

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ *MALASSEZIA FURFUR* ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ОРУНГАЛА (ИТРАКОНАЗОЛА)

Приведены электронно-микроскопические данные о характере изменений ультраструктуры *Malassezia furfur* под воздействием орунгала. В результате действия орунгала выявлены глубокие деструктивные изменения в бластоспорах *M. furfur*, приводящие к гибели клетки. Изложенное свидетельствует о высокой фунгицидной активности препарата. Орунгал рекомендован как препарат выбора в терапии больных с распространенными и атипичными формами разноцветного лишая.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Malassezia furfur*, бластоспоры, ультраструктура, орунгал. Иммунопатология, аллергол., инфектол. 2000, 4: 95 стр.

ULTRA-STRUCTURAL CHANGES OF *MALASSEZIA FURFUR* CAUSED BY ORUNGAL TREATMENT

A.YU. NOVOSELOV, E.E. BRAGINA, J.V. STEPANOVA

Central Scientific Research dermatologic-venerologic Institute of Russian Ministry of Health, Moscow, Russia.

The electron microscopy data concerning ultra-structural changes of *Malassezia furfur* after orungal treatment are presented in the article. Deep destruction of blastospore of *M. furfur* was demonstrated after investigation. The results confirmed strong fungicidal properties of orungal.

KEY WORDS: *Malassezia furfur*, blastospore, structural changes, орунгал. Immunopathol., allergol., infectol. 2000, 4: 95 p.

Разноцветный лишай (*Tinea versicolor*) характеризуется широким распространением среди населения, длительным течением, частыми рецидивами. В последние годы в силу ряда объективных причин (экология, широкое применение антибактериальных препаратов, кортикостероидов, гормональных контрацептивов и пр.) число больных данным микозом значительно увеличилось. Актуальными остаются вопросы этиологии, патогенеза и лечения этого заболевания.

Tinea versicolor – распространенное, поверхностное грибковое заболевание, которое наиболее часто поражает кожу шеи, груди, спины, живота. Высыпания в виде невоспалительных пятен, неправильных очертаний, с шелушением на поверхности. Очаги вначале мелкие, увеличиваются

за счет периферического роста и располагаются вокруг волосяных фолликулов [1]. Окраска элементов варьирует от бледно-кремовой до темной. Разноцветный лишай распространен во всем мире, наиболее часто встречается в странах с жарким, влажным, тропическим климатом, где может быть поражена почти половина взрослого населения. В странах с умеренным климатом заболевание составляет 4 – 6 % от всех дерматологических больных [2].

Возбудителем разноцветного лишая является диморфный, липофильный грибок *Malassezia furfur* (Robin) Baillon. Ранее в литературе встречалось название гриба *Pityrosporum orbiculare*. По данным последней таксономической классификации дрожжей, принято название рода *Malassezia* (Robin)

Baillon, который включает в себя три вида: *M.furfur*, *M.pachydermatis* (Weidman) Dodge, *M.sympodialis* [3]. Недавно предложено включить в род *Malassezia* 4 новых вида: *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* и *M. slooffiae* [4,5,6].

Malassezia furfur – антропофильный грибок, является частью нормальной кожной флоры, под влиянием экзогенных и эндогенных предрасполагающих факторов трансформируется из непатогенной формы бластоспоры в патогенную мицелиальную форму, при этом значительно увеличиваясь в количестве и распространенности на коже [7,8].

При лечении разноцветного лишая широко распространено применение наружных антимикотических и отшелушивающих препаратов. Указанные средства эффективны при ограниченных формах микоза, но при распространенных и атипичных формах часто возникают рецидивы заболевания.

В отделе микологии ЦНИКВИ получены хорошие результаты лечения распространенных и атипичных форм разноцветного лишая препаратом орунгал (итраконазол).

Орунгал является системным антимикотиком, широкого спектра действия. Молекулярный механизм его действия изучен довольно полно. Не менее важными представляются нам сведения о морфологических критериях, свидетельствующих о гибели клетки, об изменении ее метаболизма при действии орунгала.

С целью более углубленного изучения механизма этиотропного действия орунгала нами были проведены электронно-микроскопические исследования ультраструктуры клеток гриба под влиянием препарата. Несомненный интерес представляет также изучение ультраструктуры возбудителя разноцветного лишая.

