклеточного матрикса у тканевых форм гриба: он становится неравномерным, возрастала его электронная плотность, он мог быть гомогенным либо гранулярно-фибрилярным. Согласно нашим наблюдениям, характерный для клеток субстратного мицелия ряда видов патогенных грибов внеклеточный матрикс, в ходе естественного процесса их старения, постепенно исчезал, полностью обнажая клеточные стенки [6]. Интересно отметить, что, согласно данным ряда авторов [1, 7], внеклеточный матрикс формируется уже с момента роста конидий *A. fumigatus*. По мнению Beauvais A. с соавторами [1], а также Muszkieta L. с соавторами [8], присутствие внеклеточного матрикса замедляет проникновение антимикотиков в клетки *A. fumigatus*. Latgé J.-P. [9] отводит ему протективную и адгезивную функции; последнее обстоятельство определяет их способность формировать биопленки. Последний автор рассматривает также возможность его «агрессивной» функции в качестве резервуара для хранения многих гидролитических и токсических молекул, выделяемых клетками гриба. Внеклеточный матрикс, окружающий клеточные стенки гиф *A. fumigatus*, состоит из полисахаридов, белков и пигмента меланина [1, 8].

Отметим, что у пациента Д. уже в январе 2008 года была достигнута клиничко-лабораторная ремиссия хронического некротизирующего аспергиллеза легких, однако при посеве мокроты (от 24.01.08 г.) был получен высев другого вида гриба – *A. flavus*. Мы склонны допустить, что узкие гифы соответствуют мицелию *A. flavus*. Они встречались намного реже, но, непременно, в просвете бронхов, содержащих скопления гиф, а также в третьей зоне локализации гиф в паренхиме легких. Следует отметить, что в скоплениях отмерших широких гиф как в бронхе, так и в паренхиме легкого, узкие гифы чаще всего были интактными. Различия в диаметре гиф мицелия *A. fumigatus* и *A. flavus* (соответственно, 5-8 мкм и 3-6 мкм) характерны для штаммов этих видов, выделенных из окружающей среды [Raper K.B., Fennell D.I. New York, 1973 и др.]. Дополнительным подтверждением того, что узкие гифы, скорее всего, принадлежат *A. flavus* является тот факт, что внеклеточный матрикс в условиях культуры, судя по снимкам, представленным в работе Vojović-Cvetić D. и Vujičić R. [Vojović-Cvetić D., Vujičić R. // Protoplasma, 1976. – Vol.88], вокруг гиф мицелия отсутствовал. Нет его и у тканевых форм гриба, инфицирующих клетки проводящей системы растения [Huizar H.E., et al // Mycopathologia, 1990. – Vol.110].

В практике клиницистов нередко случаи выявления аспергиллеза легких у больных туберкулезом [9 и др.]. В целом, при анализе морфологических образований элементов гриба в паренхиме легкого пациента наблюдали отсутствие радиально ориен-

тированных скоплений гриба (инвазивная форма), характерных для ранних стадий развития инфекции [Latgé J.-P. // Clin. Microbiol. Rev., 1999. – Vol.12, №2]. Как светооптически, так и электронно-микроскопически, мы не выявили характерные для легких больных туберкулезом [Latgé J.-P. // Clin. Microbiol. Rev., 1999. – Vol.12; Митрофанов, В.С., Чернопятава, Р.М. // Пробл. мед. микол., 2000. – №4 и др.] аспергиллемы – так называемые «fungal ball», представляющие собой сферические скопления гиф гриба в полостях, заключенных в белковый матрикс, часто – со спорулирующими конидиогенными структурами по периферии. Очевидно, что мы можем говорить о находке до сих пор неизвестного для тканевых форм аспергиллов морфологического образования. Пространственно это – шнуровидная ассоциация из плотно и параллельно расположенных относительно друг друга двух типов гиф, оккупирующих бронхи пациента (Рис. 4 а), которая имеет продолжение (третья зона, Рис. 4 б) в ткани легкого, где она выполняет, скорее всего, проводящую функцию, как и в бронхах.