Материал и методы. Для культурального исследования были взяты чешуйки кожи из очагов поражения от 3 больных *Tinea versicolor*. Пациенты-мужчины в возрасте от 20 до 35 лет, с давностью заболевания более 10 лет. Для роста *in vitro* *Malassezia furfur* необходимо добавление C12-C24 насыщенных жирных кислот в питательную среду. Для культивирования гриба используются стандартные дрожжевые, плотные среды, покрытые тонким слоем оливкового или хлопкового масла. В чашки Петри на среду Сабуро наносили тонкий слой оливкового масла, на который помещали патологический материал. Оптимальная

температура для роста культуры – 37°C. Рост колоний появляется на 4 - 8 день. Выросшие колонии мягкой консистенции, желтовато-кремового цвета, слегка приподнятые над основанием, гладкие, с блестящей поверхностью. Культура растет на поверхности среды, не проникая вглубь. В центр культуры помещали 20 мг орунгала и инкубировали в термостате в течение 72 часов. Контролем служила культура *M.furfur* без орунгала.

Через 72 часа вокруг препарата образовался участок разреженного роста гриба, измененного серого цвета, диаметром около 1,2 см. Для исследования в сканирующем электронном микроскопе с поверхности культуры снимался верхний слой агара толщиной около 1мм.

Исследовали 3 препарата :

1.Контрольная культура *M.furfur* без орунгала.

2.Материал из участка культуры *M.furfur*, на границе зоны разреженного роста и неизменной культуры.

3. Материал из зоны разреженного роста культуры *M.furfur*, вокруг орунгала.

Материал фиксировали раствором 2,5 % глицеронового альдегида на 0,1 М. фосфатном буфере (РН 7,2) и 1% раствором осмиевой кислоты, промывали фосфатным буфером, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и в окиси пропилена.

Материал высушивали на воздухе, напыляли золотом и просматривали в сканирующем электронном микроскопе HITACHI .

Результаты.

1.При светооптической микроскопии контрольной культуры обнаруживается преобладание почкующихся клеток. Истинный мицелий отсутствует. Споры преимущественно округлой формы диаметром 2-3 х 3-6 мкм, встречаются единичные удлиненные и гантелеобразные клетки. При почковании чаще всего растет одна клетка, реже две и более. Диаметр бластоспор варьирует от 1,5 до 3-5 мкм. Дочерняя отпочковывающаяся клетка располагается на широком основании материнской клетки. Бластоспоры расположены по одной и в виде небольших скоплений. Стенка клеток окрашивается более интенсивно, просматриваются ядро и вакуоли.

После 72-часовой инкубации культуры *Malassezia furfur* с орунгалом клетки гриба в све-

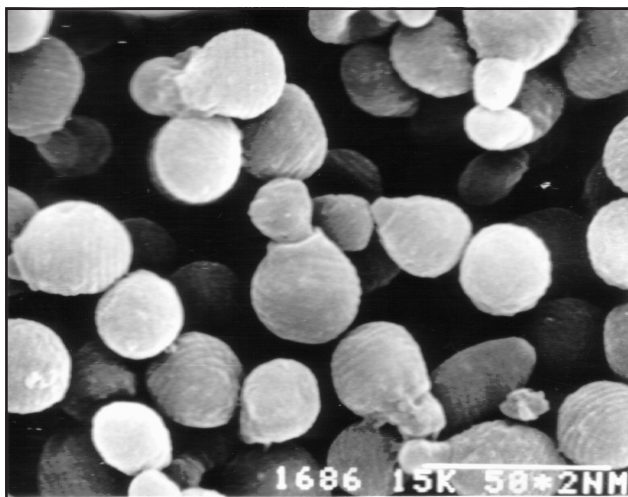


РИС 1. Культура *Malassezia furfur* (контроль). Сканограмма.
(Б) - типичные шаровидные бластоспоры.

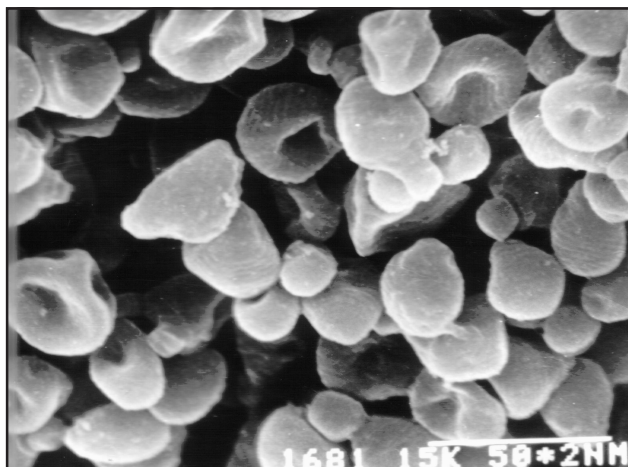


РИС 2. Участок культуры *M.furfur* на границе между зоной разреженного роста вокруг орунгала и неповрежденной зоной. Сканограмма. (Б) - неповрежденные бластоспоры, (П) - поврежденные бластоспоры со спавшейся клеточной стенкой.

тооптическом микроскопе выглядят поврежденными, теряют округлую форму.

2. При исследовании в сканирующем электронном микроскопе 5-суточной культуры *Malassezia furfur* наблюдаются бластоспоры разного диаметра (рис 1).

Основная масса бластоспор имеет шаровидную форму, встречаются единичные клетки вытянутой формы, а также наблюдается деление бластоспор: от материнской отпочковывается дочерняя клетка меньшего диаметра. Это свидетельствует о жизнеспособности грибов, выращенных на питательной

среде. На границе между материнской и дочерней бластоспорами наблюдается борозда деления. В отличие от овальных форм (*P. ovale*) не наблюдается выраженной воротничкообразной складчатости клеточной стенки в виде валика. При исследовании культуры, подвергавшейся действию орунгала в течение 72 часов, установлено изменение морфологии клеток *M. furfur*.

На рис. 2 представлены бластоспоры из участка на границе зоны разреженного роста и неизменной культуры. Наблюдаются неизменные шаровидные формы и клетки, которые выглядят “пустыми”, со спавшимися клеточными стенками.

В зоне разреженного роста, сформировавшейся вокруг орунгала (участок культуры с измененным цветом), мы наблюдали повреждение практически всех бластоспор. Клетки гриба утратили свойственную им шаровидную форму, имеют спавшиеся клеточные стенки, выглядят “пустыми” (рис 3). Дочерние бластоспоры, отпочковывающиеся от материнских клеток, также выглядят поврежденными. На поверхности материнских и дочерних клеток отмечается большое количество мелкогранулярного материала.

Единичные сохранившиеся бластоспоры с неспавшимися стенками приобретают неправильную вытянутую форму, иногда палочковидную, т.е. даже не разрушенные бластоспоры *M. furfur* претерпевают выраженные морфологические изменения под воздействием орунгала.

Обсуждение

До настоящего времени среди исследователей нет единого мнения о том, являются ли шаровидные (*P. orbiculare*) и овальные (*P. ovale*) формы *Malassezia furfur* одним грибом или это разные подвиды одного вида. Известно, что шаровидные и овальные формы отличаются при исследовании патологического материала в светоптическом микроскопе.

Шаровидные формы присутствуют в чешуйках в виде мицелия и спор. Нити мицелия довольно широкие, изогнутые, короткие, состоят из удлинённых клеток. Споры крупные 2 - 8 мкм в диаметре, с двухконтурной оболочкой располагаются в виде гроздей или поодиночке. Овальные формы характеризуются наличием в патологическом материале тонкостенных, вытянутых, нередко почкующихся клеток

2,5 – 4,0 мкм в диаметре. Мицелий отсутствует [9].

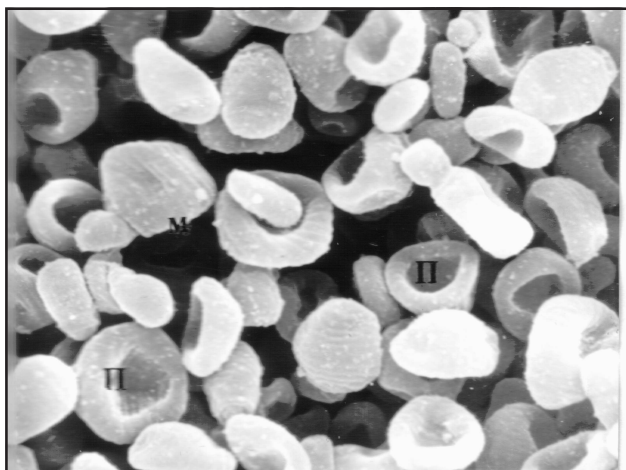


РИС3. Культура *M.furfur* в зоне разреженного роста вокруг орунгала. Сканограмма.