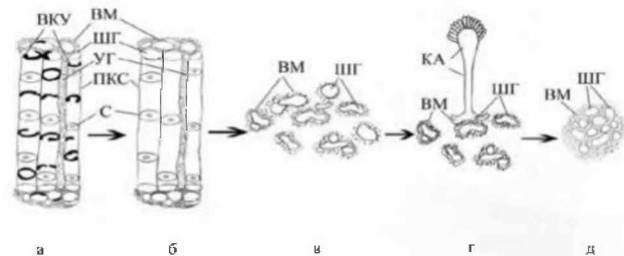


Рис. 4. Схема, иллюстрирующая особенности строения гиф грибов в просвете бронхов (а) и паренхиме легких (б-д): б – третья зона, в – вторая зона, г – четвертая зона, д – первая зона

Структурными элементами, благодаря которым широкие гифы в описанном образовании не спадают и сохраняют присущую им в интактном состоянии форму, являются впервые описанные для тканевых форм *A. fumigatus* вторичные клеточные утолщения и наличие внеклеточного матрикса, в который они «замурованы». Их присутствие, безусловно, усиливает ригидность как первичных клеточных стенок, так и в целом всего описанного грибного «комплекса». Мы допускаем переход широких гиф третьей зоны в хаотично и рыхло расположенные широкие гифы второй зоны (Рис. 4 в), что важно для осуществления обильного спороношения (четвертая зона, Рис. 4 г). Фактически, это естественный ход инфекционного процесса в легких человека – от бронхов в ткань легкого. Остается открытым вопрос о том, каким образом формируются небольшие по размерам округлой формы скопления гиф (первая зона, Рис. 4 д), которые могут быть источником реинфекции. Осмелимся предположить, что источником последних могут быть конидии некогда спорулирующих конидиогенных аппаратов, что опосредованно подтверждает и наличие в их составе только широких гиф, характерных для *A. fumigatus*. Общеизвестно, что в

тканях легких аспергиллы обычно формируют округлые скопления – аспергиллемы в полостях паренхимы легких либо они располагаются непосредственно в альвеолах, что, в обоих случаях, обеспечивает их не только питательными веществами, но и, прежде всего, достаточным количеством кислорода, необходимого для их нормального развития. В исследованном нами случае таких образований не выявили, и снабжение, по крайней мере, частично, кислородом интактных гиф грибов могло происходить непосредственно из просветов бронхов.

Присутствие в качестве инфекционных агентов микотической инфекции не одного, а двух видов патогенных грибов, безусловно, значительно усугубляет течение инфекционного процесса, создает существенные трудности для клеток иммунной системы человека, прежде всего, ввиду того, что обсуждаемые виды патогенных грибов синтезируют различный спектр грибных токсинов. Следует специально остановиться на структурно-функциональных особенностях «симбиоза» двух типов гиф (Рис. 3 а), выявленных в просвете бронхов и имеющих продолжение в ткани легкого (третья зона). С одной стороны, они сходны с ризоморфами базидиальных грибов (шнуровидными сплетениями гиф мицелия, заключенными в темный матрикс из меланина), достигающих значительной протяженности (до нескольких метров), которые служат для проведения воды и растворенных в ней питательных веществ из разветвленного в корне высшего растения мицелия к их плодовым телам. С другой стороны, по особенностям анатомического строения и внутреннего содержания клеток, описанное скопление гиф сродни элементам проводящей системы растений – ситовидным трубкам (аналог – широкие гифы) и клеткам-спутникам (аналог – узкие гифы), осуществляющим транспорт растворенных питательных веществ в теле высших растений. Можно допустить две возможные функциональные нагрузки описанного образования: 1) транспорт метаболитов гриба из ткани легких в бронхи (по типу «мусоропровода»); 2) поглощение и транспорт метаболитов и аэрация гиф в направлении бронх → ткани легких и наоборот. Мы допускаем, что при втором типе функциональной нагрузки возможно функциональное разделение гиф: широкие гифы без вторичных утолщений, вероятно, служат для аэрации, тогда как снабженные ими – для транспорта водорастворимых метаболитов. Безусловно, нужны специальные физиологические исследования для того, чтобы точно определить состав метаболитов и направление их тока в описанном образовании.