(П) – поврежденные, “пустые” бластоспоры со спавшейся клеточной стенкой,
(М) - мелкогранулярный материал на поверхности клеточной стенки.

На основании проведенного электронно-микроскопического исследования культуры *Malassezia furfur* выявлено, что шаровидные и овальные формы отличаются также ультратонким строением. На основании исследований, проведенных Г.А. Дмитриевым и соавторами [10], известно, что овальные формы имеют более удлиненную форму, гладкую поверхность, кроме этого на границе материнской и дочерней бластоспор присутствует выраженная воротничкообразная

складчатость клеточной стенки в виде валика. По нашему мнению, овальные формы *M.furfur* являются этиологическим агентом себорейного дерматита и перхоти. Шаровидные формы морфологически и физиологически отличаются от овальных форм и рассматриваются как возбудитель разноцветного лишая.

При сравнительном анализе РНК и ДНК, внутри вида *Malassezia furfur* было выделено несколько подвидов, различающихся строением большой субединицы рРНК [3, 5], что согласуется с нашими наблюдениями о наличии подвидов.

Заключение

Проведенные нами ультраструктурные исследования в сканирующем электронном микроскопе культур *Malassezia furfur* позволили проанализировать морфологические изменения, происходящие под влиянием орунгала. Выявлено, что антимикотик вызывает глубокие деструктивные изменения в бластоспорах *M.furfur*, приводящие к гибели клетки гриба. Мы наблюдали исчезновение цитоплазмы клеток и спавшиеся клеточные стенки. Даже при отсутствии лизиса цитоплазмы мы обнаружили выраженные морфологические изменения бластоспор. На основании вышеизложенного мы считаем, что орунгал обладает высокой фунгицидной активностью и является препаратом выбора в терапии больных с распространенными и атипичными формами разноцветного лишая.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Кашкин П.Н., Шеклаков Н.Д. Руководство по медицинской микологии. Москва. Медицина. 1978.-326 с.
2. Borelli D., Jacobs P.H., Nall L. Tinea versicolor: Epidemiologic, clinical, and therapeutic aspects // J. Am. Acad. Dermatol. - 1991. -Vol. 25, N 2. - P.300-305.
3. Kurtzman C.P., Fell J. W. Eds. The Yeasts / A taxonomic study / 4 th ed. 2d impression. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands. – 1999. - P.1055.
4. Gupta A.K, Kohli Y, Summerbell R.C. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species // J.Clin. Microbiol. - 2000. – Vol.38, N 5. - P.1869-75.
5. Gueho E., Midgley G., Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. // Antonie – Van – Leeuwenhoek. 1996. – Vol. 69, N 4. – P. 337-55.
6. Mayser P., Haze P., Papavassilis C., Pickel M., Gruender K., Gueho E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. // Br-J-Dermatol. 1997.- Vol.137, N 2. - P.208-13.
7. Fitzpatrick T.B., et al. Dermatology in general Medicine. 3 ed McCraw, Hill Inc New-York, St. Louis 1987. – P. 2644.
8. Lee K.H., Kim Y.G., Bang D., Kim Y.A. Scanning electron microscopy of *Malassezia furfur* in tinea versicolor. // Yonsei – Med – J. 1989. – Vol. 30, N 4. – P. 334-8.
9. Gordon M.A. The lipophilic mycoflora of the skin. In vitro culture of *Pytirosporium orbiculare* // Mycologia. - 1951.-Vol. 43.-P. 524-535.
10. Г.А.Дмитриев, В.А. Самсонов, Т.И. Наволоцкая, Е.Е. Брагина Оценка действия шампуня, содержащего пиритионат цинка, против *Pityrosporium ovale*, участвующего в возникновении перхоти. // Вестник дерматологии и венерологии. – 1999. - N5. – С. 57-59.