В целом, состояние инфекционного процесса описанного случая можно оценить как «состояние относительного покоя» (хроническая форма) перед возможным повторным рецидивом, источником которого могут быть скопления интактных широких грибных элементов *A. fumigatus* первой и четвертой зоны паренхимы легких, а также интактных узких гиф

(предположительно – *A. flavus*) просвета бронхов и третьей зоны в ткани легкого. Отсутствие грибных элементов в просвете сосудов ткани легкого можно интерпретировать как факт отсутствия перехода инфекционного процесса в генерализованную форму. В описанном случае, судя по цитологическим данным, основной вклад в развитие инфекционного процесса внесли и могут в последующем внести, безусловно, клетки гиф *A. fumigatus*, однако присутствие сопутствующего агента, предположительно – *A. flavus*, несомненно, не только отяжеляет ход инфекционного процесса, но и придает ему специфическую морфологическую и биохимическую «окраску». В целом, исходя из полученных данных, можно говорить о перспективности использования предложенного метода как для выяснения фундаментальных аспектов течения патогенеза аспергиллеза, морфогенеза тканевых форм грибов, так и для диагностических целей.

ВЫВОДЫ

1. Использование парафиновых блоков биопсийного архивного материала после депарафинизации, фиксации глутаральдегидом-параформальдегидом-осмием, приготовленными на какодилатном буфере, и заливки в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит приемлемо для последующего светооптического и электронно-микроскопического исследований аспергиллеза легких человека.

2. При светооптическом изучении полутонких эпоксидных срезов показано, что клетки гриба формируют в паренхиме легких четыре четко выраженных морфологических зоны, коррелирующих с данными электронно-микроскопических исследований.

3. При электронно-микроскопических исследованиях просвета бронхов и паренхимы легких пациента выявили наличие в них двух типов гиф, различающихся по особенностям морфологии, что служит основой существования в них двух видов грибов – микст-инфекции, подтвержденной и посевом мокроты.

4. Морфологическим доказательством наличия в ткани легкого пациента микотической инфекции, вызванной *A. fumigatus*, является присутствие довольно большого числа конидиогенных структур, по размерам и морфологии, характерных для данного вида гриба.

5. Характерной чертой ультраструктурной организации гиф мицелия тканевых форм мицелия *A. fumigatus* является хорошо развитый, толстый, темный внеклеточный матрикс, который выполняет протективную функцию.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Beauvais A., Schmidt C., Guadagnini S., et al. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus* // Cell Microbiol. – 2007. – Vol. 9. – P. 1588-1600.
2. Loussert C., Scmitt C., Prevost M., et al. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus* // Cell. Microbiol. – 2010. – Vol. 12, Is. 3. – P. 405-410.
3. Степанова А.А., Босак И.А., Синуцкая И.А. Цитологическое исследование *Aspergillus fumigatus* Fr. в легких мышей // Проблемы мед. микологии. – 2013. – Т. 15, №1. – С. 53-50.
4. Степанова А.А., Синуцкая И.А., Авдеев Ю.А. Субмикроскопическое изучение клеток вегетативного мицелия *Aspergillus fumigatus* Fres. // Проблемы мед. микологии. – 2004. – Т. 6, №3. – С. 34-40.
5. Müller F.-M., Seidler M., Beauvais A. *Aspergillus fumigatus* biofilms in the clinical setting // Medical Mycology. – 2011. – Vol. 49, Suppl. 1. – P. 96-100.
6. Степанова А.А., Синуцкая И.А. Ультраструктурные аспекты старения клеток некоторых видов рода *Aspergillus* // Проблемы мед. микологии. – 2009. – Т. 11, №4. – С. 24-29.
7. Stepanova A.A., Sinitskaya I.A. Cytological investigations of *Aspergillus fumigatus* Fres. germinating conidia // Проблемы мед. микологии. – 2012. – Т. 14, №2. – P. 43-53.
8. Muszkieta L., Beauvais A., Pähz V., et al. Investigation of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation by various «omics» approaches // Front. Microbiol. – 2013. – Vol. 12. – P. 1-16.
9. Latgé J.-P. Dynamics of cell wall organization of *Aspergillus fumigatus* // 3rd Trends in Med. Mycology. – 2007. – P. 18.

Поступила в редакцию журнала 10.05.14

Рецензент: Корнищева В.Г.

